

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN  
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo 35

**Settore Concorsuale:** 07/H4 - CLINICA MEDICA E FARMACOLOGIA VETERINARIA

**Settore Scientifico Disciplinare:** VET/08 - CLINICA MEDICA VETERINARIA

MALATTIE IMMUNOMEDIATE DEL CANE E DEL GATTO: ASPETTI  
DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI

**Presentata da:** Michele Tumbarello

**Coordinatore Dottorato**

Carolina Castagnetti

**Supervisore**

Francesco Dondi

**Co-supervisore**

Massimo Giunti

**Esame finale anno 2023**

## ABSTRACT

La presente tesi di dottorato affronta alcune delle più comuni malattie immunomediate del cane e del gatto. Il manoscritto è incentrato sugli aspetti diagnostici e terapeutici in corso di: anemia emolitica immunomediata (*Immune-mediated hemolytic anemia*, IMHA), trombocitopenia immunomediata (*Immune-mediated thrombocytopenia*, ITP) e poliartrite immunomediata (*Immune-mediated polyarthritis*, IMP).

Il **capitolo 1** costituisce un'introduzione all'argomento delle malattie immunologiche sopracitate; vengono sottolineati alcuni aspetti patogenetici delle singole malattie e riassunte le difficoltà diagnostiche e terapeutiche che accomunano queste malattie immunomediate.

Nell'IMHA si assiste alla distruzione dei globuli rossi mediante un meccanismo di ipersensibilità di II tipo, che prevede l'attacco di immunoglobuline alla loro membrana cellulare. La presentazione clinica è caratterizzata da: anemia, ittero, pigmenturia e numerose alterazioni laboratoristiche quali sferocitosi, autoagglutinazione microscopica, positività a test immunologici. In corso di IMHA sono state segnalate numerose cause potenziali; nella maggior parte dei casi, tuttavia, ancora oggi, l'IMHA è definita come idiopatica o potenzialmente autoimmune. A tale proposito, nel **capitolo 2** viene riportato uno studio riguardante una popolazione di gatti con diagnosi, o sospetto diagnostico, di IMHA che evidenziava una discrepanza tra i test diagnostici per il virus della leucemia felina (*Feline Leukemia Virus*, FeLV). La positività FeLV al test *point of care*, non confermata dalla PCR del DNA provirale, lascia spazio a diverse interpretazioni. Una prima ipotesi è che si tratti di veri risultati falsi positivi FeLV, legati alla presenza di emolisi o ad antigeni che mimano la FeLV in corso di IMHA; un'altra ipotesi, ritenuta al momento meno probabile, è che ci sia una vera infezione sostenuta da FeLV non associata al rilevamento del DNA virale. Lo studio ha altresì contribuito a riportare dei dati descrittivi, clinicopatologici e relativi alla sopravvivenza dei pazienti felini con IMHA.

In merito al trattamento terapeutico, gli approcci immunosoppressivi proposti sono numerosi. I glucocorticoidi vengono considerati i farmaci di prima linea per la gestione terapeutica dell'IMHA e,

in taluni casi, vengono associati a farmaci immunosoppressori di seconda linea (ciclosporina, micofenolato mofetile, azatioprina). Non esiste consenso, tuttavia, su quale sia il regime terapeutico più indicato in termini sia della remissione dei sintomi clinici che sulla sopravvivenza. A questo scopo, nel **capitolo 3**, sono stati riportati i dati relativi al confronto tra tre diversi protocolli immunosoppressivi (glucocorticoidi, glucocorticoidi+ciclosporina, glucocorticoidi+micofenolato mofetile) in una popolazione di cani con IMHA non associativa (precedentemente detta “autoimmune” o primaria). Il confronto verteva, principalmente, sulla risposta ematologica dei suddetti pazienti, che non si è dimostrata differente tra i tre gruppi terapeutici. Da sottolineare, tuttavia, che i pazienti sottoposti a terapia immunosoppressiva combinata con metilprednisolone e ciclosporina, hanno mostrato una sopravvivenza a medio termine (60 giorni dalla diagnosi) e a lungo termine (1 anno dalla diagnosi) maggiore rispetto agli altri gruppi terapeutici.

Il **capitolo 4** riporta una revisione della letteratura riguardante l’ITP del cane e del gatto. Si tratta di una malattia eterogenea in cui si assiste ad una combinazione di eventi: distruzione umorale e cellulomediata delle piastrine a livello ematico, ma talvolta anche dei loro precursori, i megacariociti, presenti nel midollo osseo. Le manifestazioni cliniche appaiono variabili: alcuni pazienti si presentano asintomatici, mentre altri presentano dei sanguinamenti spontanei. La mancanza di criteri diagnostici standardizzati, porta il clinico a considerare l’ITP una diagnosi “ad esclusione”. Le strategie terapeutiche non si basano purtroppo su linee guida condivise, pertanto il *target* della terapia rimane, ad oggi, sconosciuto. Anche per questa malattia, la terapia di prima linea prevede l’utilizzo di dosi immunosoppressive di glucocorticoidi. Nei soggetti ritenuti più a rischio, la terapia cortisonica può essere combinata a farmaci immunosoppressivi di seconda linea, e/o a vincristina o immunoglobuline. In ambito clinico, emerge la necessità di rivolgere la terapia al singolo paziente, anche sulla base della diversa gravità e/o presentazione clinica della malattia, al fine di bilanciare il rischio di sanguinamento con i rischi legati all’immunosoppressione.

Nel **capitolo 5** viene posta l’attenzione su alcuni interrogativi diagnostici e terapeutici che riguardano l’IMP del cane e del gatto. Si tratta di una malattia determinata dal deposito di immunocomplessi nel

liquido sinoviale, che causano algia ed infiammazione. La sintomatologia clinica, caratterizzata da zoppia, febbre e riluttanza al movimento, talvolta può essere più subdola. Anche per tale motivo, giungere alla diagnosi in tempi relativamente brevi è fondamentale per il decorso positivo di questi pazienti. La gestione terapeutica risulta particolarmente ardua per il clinico. Dopo aver seguito un ampio *iter* diagnostico, atto ad escludere tutte le varie cause di IMP secondaria (soprattutto malattie infettive), può essere indicata una terapia immunosoppressiva di lunga durata. Generalmente, come nelle altre malattie immunomediate, i pazienti con IMP mostrano una buona risposta ai corticosteroidi; qualora la risposta clinica non fosse soddisfacente, o ci fossero marcati effetti collaterali legati alla terapia steroidea, è possibile utilizzare immunosoppressori di seconda linea, quali micofenolato mofetile, ciclosporina, leflunomide o altre molecole. Anche in questa malattia, tuttavia, non vi sono evidenze scientifiche circa il regime immunosoppressivo più corretto ed indicato. Particolarmente frequenti risultano essere le recidive in corso di IMP, che pongono ancora di più l'attenzione sulla necessità di protocolli standard che valutino i più indicati regimi terapeutici anche in corso di recidive della malattia. In animali che richiedano un trattamento a lungo termine, l'obiettivo finale della terapia è quello di raggiungere e mantenere la remissione clinica utilizzando la minor dose di immunosoppressore, riducendo gli effetti collaterali dei farmaci e garantendo al paziente una buona qualità di vita.

Infine, nel **capitolo 6** sono riassunte le discussioni e le conclusioni della presente tesi.

## Sommario

<b>Capitolo 1.....</b>	<b>6</b>
<b>INTRODUZIONE E OBIETTIVI DELLA TESI .....</b>	<b>6</b>
BIBLIOGRAFIA .....	14
<b>Capitolo 2.....</b>	<b>17</b>
<b>SUSPECTED FALSE POSITIVE RESULTS IN POINT OF CARE FELINE LEUKEMIA VIRUS TESTS IN PATIENTS     WITH IMMUNE-MEDIATED ANAEMIA .....</b>	<b>17</b>
Abstract .....	18
Introduction.....	19
Materials and methods .....	20
Results .....	21
Discussion.....	34
Bibliography.....	40
<b>Capitolo 3.....</b>	<b>43</b>
<b>METHYLPREDNISOLONE ALONE OR COMBINED WITH CYCLOSPORINE OR MYCOPHENOLATE MOFETIL     FOR THE TREATMENT OF IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA IN DOGS, A PROSPECTIVE STUDY .</b>	<b>43</b>
Abstract .....	44
Introduction.....	45
Materials and methods .....	46
Results .....	53
Discussion.....	78
Bibliography.....	84
<b>Capitolo 4.....</b>	<b>92</b>
<b>TROMBOCITOPENIA IMMUNOMEDIATA DEL CANE E DEL GATTO .....</b>	<b>92</b>
Riassunto .....	93
Abstract .....	93

Trombocitopenia immunomediata: classificazione, epidemiologia e presentazione clinica .....	95
Trombocitopenia immunomediata: diagnosi clinico-patologica .....	98
Terapia e prognosi .....	102
Score prognostici dell'ITP .....	109
Prognosi dell'ITP primaria .....	109
Bibliografia .....	111

**Capitolo 5..... 117**

**LA POLIARTRITE IMMUNOMEDIATA NEL CANE E NEL GATTO: TERAPIA E PROGNOSI ..... 117**

Riassunto .....	118
Abstract .....	118
Terapia immunosoppressiva e collaterale.....	120
Monitoraggio dei pazienti .....	126
Prognosi.....	128
Ruolo delle principali malattie infettive in corso di poliartrite immunomediata nel cane e nel gatto – 4 esempi .....	129
Bibliografia .....	133

**Capitolo 6..... 135**

**DISCUSSIONE E CONCLUSIONI ..... 135**

BIBLIOGRAFIA .....	141
--------------------	-----

## Capitolo 1

---

### INTRODUZIONE E OBIETTIVI DELLA TESI

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie,  
Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria,  
Bologna

La presente tesi di dottorato prende in considerazione alcune delle più comuni malattie immunomediate del cane e del gatto: anemia emolitica immunomediata (*Immune-mediated hemolytic anemia*, IMHA), trombocitopenia immunomediata (*Immune-mediated thrombocytopenia*, ITP) e poliartrite immunomediata (*Immune-mediated polyarthritis*, IMP).

Lo sviluppo di queste malattie sembra favorito da un complesso di fattori scatenanti e predisponenti e dipende sia da fattori individuali (genetici ereditari), sia da fattori ambientali.<sup>1,2</sup> La maggiore incidenza di alcune malattie immunomediate in alcune razze o linee di sangue di cani o gatti denota, infatti, come la consanguineità possa aumentare la frequenza dei genotipi associati a tali condizioni. Il fattore predisponente più significativo sembra infatti essere rappresentato dal *background* genetico ed è ormai riconosciuto come le malattie autoimmuni, sia umane che canine e feline, siano in parte determinate geneticamente.<sup>3</sup> Altri fattori predisponenti possono includere l'età, il sesso (assetto ormonale, anche se questo è meno evidente negli animali, rispetto all'uomo) e lo stile di vita (che in taluni casi può esporre i soggetti ad alcuni agenti infettivi).<sup>1,2</sup>

Nelle malattie immunomediate primarie (o autoimmuni) l'organismo produce una risposta immunitaria anomala verso elementi cellulari o tessuti *self*. In medicina umana, sono stati descritti diversi meccanismi attraverso cui questo può verificarsi;<sup>4</sup> in ambito veterinario, alcuni processi sono ben riconosciuti, altri non ancora definiti chiaramente. L'autoimmunità è un evento multifattoriale che coinvolge complesse reazioni immunologiche. Tra i meccanismi di ipersensibilità maggiormente riportati vi sono l'inibizione dei linfociti T regolatori (T reg, cellule che fisiologicamente inibiscono la produzione di autoanticorpi) e l'inappropriata presentazione dell'antigene *self* da parte delle cellule presentanti l'antigene. Questa combinazione di processi porta ad un'alterazione dei meccanismi di tolleranza immunologica ed il risultato è la produzione di autoanticorpi. Questi ultimi possono causare la lisi di alcune cellule (è il caso dei globuli rossi nell' IMHA e delle piastrine nell'ITP), oppure possono legarsi ad autoantigeni e formare degli immunocomplessi che si depositano a livello tissutale, provocando infiammazione (come avviene in sede articolare in corso di IMP).<sup>1,2</sup>

Nelle malattie immunomediate secondarie, invece, gli anticorpi prodotti sono diretti verso nuovi antigeni (antigeni non *self*), eventualmente combinati con antigeni *self* (si parla in questi casi di mimetismo molecolare), o ancora possono avere come bersaglio antigeni normalmente non accessibili.<sup>5</sup>

L'anemia emolitica immunomediata (IMHA) è tra le più comuni malattie immunomediate del cane; essa colpisce, seppur meno frequentemente, anche i pazienti felini.<sup>6</sup> La mortalità in corso di IMHA è ancora abbastanza elevata (50% circa dei pazienti).<sup>7</sup> Le prime due settimane successive alla diagnosi sono quelle a maggiore rischio, soprattutto per lo sviluppo di tromboembolismi.<sup>7</sup>

Nell'IMHA i globuli rossi vengono distrutti prematuramente a seguito di un meccanismo di ipersensibilità di II tipo, in cui gli anticorpi si legano a specifici epitopi della membrana eritrocitaria. Tale legame attiva i meccanismi di eritrofagocitosi, inducendo la distruzione/emolisi attraverso l'attivazione del sistema del complemento oppure tramite l'azione dei macrofagi.

Recentemente, l'IMHA è stata classificata in una forma non associativa (primaria o idiopatica) e una forma associativa (quando viene individuato un *trigger* o una comorbidità).<sup>8</sup> A questo proposito, alcune malattie infettive trasmesse da vettori, neoplasie emolinfoproliferative, farmaci, vaccinazioni e alcune patologie infiammatorie sono state segnalate come potenziali cause di IMHA nel cane e nel gatto.<sup>8</sup> Nei pazienti felini, in alcuni studi, è stata riportata l'associazione tra l'IMHA e il virus della leucemia felina (FeLV).<sup>9</sup> Pertanto, i test diagnostici per la FeLV fanno spesso parte del protocollo diagnostico dei gatti con IMHA. La corretta interpretazione di questi test richiede la conoscenza della patogenesi della malattia, delle interazioni virus-ospite, delle differenze tra i diversi test FeLV disponibili. I test di screening per la FeLV *point-of-care* (POC), basati su tecniche ELISA o immunocromatografiche, sono eseguiti di *routine* nella pratica veterinaria, grazie alla loro ampia disponibilità e rapidità dei risultati. Nel **capitolo 2** vengono descritti i risultati contrastanti tra i test POC e i test molecolari (PCR) della FeLV in una popolazione di gatti con diagnosi o sospetto

diagnostico di IMHA. La dimostrazione di false positività legate ad alcune malattie ematologiche, come l'IMHA, potrebbe condizionare notevolmente il management e la prognosi di questi pazienti. Lo stato FeLV di un paziente felino, infatti, spesso influenza le decisioni terapeutiche e gestionali che devono essere discusse con il proprietario. In generale, quindi, la valutazione diagnostica dei fattori scatenanti in corso di IMHA necessita di criteri ben precisi; questi criteri consentirebbero ai clinici di valutare meglio la probabilità che una data comorbidità, come la FeLV, sia implicata nella patogenesi della malattia e di conseguenza scegliere il tipo di test che risulta più performante.

Le manifestazioni cliniche predominanti in corso di IMHA sono quelle associate all'anemia, alla distruzione dei globuli rossi (emolisi) e all'infiammazione sistemica: debolezza, intolleranza all'esercizio, anoressia, vomito, febbre, pallore mucosale, tachicardia e tachipnea, soffio sistolico, epato-splenomegalia, linfadenomegalia, pigmenturia ed ittero. Le presentazioni cliniche acute (1 – 2 giorni) sono meno comuni e spesso sono accompagnate da una sintomatologia più grave.<sup>10</sup>

La diagnosi di IMHA si basa sulla dimostrazione di un meccanismo immunomediato alla base dell'emolisi; risulta fondamentale eseguire esami ematochimici, valutazioni emostatiche, l'esame chimico fisico delle urine e test specifici che dimostrino la presenza di anticorpi anti-eritrociti (test di Coombs, esame citofluorimetrico, test di autoagglutinazione microscopica). Oltre a questo, devono essere considerati approfondimenti diagnostici atti ad escludere eventuali patologie associate (diagnostica per immagini, esame citologico di organi addominali, test infettivi).<sup>8</sup> Talvolta, l'IMHA può essere non rigenerativa, poiché il meccanismo di distruzione può essere diretto contro i precursori dei globuli rossi; in questi casi, può essere altresì utile eseguire un esame citologico e/o istologico del midollo osseo.<sup>10</sup>

Il trattamento dell'IMHA ha 3 *goal* terapeutici: l'immunosoppressione, la prevenzione delle maggiori complicazioni (soprattutto tromboembolismi) ed il supporto del paziente durante le crisi emolitiche.<sup>7</sup> È molto importante, inoltre, individuare e trattare le eventuali malattie sottostanti, al fine di ridurre l'utilizzo degli immunosoppressori. Infatti, una terapia immunosoppressiva aggressiva o di lunga

durata in corso di aIMHA potrebbe essere controproducente, e dimostrarsi dannosa per il paziente che presenta una malattia infettiva o tumorale.

I protocolli terapeutici immunosoppressivi più efficaci non sono stati, ad oggi, stabiliti, né tantomeno standardizzati. In ambito veterinario, soprattutto, il management terapeutico di questi pazienti è spesso traslato e applicato dalla medicina umana. La somministrazione di dosi immunosoppressive di corticosteroidi è considerata la terapia standard (di prima linea) in corso di IMHA.<sup>7</sup> Molti pazienti possono essere gestiti in modo soddisfacente con la terapia di prima linea; altri, invece, presentano forme immunologiche più aggressive e pericolose per la vita, o gravi eventi avversi indotti dalla terapia cortisonica. In tali casi si può considerare l'introduzione di ulteriori farmaci immunosoppressori, definiti di seconda linea.<sup>7</sup> L'utilizzo di questi farmaci potrebbe permettere sia un migliore controllo della malattia, sia la riduzione del dosaggio di glucocorticoidi. Tra farmaci di seconda linea, numerosi studi retrospettivi hanno suggerito l'utilizzo di azatioprina, micofenolato mofetile (MMF) e ciclosporina.<sup>1,7</sup> Vi è, tuttavia, scarso consenso tra i clinici veterinari sul regime terapeutico ottimale da impiegare (e mantenere) una volta ottenuta la diagnosi di IMHA.<sup>11</sup> Attualmente, ad esempio, non è stato ancora stabilito un chiaro e reale beneficio dell'aggiunta di farmaci immunosoppressivi di seconda linea ad una terapia corticosteroidica standard, né tantomeno è stato delineato un protocollo ottimale che preveda eventualmente l'utilizzo di altri agenti immunosoppressori utilizzati in combinazione con corticosteroidi o in monoterapia. Infine, non vi sono in letteratura degli studi prospettici randomizzati che confrontino diversi regimi terapeutici immunosoppressivi.<sup>11</sup> A tale proposito, nel **capitolo 3** della presente tesi, sono stati riportati i dati relativi ad uno studio prospettico randomizzato finalizzato a comparare l'efficacia di tre diversi protocolli immunosoppressivi in cani con IMHA non associativa. E' stato ipotizzato che i pazienti sottoposti ad un terapia immunosoppressiva combinata (glucocorticoidi+ciclosporina o glucocorticoidi+MMF) potessero mostrare una migliore risposta ematologica rispetto ai pazienti trattati con terapia glucocorticoidea in monoterapia.

La ITP è un'altra malattia ematologica su base immunomediata riscontrata nel cane<sup>12</sup> e, meno frequentemente, nel gatto.<sup>13</sup> Si tratta di una condizione patologica nella quale vengono prodotti anticorpi che si legano alla superficie delle piastrine (e/o ai loro precursori nel midollo osseo) e ne mediano la fagocitosi da parte dei macrofagi. In corso di ITP, la risposta immunitaria può anche essere rivolta verso i precursori piastrinici (megacariociti); in questi casi ci si può trovare di fronte ad una trombocitopenia amegacariocitica (totale assenza dei megacariociti) o un arresto maturativo megacariocitario.<sup>14,15</sup> L'ITP viene classificata in una forma primaria e una secondaria, a seconda dell'assenza o presenza di una potenziale causa scatenante. Il paziente affetto da ITP può presentare, tipicamente, dei sanguinamenti spontanei (petecchie, ecchimosi, ematomi), sia a livello cutaneo, sia mucosale, oltre che segni clinici imputabili all'anemia ed eventuali altre alterazioni associate a comorbidità presenti (febbre, linfadenomegalia).<sup>16</sup>

La diagnosi di ITP è una diagnosi volta ad escludere eventuali altre cause di piastrinopenia. Trombocitopenie molto gravi, in assenza di manifestazioni cliniche suggestive di specifiche malattie e in presenza di parametri coagulativi normali, ci orientano con maggiore decisione verso forme di trombocitopenia immunomediata.<sup>16</sup>

L'immunosoppressione con glucocorticoidi, talvolta in combinazione con agenti immunosoppressivi di seconda linea, rappresenta tradizionalmente il cardine del trattamento dell'ITP primaria nel cane e nel gatto.<sup>1,16</sup> Nel paziente con grave diatesi emorragica, tuttavia, si possono considerare terapie aggiuntive, quali l'utilizzo di vincristina<sup>17</sup> ed immunoglobuline umane.<sup>18</sup> La prognosi generalmente per i pazienti con ITP è buona. Nella maggior parte dei casi si ottiene una conta piastrinica adeguata entro 5-7 giorni dall'inizio della terapia immunosoppressiva, sebbene alcuni pazienti mostrino tempi di recupero prolungati.<sup>13,18</sup> Le percentuali di mortalità riportate in letteratura variano dal 10 al 30%.<sup>12</sup> Nel **capitolo 4** della tesi viene effettuata una revisione della letteratura riguardante il management clinico, le sfide diagnostiche e le nuove frontiere terapeutiche della ITP del cane e del gatto.

La IMP, infine, è la più comune malattia infiammatoria, non infettiva, che colpisce le articolazioni dei cani e dei gatti.<sup>19,20</sup> Si ritiene che il meccanismo patogenetico sia incentrato sulla deposizione di immunocomplessi circolanti a livello sinoviale. Si tratta di una malattia complessa con molteplici possibili eziologie. La forma più comune di IMP è considerata idiopatica (o primaria) e viene diagnosticata escludendo eventuali malattie infettive sottostanti e altri stimoli immunogenici (infiammatori, neoplastici, farmacologici). La IMP idiopatica può, a sua volta, essere distinta in forme non erosive (le manifestazioni più comuni, senza distruzione articolare) e forme erosive (con distruzione articolare, analogamente a quanto avviene nell'uomo in corso di artrite reumatoide).<sup>21</sup>

Solitamente il processo infiammatorio riguarda due o più sedi articolari, con le articolazioni del carpo, del tarso e del ginocchio che risultano maggiormente coinvolte. L'IMP è, inoltre, una delle cause più comuni di febbre di origine sconosciuta nella specie canina. I pazienti affetti presentano frequentemente zoppia, rigidità, dolori articolari, letargia e inappetenza, anche se i segni clinici possono essere subdoli ed intermittenti.<sup>22</sup>

Nel sospetto di una malattia articolare, l'esame citologico del liquido sinoviale, prelevato da più articolazioni e rappresentativo di una flogosi neutrofilica non settica, permette di giungere alla diagnosi di IMP.<sup>20</sup> Il protocollo diagnostico, come in tutte le patologie immunomediatae, non può prescindere dall'esclusione di alcune malattie infettive che, talvolta, possono causare una IMP secondaria (leishmaniosi ed ehrlichiosi nel cane, calicivirosi e micoplasmosi nella specie felina).<sup>22</sup>

La gestione terapeutica dei pazienti con IMP ha lo scopo di migliorare la sintomatologia clinica dei pazienti attraverso l'utilizzo della minima dose di farmaci immunosoppressivi efficace, e prevenire o minimizzare la frequenza di recidive. Anche in questa malattia immunomediata, i corticosteroidi sono i farmaci più utilizzati.<sup>1,23</sup> I farmaci immunosoppressori di seconda linea (ciclosporina, MMF, leflunomide) sono generalmente somministrati in associazione ai glucocorticoidi.<sup>1,23</sup> Purtroppo, allo stato attuale, non è presente molta evidenza scientifica riguardante il loro utilizzo e la loro efficacia (**capitolo 5**). La risposta clinica nei pazienti con IMP è solitamente rapida (90% dei casi) e nella

maggior parte dei soggetti si arriva a sospendere ogni terapia dopo alcune settimane. Altri pazienti, purtroppo, vanno incontro a recidive e necessitano di una terapia immunosoppressiva più prolungata.

## **BIBLIOGRAFIA**

1. Whitley NT, Day MJ. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *J Small Anim Pract.* 2011 Feb;52(2):70-85.
2. Gershwin LJ. Current and Newly Emerging Autoimmune Diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018 Mar;48(2):323-338.
3. Kennedy LJ, Barnes A, Ollier WER, et al. Association of a common DLA class II haplotype with canine primary immune-mediated haemolytic anaemia. *Tissue Antigens* 2006;68, 502– 506.
4. Murphy K, Weaver C. Autoimmune diseases and pathogenetic mechanisms. In: Janeway's immunobiology. 9th edition. Garland Science; 2017, 652-667.
5. Segal Y, Shoenfeld Y. Vaccine-induced autoimmunity: the role of molecular mimicry and immune crossreaction. *Cell Mol Immunol.* 2018;15:586-594.
6. Piek CJ. Canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia: a review with recommendations for future research. *Vet Q* 2011;31(3):129-141.
7. Swann JV, Garden OA, Fellman CL, et al. ACVIM Consensus statement on the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J Vet Intern Med* 2019;33(3):1141-1172.
8. Garden OA, Kidd L, Mexas AM, et al. ACVIM Consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2019;33(2):313-334
9. Kohn B, Weingart C, Eckmann V, Ottenjann M, Leibold W. Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: diagnosis, therapy, and outcome (1998-2004). *J Vet Intern Med.* 2006;20:159-166.
10. Piek C. Immune-Mediated Hemolytic Anemias and Other Regenerative Anemias. In: Ettinger JE, Feldman EC: Textbook of Veterinary Internal Medicine. 8th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders 2015: 2078-2099.

11. Swann JW, Skelly BJ. Systematic review of evidence relating to the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J Vet Intern Med* 2013;27(1):1-9.
12. Putsche JC, Kohn B. Primary immune-mediated thrombocytopenia in 30 dogs (1997-2003). *Journal of American Animal Hospital Association* 2008;44(5): 50-257.
13. Bianco D, Armstrong PJ, Washabau RJ. Presumed primary immune-mediated thrombocytopenia in four cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2008;10(5):495-500.
14. LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia (ITP): pathophysiology update and diagnostic dilemmas. *Veterinary Clinical Pathology* 2019;48:17–28.
15. Cooper SA, Huang AA, Raskin RE et al. Clinical data, clinicopathologic findings and outcome in dogs with amegakaryocytic thrombocytopenia and primary immune-mediated thrombocytopenia. *Journal of Small Animal Practice* 2016;57:142–147.
16. LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia. In: Brooks MB, Harr KE, Seeling DM et al.: Schalm's veterinary hematology, 7th edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2022, pp. 3302-3365.
17. Rozanski EA, Callan MB, Hughes D, et al. Comparison of platelet count recovery with use of vincristine and prednisone or prednisone alone for treatment for severe immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 2002;220(4):477–481.
18. Bianco D, Armstrong PJ, Washabau RJ. A prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled study of human intravenous immunoglobulin for the acute management of presumptive primary immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2009;23(5):1071–1078.
19. Lemetayer J, Taylor S. Inflammatory joint disease in cats: diagnostic approach and treatment. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2014;16:547-562.

20. Dear JD. Swollen Joints and joint Pain. In: Ettinger SJ, Feldman EC, et al.: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 8th ed. Elsevier, St. Louis 2017;15:72-75.
21. Stone M. Immune-mediated Polyarthritides and other Polyarthritides. In: Ettinger SJ, Feldman EC, et al.: Textbook of Veterinary Internal Medicine, 8th ed. Elsevier, St. Louis 2017;203:861-865.
22. Johnson KC, Mackin A. Canine immune-mediated polyarthritides: Part 2: diagnosis and treatment. *Journal of the American Animal Hospital Association* 2012;48:71-82.
23. Kohn B. Immune mediated polyarthritides. *European Journal of Companion Animal Practice* 2007;17:119-124.

## Capitolo 2

---

# SUSPECTED FALSE POSITIVE RESULTS IN POINT OF CARE FELINE LEUKEMIA VIRUS TESTS IN PATIENTS WITH IMMUNE-MEDIATED ANAEMIA

Laura Izquierdo Robert<sup>1</sup>, Jordi Puig<sup>1</sup>, Michele Tumbarello, Montserrat Farigola<sup>2</sup>, Mayank Seth<sup>3 4</sup>,  
Ignacio Mesa<sup>2</sup>, Luis Feo<sup>1</sup>

*Journal of the American Veterinary Medical Association*; under revision (2023)

<sup>1</sup> Ars Veterinaria Hospital, Barcelona (Spain)

<sup>2</sup> Auna Especialidades Veterinarias, Valencia (Spain)

<sup>3</sup> Animal Health Trust, Newmarket, Suffolk (United Kingdom)

<sup>4</sup> Dick White Referrals, Cambridge (United Kingdom)

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie,

Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria,

Bologna

## **Abstract**

**Objective:** To describe conflicting results in point of care (POC) feline leukemia virus (FeLV) tests and pro-virus polymerase chain reaction (PCR) in a population of cats with anaemia of suspected immune-mediated origin (ASIMO), and assess survival in this population.

**Animals:** 20 cats

**Procedures:** Medical records from 5 veterinary institutions were retrospectively reviewed to identify cats with ASIMO, positive result on p27 ELISA POC test and negative results on pro-virus PCR in peripheral blood, in absence of other identified triggers. Follow-up was recorded from diagnosis to the time of writing and survival curves were generated to assess whether treatment influenced in prognosis.

**Results:** 20 cats were enrolled from referral centres of Spain, Italy and United Kingdom. After evaluation, 2 cats were excluded and 18 cats met inclusion criteria. Both peripheral immune-mediated haemolytic anaemia (IMHA) (12/18) and precursor targeted immune-mediated anaemia (PIMA) (6/18) were described. When POC test was rechecked in patients with disease control POC positive results disappeared. 2 cats had a relapse of the ASIMO and the FeLV POC test were positive again. Other signs of FeLV disease did not appear in any of these patients despite immunosuppression. 14 cats (78%) were alive at the moment of writing and the therapeutic approach was not associated with survival.

**Clinical Relevance:** This study describes incongruent FeLV results in cats with ASIMO. It supports the necessity to confirm FeLV POC positive results using additional tools such as pro-virus PCR, as different brand POC tests and external p27 serologies could also be inconsistent.

## Introduction

FeLV is an enveloped RNA retrovirus. Infection usually starts in the oral mucosa and viral replication takes place in the local lymphatic tissue. Primary viremia occurs due to spread of infected lymphocytes and monocytes. When these cells reach the bone marrow, replication in blood precursors starts and a secondary viremia may develop.<sup>1</sup> Most cats are p27 antigen-positive 3 to 6 weeks after FeLV exposure. In cats experimentally exposed to FeLV, p27 antigenemia increased after the second week post-infection and was associated with a progressive disease with higher peripheral virus charge.<sup>1,2</sup>

The cornerstone of control of FeLV is the identification of infected cats. POC FeLV p27 ELISA screening tests are regularly performed in veterinary practice because of its affordable cost, wide availability, good sensitivity and specificity, and rapid results.<sup>3</sup>

Feline retrovirus screening testing is routinely performed in cats with anaemia. In a study involving 8,642 FeLV-infected cats presented to a North America teaching hospital, 11% presented with anaemia.<sup>4</sup> However, only about 10% of FeLV anaemias are regenerative due to the common bone marrow suppression effect of the virus<sup>5</sup> and the evidence that FeLV infection induces IMHA is low.<sup>6</sup>

Conflicting results between POC FeLV and PCR tests had been previously observed.<sup>7,8</sup> Two cats described in 2016 in a large IMHA descriptive study had positive POC FeLV test with a negative pro-virus DNA PCR, however no further investigations were performed.<sup>7</sup> Six cases of suspected false positive results in POC tests and ASIMO have been detected in Spain<sup>8</sup> and since then more patients have been identified in Europe (unpublished data). Therefore, it is mandatory to confirm a positive antigen screening test result with PCR from blood (testing the presence of pro-virus DNA) or saliva (testing the excretion of free viral RNA).<sup>1</sup>

The primary aim of this retrospective study was to describe the clinical findings, diagnosis, treatment and outcome in 20 cats with ASIMO, and a discrepancy between FeLV diagnostic tools at admission, specifically a positive POC FeLV result with a negative PCR test for the detection of FeLV pro-virus.

A second aim was to assess survival and compare it between cats treated with and without a secondary immune-suppressive drug.

## **Materials and methods**

Clinical and clinicopathological data of cats with ASIMO, positive results in POC FeLV tests (SNAP® Combo FeLV/FIV, IDEXX) and negative FeLV PCR results were retrospectively reviewed at referral practices in Spain, Italy and UK between 2018 and 2022. Data collected included signalment, clinical signs, physical examination findings, clinicopathological abnormalities, diagnostic tests, concurrent diseases, specific treatment, treatment response, outcome and survival. Cats were considered to have a regenerative anaemia if the aggregate reticulocytes count on presentation  $\geq 50\text{K}/\mu\text{L}$ .<sup>9</sup>

Inclusion criteria were a diagnosis of anaemia, with confirmed or suspected immune-mediated origin in absence of other identified triggers than p27 results, p27 positive result using a bidirectional flow p27 antigen ELISA POC test (SNAP® Combo FeLV/FIV, IDEXX) and negative results on real time pro-virus PCR (quantitative or qualitative) performed on peripheral blood. Anaemic cats with positive results in POC test and negative results in FeLV PCR without evidence of immune-mediated red blood cell destruction were excluded. Follow-up was recorded for all cats from diagnosis to February 2022.

Cats were divided in three groups: group 1 patients with confirmed diagnosis of IMHA, group 2 patients with evidence supporting IMHA diagnosis and group 3 cats with PIMA. Following ACVIM IMHA consensus<sup>6</sup> to make a firm diagnosis of IMHA (group 1) at least 2 signs of immune-mediated destruction should be present including positivity of saline agglutination test (SAT), direct antiglobulin test (DAT), flow cytometry (FC) or a positive SAT that persists after washing, and at least 1 sign of haemolysis must be detected. Positive results in macroscopic, microscopic or in both evaluations were considered positive SAT. If only one sign of immune-mediated destruction was

present, but haemolysis was evident, tests were supportive of IMHA and cats were classified within the group 2. PIMA (group 3) was diagnosed when RBC precursor's rubriphagocytosis was observed<sup>10</sup> in bone marrow cytology, bone marrow biopsy or spleen cytology,<sup>11</sup> independently of peripheral immune-mediated RBC destruction.<sup>10</sup> While response to immunosuppressive treatment was recorded for all patients, it was not used as an inclusion criterion.

Survival data and curves were generated by the Kaplan–Meier method, and survival plots were compared by use of the log-rank test, to assess differences between cats with and without a secondary immunosuppressive treatment. For this analysis, any cat that died or was euthanized was classified as dead, and any cat it was lost to follow-up was censored. Statistical analyses were performed with SPSS Statistics for Macintosh version 25.0 (IBM) and descriptive statistics were used to report baseline data. P values <0.05 were considered to be significant. Six cases included in this study had been previously presented as an oral presentation at the ECVIM Congress in 2020.<sup>8</sup>

## **Results**

A total of twenty cats were reviewed: eight cats were diagnosed at AniCura Ars Veterinària Hospital (Barcelona, Spain), five cats at the Veterinary Teaching Hospital of the University of Bologna (Italy), four cats at AniCura Glòries Hospital Veterinari (Barcelona, Spain), two cats at AUNA Veterinary Hospital (Valencia, Spain) finally one cat at Dick White Referrals (UK).

Eighteen cats accomplished the inclusion criteria and 2 cats were excluded because lack of evidence of immune-mediated destruction. Both cats excluded showed signs of haemolysis but the immune-mediated causality could not be proven since only SAT without washing was performed. One of the excluded cats died 3 days after the diagnosis and the second one responded favourably to immunosuppressive treatment, being alive 2 years and 6 months after the diagnosis at the time of the writing of the manuscript.

### **Signalment and clinical signs**

Eight cats were male (all neutered) and ten were female (nine neutered and one intact). Sixteen cats were domestic shorthairs, one was a Maine Coon and one was a Balinese crossbreed. Median age at the time of diagnosis was 1 year and 11 months (range 9 months to 13 years). Only one cat had previously been vaccinated against FeLV, vaccination date was not recorded. (Table 1)

Sixteen cats (89%) were presented for lethargy or weakness. Eleven (61%) had hyporexia or anorexia. Three cats showed pica, vomiting or diarrhoea (17%) and two presented weight loss (11%). Other clinical signs detected were abdominal distention, pigmenturia, increased respiratory rate, sneezing and over-licking (one cat each, 6%). (Table 1)

On physical examination, all cats had pale mucous membranes however jaundice was only observed in six patients (33%). Fourteen presented with tachycardia (78%) and 5 tachypnoea (28%). Six cats had hyperthermia (33%) and 3 had hypothermia (17%). Five cats (28%) had a heart murmur and two had a gallop rhythm during auscultation (11%). Hypotension, muscle wasting and mental dullness were each detected in one cat each (6%). (Table 1)

At presentation, nine cats (50%) were receiving medications due to a suspected immune-mediate process associative or non-associative. (Table 1) Six of these nine cats were receiving doxycycline and four of them were also on treatment with steroids. One cat was transfused with packed red blood cells (pRBC) 2 days prior being referred. Other medications previously administered to the patients are reported in Table 1.

**Table 1.** Center, signalment, clinical signs, physical examination findings and previous treatment and FeLV vaccinations of the patients included.

	CENTER	SIGNALMENT	CLINICAL SIGNS	PHYSICAL EXAMINATION FINDINGS	DRUGS, DOSES AND DURATION AT PRESENTATION	FELV VACCINATION STATUS
1	AC Ars	10m, DSH, MN	Apathy and hyporexia	Pale mucous membranes, tachycardia and fever	None	Unvaccinated
2	AC Ars	9y 11m, DSH, FN	Apathy and weakness	Pale mucous membranes, tachypnea, hypothermia and heart murmur	Hydroxyurea 22mg/kg q24h Levatoracetam 80mg/kg q8h Gabapentine 10,9mg/kg q8h Phenobarbital 2,7mg/kg q12h	Unvaccinated
3	AC Ars	1y 3m, DSH, FE	Apathy, weakness, sneezing and overlicking	Pale mucous membranes, tachycardia and hypothermia	Doxycycline 11mg/kg q24h	Unvaccinated
4	AC Ars	1y 9m, DSH, FN	Apathy, anorexia and overlicking	Pale and icteric mucous membranes, tachycardia, hypothermia and heart murmur	None	Unvaccinated
5	AC Ars	1y 5m, DSH, FN	Apathy and hyporexia	Pale and icteric mucous membranes, tachycardia, tachypnea and hyperthermia	None	Unvaccinated
6	AC Ars	8y7m, DSH, FN	Weakness and hyporexia	Pale mucous membranes, tachycardia, tachypnea, hyperthermia and mental dullness	None	Unvaccinated
7	Unibo	9m, DSH, MN	Apathy, anorexia and lose weight	Pale and icteric mucous membranes, heart murmur, tachycardia	Maropitant 1mg/kg q24	Unvaccinated
8	Unibo	1y3m, DSH, MN	Apathy, anorexia	Pale and icteric mucous membranes, heart murmur, hypotension	For 14 days: Prednisolone 1 mg/kg q12, doxycycline 10 mg/kg q24, cyclophosphamide 3 mg/kg q24; 1 unit whole blood.	Unvaccinated
9	Unibo	5y, DSH, FN	Apathy, hyporexia	Pale mucous membranes, heart murmur, tachycardia, fever	Acupuncture, laser-therapy and cannabis for buccal eosinophilic ulcers	Unvaccinated
10	Unibo	2y 11m, DSH, MN	Apathy, anorexia	Pale mucous membranes	Prednisolone 1 mg/kg q24 , and doxycycline 10 mg/kg q 24	Unvaccinated
11	Evidencia Auna	4y, Maine Coon, FN	Apathy, anorexia, pica and diarrhea	Pale mucous membranes, tachycardia and tachypnea	None	Unvaccinated
12	Evidencia Auna	5y, DSH, MN	Apathy and hyporexia	Pale mucous membranes and tachycardia	None	Unvaccinated
13	DWR	2y 3m, Balinese cross breed, FN	Lethargy and increased resp rate	Moderate muscle wasting, tachycardia, pale MMs	Doxycycline 10mg/kg q24	Vaccinated
14	AC Ars	10m, DSH, FN	Weight loss and apathy	Pale MM, incomplete physical examination	Doxycycline 10mg/kg q24h + prednisolone (dose unknown)	Unvaccinated
15	AC Ars	1y 7m, DSH, MN	Abdominal distention	Pale mucous membranes, tachypnea, tachycardia and hyperthermia	Doxycycline 10mg/kg/q24h and prednisolone 2mg/kg/q24h	Unvaccinated
16	AC Glòries	2y, DSH, FN	Pigmenturia	Pale mucous membranes, tachycardia and fever	None	Unvaccinated
17	AC Glòries	12y 9m, DSH, MN	Apathy	Pale mucous membranes, tachycardia and gallop rhythm	None	Unvaccinated
18	AC Glòries	1y, DSH, MN	Apathy and anorexy	Pale mucous membranes, tachycardia and gallop rhythm	None	Unvaccinated

m = months, y = years, DSH = Domestic Short Hair, MN = Male Neutered, FN = Female Neutered, FE = Female Entire

## Diagnosis

Complete blood count and serum biochemistry were available for all cats. Median haematocrit at presentation was 9.00% (range 3.70 – 18.80%). Reticulocyte count was available in 17/18 cats, with a median of 35.00 K/ $\mu$ L (range 0.20 – 356.00), and only 5 cats (28%) had a regenerative anaemia at diagnosis. The median automated platelet count was 81.50 K/ $\mu$ L (range 35.50 – 243.00) and genuine thrombocytopenia (platelets <120 K/ $\mu$ L without clumps in the blood smear) was present in 9 cats (50%). Median serum total protein concentration was 7.76 g/dL (range 6.20 – 10.70) and median serum globulin concentration was 4.60 g/dL (range 2.80 – 7.80). Hyperglobulinemia ( $\geq$ 5 g/dL) was present in 5 patients (28%). Hyperbilirubinemia (bilirubin  $\geq$ 0.6mg/dL) was present in 12 cats (67%). Six cats (33%) had a mild to moderate elevation of Alanine Aminotransferase (ALT) (<10 times the upper reference range). (Table 2)

Blood smear evaluation was performed in all the patients. Ghost cells were present in 11 (61%) of the cats. (Table 2) Thirteen (72%) of the cats had anisocytosis. Polychromatophils or RBC precursors were present in 10 cats (56%), however 7 of these patients did not show reticulocytosis on the CBC.

SAT was performed in 17 patients. The dilution protocol performed for each laboratory was not routinely recorded for all the patients, however 11 of 17 had a 4:1 saline to blood ratio. Positive SAT was present in 12/17 cats (70%), 7 had positive results in both evaluation, 2 showed macroscopic agglutination that was not microscopically evident and 3 had microscopic agglutination only. The remaining 5 cats (30%) did not show agglutination, with 2 of these receiving steroid therapy at the time of the evaluation. Coomb's test was only performed in one cat with positive results. (Table 2)

*Mycoplasma candidatus haemophilus* and *Mycoplasma haemofelis* PCR was performed in 15 cats (83%) and 7 of them were also tested for *M. c. turiscensis* specie. All results were negative, but 3 cats were already on treatment with doxycycline when tested. Six cats (33%) had bone marrow sampling. Five had erythroid hyperplasia and 1 had erythroid hypoplasia. Five cats had evidence of hemophagocytosis and rubriphagocytosis. (Table 2)

Abdominal ultrasound was performed in all patients. Splenomegaly was detected in 16 cats (89%), hepatomegaly in 6 (33%) and mesenteric lymphadenopathy in 7 (39%). One cat presented minimal tricavitary effusion. Eleven patients (61%) had ultrasound (US) guided spleen cytology and the most common findings were extramedullary haematopoiesis (73%), reactive spleen (82%), haemophagocytosis (30%) and rubriphagocytosis (10%) (Table 2).

Patients were classified as follows: 1 cat had a confirmed IMHA diagnosis (6% group 1), 11 cats had a supportive diagnosis of IMHA (61% group 2) and 6 cats were classified with PIMA (33% group 3). (Table 3)

SNAP® Combo FeLV/FIV test was performed in all cats with positive results. In addition, two cats (11%) had positive results in another POC FeLV test based on immunochromatography (IC) (Uranotest FeLV-FIV®, Urano). External laboratory serology was performed in 2 cats. One cat showed positive results using ELISA and the second one had a negative result using IC. (Table 4) All cats were simultaneously tested for Feline Immunodeficiency Virus (FIV) antibodies and all were negative.

Pro-virus real time FeLV PCR of the whole blood was performed in all patients after initial POC test. (Table 4) Seven PCRs were quantitative and eleven were qualitative. One patient was also tested for pro-virus real time FeLV PCR of the bone marrow with negative results. In 9 patients (50%) a second SNAP® Combo FeLV/FIV test was performed after remission of the clinical signs and normalization of the red blood cell count. (Table 4) All follow-up POC tests had negative results. Median time to perform the second test was 42 days after diagnosis (range 17 – 159). One cat had serial POC tests performed during the hospitalization period. Positive results became less clear after starting immunosuppressive treatment (Figure 1). Finally, two patients that had negative follow-up POC test, showed an IMHA relapse 6 and 9 months after the diagnosis and the FeLV POC tests were positive again. Pro-virus PCRs were not repeated at that time.

**Table 2.** Major abnormalities detected in diagnosis test performed in anaemic cats.

	CBC				Blood smear		Coombs Test	Saline agglutination test		Biochem				Bone marrow		Mycoplasma	Other relevant findings
	HTC (%)	Retic (K/ $\mu$ L)	WBC (K/ $\mu$ L)	PLT (K/ $\mu$ L)	Performed	Ghost RBC	Performed / Results	Performed	Macro/Micro	TS (g/dL)	Glob (g/dL)	Bil (mg/dL)	Other alterations	Performed	Diagnosis	Performed	Imaging, cytologies, UA, etc
1	11.2	121	12	243	Yes	Yes	No	Yes	neg / neg	7.9	4.7	0.8	Phos 8.4 mg/dL (3.1 – 7.5)	No		H/C	US: Esplenomegaly and abdominal lymphadenomegaly, Spleen cytologies: eritrophagia, severe extramedular erythropoiesis, reactive spleen
2	6.4	35	6	42	Yes	Yes	No	Yes	pos / pos	6.2	4.5	0.2	Glu 25 mg/dL (74 -159)	No		H/C	US: Esplenomegaly and minimal tricavitary effusion, Negative leishmania serology
3	3.7	0	6.65	60	Yes	No	No	Yes	pos / pos	6.4	4,6	0.5		No		No	
4	8.8	3.6	15.8	87	Yes	No	No	Yes	pos / pos	6.6	3.6	2.7	K 3 mmol/L (3.5 – 5.8), BUN 42 mg/dL (16 - 36)	No		H/C	
5	10.2	15.6	11.16	117	Yes	Yes	No	Yes	pos / pos	8.6	5.7	3,6	None	No		H/C	US: Esplenomegaly and mild enlargement of hepatic limphnodes
6	10.3	8.5	27.8	118	Yes	Yes	No	Yes	pos / pos	7.4	4.1	0.64	Total calcium: 11.6 mg/dL (7.8 – 11.3) / ionised calcium 1.38 mmol/L (113 – 1.38)	No		H/C	US: Esplenomegaly
7	6.6	87	12.2	87	Yes	Yes	No	Yes	neg / pos	6.3	3.15	1.1	ALT 172 U/L (20 – 72), AST 139 U/L (9 – 40), CK 596 U/L (91 – 326), LDH 318 IU/L (63 – 193), Urea 103 mg/dL (30 - 65) Iron 280 $\mu$ g/dL (68 – 215)	Yes	Erythroid hyperplasia	H/C/T	Hepato/splenomegaly, "honey comb" spleen, abdominal lymphadenomegaly and digiunal enteropaty
8	5.2	NA	20.2	58	Yes	No	No	Yes	neg / neg	6.5	2.8	0,9	ALT 1871 U/L (20 – 72), AST 654 U/L (9 – 40), CK 490 U/L (91 – 326), LDH 807 IU/L (63 – 193), Iron 310 $\mu$ g/dL (68 – 215), SAA 12 $\mu$ g/dL (0 – 5)	Yes	Erythroid hypoplasia		Hepato/splenomegaly, abdominal lymphadenomegaly and digiunal enteropaty. Spleen cytologies: extramedular erythropoiesis; Hepatic cytology: moiderate degeneration with Histiocytic cells

9	8.8	13.5	4.7	55	Yes	No	No	Yes	neg / neg	8.2	5	0.3	LDH 279 (63-193), iron 313 µg/dL (68 – 215)	Yes	Erythroid hyperplasia and moderate erythrophagocytosis	H/C/T	Splenomegaly, digital enteropathy. Spleen Cytology: reactive and mild erythrophagocytosis; hepatic cytology: moderate degeneration and mild erythrophagocytosis
10	12.2	339.6	18.4	76	Yes	No	No	Yes	neg / pos	7.4	4.1	1.6	ALT 1401 U/L(20 - 72); AST 480 U/L (9 – 40), CK 3910 U/L (91 – 326), LDH 3467 IU/L (63 – 193), Magn 3.26 mg/dL (1.9 – 2.8), Trigl 140mg/dL (10 – 100), Iron 400 µg/dL (68 – 215), SAA 67 µg/dL (0 – 5)	No		No	US: Hepato/splenomegaly and abdominal lymphadenomegaly; Spleen cytology: moderate extramedullary erythropoiesis; hepatic cytology: mild degeneration; biliar cytology: normal
11	7.2	3.4	7	84	Yes	Yes	Yes / positive	Yes	pos / pos	8	5.2	0.6	None	No		H/C/T	US: Esplenomegaly, hypochoic liver. Spleen cytologies: reactive lymphoid hyperplasia and extramedullary hematopoiesis
12	9.5	356	11.54	199	Yes	Yes	No	Yes	pos / pos	8	4.8	3.2	ALT 104 U/L (10-60)	No		H/C/T	US:heterogeneous spleen and liver, lymphadenomegaly; Spleen cytologies: reactive lymphoid hyperplasia and extramedullary hematopoiesis
13	16	39.5	9.9	79	Yes	No	No	No		10.5	7.7	0.29	ALT 119 IU/L (10-60)	Yes	Erythroid hyperplasia with evidence of immune destruction at the level of the polychromatophils, left shifted myeloid lineage, consistent with peripheral demand, and mild dysplasia and mild plasma cell hyperplasia.	H/C/T	Thoracic Radiographs identified splenomegaly and borderline cardiomegaly. Abdominal Ultrasound identified a mottled enlarged spleen, mild enlargement of the mesenteric lymph nodes and some changes to the appearance of the caecal wall. Spleen cytology was consistent with reactive lymphoid hiperplasia
14	9.2	9.4	11.98	75	Yes (10 days after cRBC transfusion)	Yes	No	Yes	neg / neg	6.9	3.8	0.5	Lymphocytes 9.51 K/µL (0.4 - 6.8) and glu 195 mg/dL (74 – 159)	Yes		H/C/T	

15	18.8	53	5.9	100	1	Yes	No	Yes	neg / pos	7.9	4.9	0.8	None	No		H/C/T	US: esplenomegaly and lymphadenomegaly Spleen cytology: reactive spleen, moderate extramedullary erythropoiesis
16	7.3	256.2	17.88	57	Yes	No	No	Yes	pos / neg	10.7	7.8	1.1	ALT 270 U/L (12-130)	No		H/C	US: hepatosplenomegaly. Cytologies: Spleen: moderate to marked reactive lymphoid hyperplasia and extramedullary hematopoiesis. Liver: moderate non-lipid vacuolar degeneration, neutrophilic and lymphoplasmacytic inflammation and extramedullary hematopoiesis. UA: confirmed pigmenturia: compatible with bilirubinuria +/- hemoglobinuria
17	10	57.9	9	150	Yes	Yes	No	Yes	neg / neg	9.6	5.6	1.3	None	Yes	Noneffective erythroid hyperplasia with moderate dyserythropoiesis and evidence of immune-mediated destruction of precursors	H/C	US: Esplenomegaly. Spleen cytologies: reactive lymphoid hyperplasia, moderate extramedullary hematopoiesis, and increased hemophagocytic activity.
18	5.8	4.4	7.33	67	Yes	Yes	No	Yes	pos / neg	6.6	3.6	0.2	None	No		H/C	US: Esplenomegaly

CBC = Complete Blood Count, HTC = Haematocrite, Retic = Reticulocytes, WBC = White Blood Cells, PLT = Platelets, RBC = Red Blood Cells, cRBC = completed Red Blood Cells, TS = Total Solids, Glob = Globulines, Bil = Bilirrubine, UA = Urinary Analysis, H = Mycoplasma haemofelis, C = Candidatus Mycoplasma haemominutum, T = Candidatus Mycoplasma turicensis, neg = negative, pos = positive, Phos = Phosphorus, Glu = Glucose, K = potassium, BUN = Blood Urea Nitrogen, US = UltraSound, ALT = Alanine Aminotransferase, AST = Aspartate Aminotransferase, CK = Creatine Kinase, LDH = Lactate DesHydrogenase, SAA = Serum Amiloid A, Trigl = Triglycerids, NA = Non Available

**Table 3.** Evidence of precursor erythrophagocytosis, immune-mediated destruction and hemolysis of each patient.

Patients	DIAGNOSIS	TREATMENT	FOLLOW-UP (days)
1	3 – PIMA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w, on dose reduction for 4 months Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w Vitamin C (dose not registered)	1076
2	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/1 year Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w Cyclosporine 5,4mg/kg/q24h/44w Chlorambucil 6mg/m2/q48h/4w Mofetil mycophenolate 10mg/kg/q12h/4w Levataracetam 80mg/kg/q8h Gabapentine 10,9mg/kg/q8h Phenobarbital 2,7mg/kg/q12h	398 •
3	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h 4w, on dose reduction for 4 months Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	941
4	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w, on dose reduction for 2 months Doxycycline 10mg/kg/q24h 21 days	1098
5	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w Cyclosporine 5mg/kg/q12h	31 •
6	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	14 •
7	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/6w, on dose reduction for 5 months Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	282
8	3 – PIMA	Prednisolone 1 mg/kg/q24h/6w, on dose reduction for 5 months Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	237
9	3 – PIMA	Prednisolone 2mg/kg/6w, on dose reduction for 5 months Cyclosporine 5mg/kg/q12h Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	220
10	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w, on dose reduction at the moment of writing Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w Marbofloxacin 3mg/kg/q24h/3w	164
11	1 -Diagnosis IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w, on dose reduction for 4 months, Doxycycline 10mg/kg/q24h/4w	285
12	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w, on dose reduction at the moment of writing Doxycycline 10mg/kg/q24h/4w Mycophenolate mofetil 10mg/kg/q12h Clopidogrel 3 mg/kg/q24h	122
13	3 – PIMA	Prednisolone 3.3mg/kg/q24h/5w on dose reduction at the moment of writing Doxycycline 10mg/kg/q24h while mycoplasma pending.	172
14	3 – PIMA	Prednisolone 2mg/kg/q24h Doxycycline 10mg/kg/q24h/4w Cyclosporine 5mg/kg/q12h	34
15	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 1 mg/kg/q24h Doxycycline 10mg/kg/q24/3w	21
16	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w on dose reduction at the moment of writing Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	68
17	3 – PIMA	Prednisolone 2mg/kg/q24h Mycophenolate mofetil 10mg/kg/q12h Doxycycline 10mg/kg/q24h	19 •
18	2 - Supportive of IMHA	Prednisolone 2mg/kg/q24h/4w, on dose reduction at the moment of writing Doxycycline 10mg/kg/q24h/3w	53

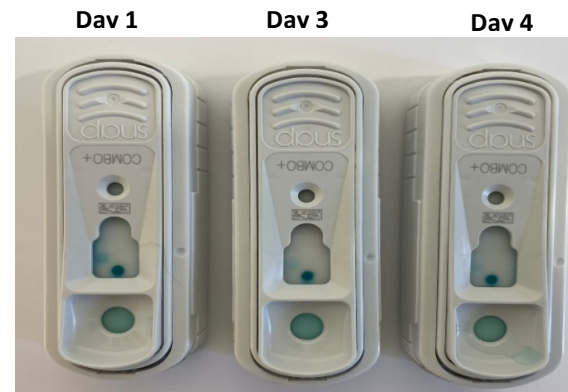
PIMA = Precursor Immune-Mediated Anaemia, IMHA = Immune Mediated Haemolytic Anaemia, w = week

**Table 4.** FeLV diagnosis test performed in each patient.

DIAGNOSIS PoC FeLV		Negative Pro-virus FeLV PCR		Additional FeLV test				FeLV follow up					
	Laboratory / Technique / Result	Days from PoC to PCR	Laboratory	Quantitative or qualitative	Test Type	Laboratory	Technique	Result	Performed	Days from initial to control PoC	Laboratory	Technique	Result
1	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	IDEXX	Qualitative	PoC	UranoVet	IC	Positive	Yes, twice	42 868	IDEXX	PoC ELISA	Negative
2	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	3	IDEXX	Qualitative					No				
3	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	IDEXX	Qualitative					No				
4	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	12	IDEXX	Qualitative					No				
5	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	IDEXX	Qualitative	External p27 serology (ELISA)	IDEXX	ELISA	Positive	No				
6	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	0	IDEXX	Qualitative					No				
7	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	49	Unibo	Quantitative					Yes	49	IDEXX	PoC ELISA	Negative
8	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	Unibo	Quantitative					Yes	50	IDEXX	PoC ELISA	Negative
9	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	Unibo	Quantitative					Yes	40	IDEXX	PoC ELISA	Negative
10	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	0	Unibo	Quantitative					Yes	75	IDEXX	PoC ELISA	Negative
11	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	IDEXX	Qualitative					Yes	159	IDEXX	PoC ELISA	Negative
12	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	75	Exopol	Quantitative					Yes	33	IDEXX	PoC ELISA	Negative

13	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	0	VPG Exeter	Quantitative					No				
14	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	3	IDEXX	Quantitative	Bone marrow PCR	IDEXX	Quantitative pro-virus PCR	Negative	Yes	3	IDEXX	PoC ELISA	Negative
15	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	3	Laborti	Qualitative	PoC test /// p27 serology	URANO /// Laborti	IC /// IC	Positive /// Negative	No				
16	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	0	IDEXX	Qualitative					No				
17	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	IDEXX	Qualitative					Yes	17	IDEXX	PoC ELISA	Negative
18	SNAP® IDEXX / PoC ELISA / Positive	1	IDEXX	Qualitative					No				

PoC = Point of Care, PCR = Polymerase Chain Reaction, IC = ImmunoChromatography, ELISA = Enzyme Like ImmunoSorbent Assay, FeLV = Feline Leukemia Virus



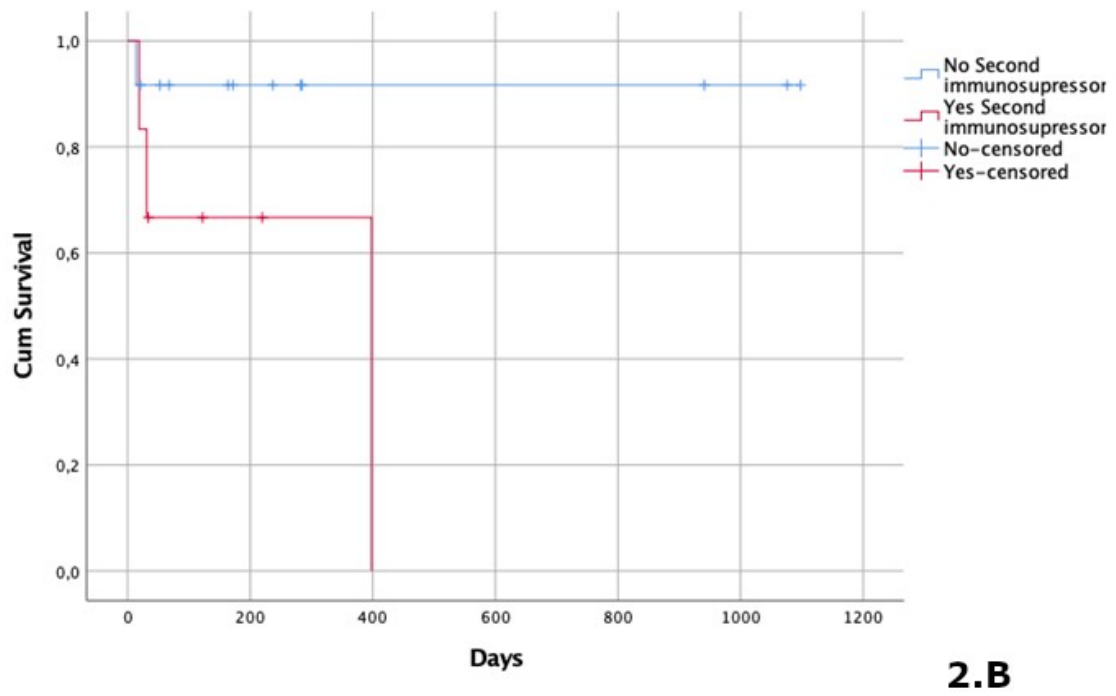
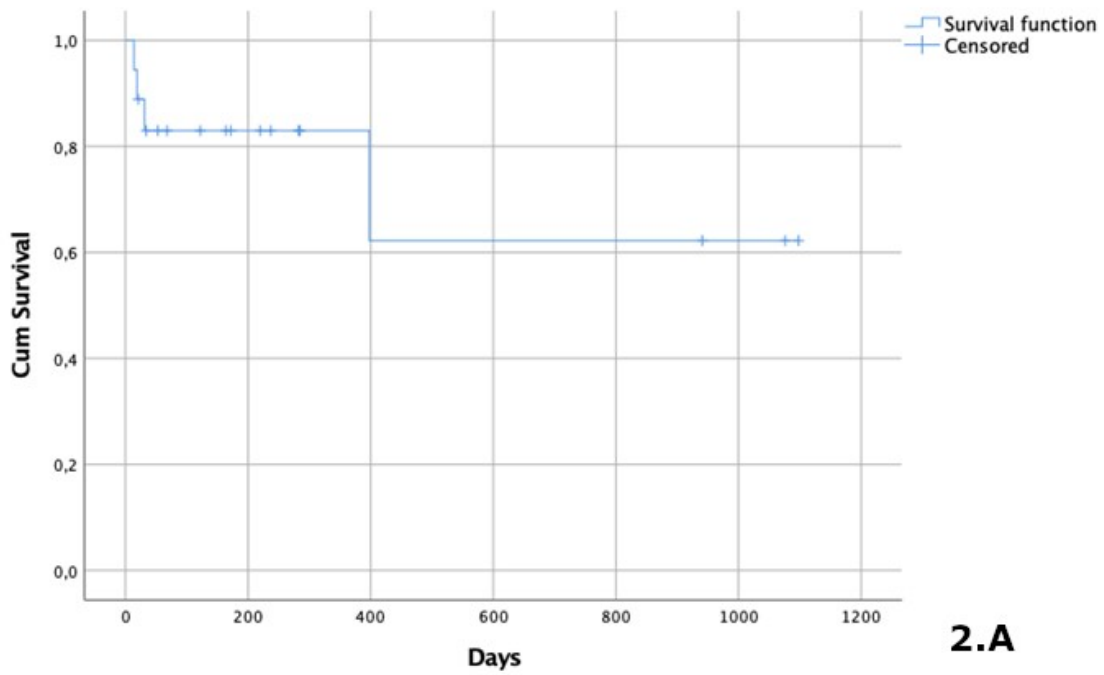
**Figure 1.** POC tests performed serially with serum left-overs during the hospitalization of patient 14. From top to bottom, first day to last day of hospitalization were recorded. Seropositive results were less clear after starting immunosuppression treatment.

## **Treatment**

All patients were treated with prednisolone upon diagnosis. Doses were adjusted at clinician's discretion. Median initial dose was 2mg/kg/daily (range 1 – 3) and this initial dose was maintained a median of 1 month (range 0.5 – 12) before initiating the dose reduction. All patients were treated with 10 mg/kg per day of doxycycline during a median of 3 weeks (range 2 – 4). Six cats (33%) were treated with a second immunosuppressive drug (cyclosporine in 4 cases and mycophenolate mofetil (MMF) in 2). One patient was switched from cyclosporine to MMF, and one month later to chlorambucil. Eighty-eight percent of the patients received a pRBC transfusion. Additional treatments administered at veterinary discretion were marbofloxacin (3/18, 17%), clopidogrel (1/18, 6%) and vitamin C (1/18, 6%). (Table 3)

## **Survival**

Follow-up was available for all the cats, median follow-up recorded was 168 days (range 14 – 1098) (Table 3), and none of them showed signs of FeLV progressive disease. Mean survival time was estimated to be 769 days, (Figure 2.A) median survival time was not reached since the majority of cats were censored because they were still alive at the time of analysis and had good response to treatment, not because they had died or follow-up was loss. Fourteen cats were alive at the moment of writing this article (78%), while four died or were euthanized due to the persisting or worsening of the anaemia (22%). Twelve cats had a follow-up longer than 2 months, the other 6 died before (3/6) or had a shorter follow-up (3/6). Of these 12 cats, only one died after due to refractory IMHA and the rest of them were alive at the moment of writing this article (11/12 (93%)). Log-rank comparison was made between cats treated with a second immunosuppressive drug and cats treated with prednisolone alone the results were also not significant ( $p=0.062$ ). (Figure 2)



**Figure 2.** Kaplan–Meier survival curve the whole cats (2.A). Comparison KM survival curves for cats treated with steroids (blue line) or with steroids + a second immunosuppression (red line) (2.B).

## Discussion

The feline population described in this article showed severe anaemia, evidence of immune-mediated process and discordant results between POC p27 ELISA and real time pro-virus PCR in peripheral blood. This situation has previously been reported in two cats with IMHA <sup>7</sup> and in 6 patients included in this study.<sup>8</sup>

In our population, diagnosis of PIMA, IMHA or supportive diagnosis of IMHA was achieved in 18 of 20 cats. Two patients showed signs of haemolysis but the immune-mediated origin could not be confirmed, however SAT was the unique test performed to prove it. It is possible that further investigations (DAT, FC, SAT after washing or bone marrow) could have supported an immune-mediated aetiology in these two discarded cases.

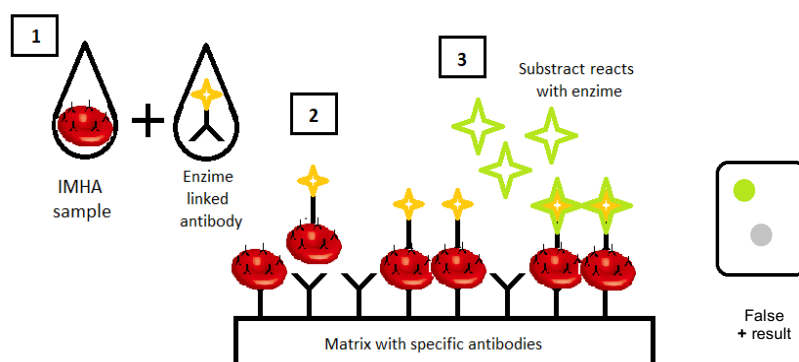
In regards to FeLV diagnosis, recent studies showed that the test used in this study (SNAP® Combo FeLV/FIV test) had a positive predicting value (PPV) and negative predictive value (NPV) of 100% in populations with 1, 5 and 10% of FeLV prevalence.<sup>3</sup> The 2020 American Association of Feline Practitioners (AAFP) retrovirus guidelines <sup>12</sup> recommend confirming positive POC results with a micro well plate ELISA for p27 antigen or PCR detecting FeLV pro-virus. Alternatively, a POC p27 antigen test of a different brand can be used. However, our study found equivocal results in micro well plate external ELISA and different brand POC tests. (Table 3) Therefore, we further emphasise that any anaemic cat with positive screening results should always be confirmed by the presence of pro-virus FeLV DNA in whole blood.<sup>1,13</sup> This is particularly relevant if FeLV prevalence or exposure risk is low, since lower prevalence decreases the positive predictive value (PPV) of the result making increase the rate of false-positive test results<sup>1</sup> and according to last pan-European study, FeLV prevalence in cats' population was 0.7% in UK, 2.6% in Spain and 5.7% in Italy.<sup>14</sup>

Based on the results observed in this study two main explanations are possible. The first group of explanations encompasses different possibilities of real false positive results in the POC antigen test. The second one, true FeLV infections without virus DNA detection.

## 1. False positive results in p27 POC FeLV tests:

### 1.1. Cross reaction between an unknown molecule and the POC test:

We had previously hypothesised <sup>8</sup> cross-reaction between antibodies present in feline serum targeting unknown epitopes (against RBC, their precursors and/or platelets) with either anti-p27 antibodies, reactants of the matrix or the conjugate of the POC tests. (Figure 3) Due to the progressive seronegativization of all the patients tested during and after immune-suppression, (Figure 1) our main theory is that a protein mimicking p27 is related with the immune-mediated destruction of RBC in these patients.



**Figure 3.** Hypothesised cross-reaction between pathologic molecules and matrix, p27 reactant or the substrate of the POC test.

The tests performed in the 2 cats described by Swann and colleagues were based on IC. This is meaningful because 2 of our patients also have positive results in tests based on IC made in their referral veterinary practice. (Table 4) This information highlights that both techniques (IC and ELISA), are able to detect p-27 antigen or p27-like products, even when performed by different laboratories.

We cannot exclude that agglutination caused an interference with the POC test. Agglutination is a complex process mostly generated by IgM, IgG and complement deposit over the membrane of RBC.

It is detected in 70% of our patients by SAT and its interaction with the test it is not excluded by the manufacturing laboratory.<sup>15</sup>

### *1.2. Endogenous p27 expression:*

Another theory that could explain the presence of p27 antigen in cats with immune-mediated anaemia is related to the presence of retrovirus genetic material in the DNA of domestic cats. Retrovirus genetic material is an important part of the genome of the cats, as in most of the mammals. These integrated fractions are called endogenous retroviruses (ERV). Usually, when ERV are transcribed, non-infectious viral particles are produced.<sup>16</sup> However, ERV had shown different functions in the mammals: they have capacity to produce infectious viruses; ability of recombination with other retroviruses (such as FeLV B or C subtype),<sup>5</sup> and functions as host antiviral factors.<sup>16</sup> This makes possible that in some point, endogenous p27 protein was transcribed or recombined startling or supporting the autoimmune disease.

From a diagnostic point of view, it is important that FeLV diagnostic tests can discriminate exogenous FeLV molecules from endogenous FeLV-like products.<sup>1</sup> Consequently, p27 was chosen as a diagnostic tool because it has not been detected as an endogenous product, and cats are immunologically tolerant to p27 (they do not appear to immunologically respond to the protein and p27 remains in the blood). However, p27 precursor gene (Gag gene) is part of the ERV<sup>17</sup> and p27 endogenous production has been alleged as one of the main explanations to cat's immunological tolerance to this protein,<sup>17</sup> making this replication conceivable.

To sum up, several ERV have been identified in mammals and it is unclear whether they remain inactive or could emerge as a future infection.<sup>1,18,19</sup> The presence of FeLV Gag gene in cats' genome makes plausible the transcription of endogenous p27 protein, which could be another source of false positive results in the POC p27 test, however, this has not been detected before.

### 1.3. *Sample type interaction:*

Finally, it is known that sample origin (whole blood, serum, plasma, saliva, etc) may interact with POC test results.<sup>20</sup> Most of the test should be performed with serum or plasma, since whole blood in colloidal assays has led to higher rates of false-positive results.<sup>20</sup> This was particularly relevant when the sample is haemolysed and the test-line is red.<sup>20</sup> In our case, due to the retrospective nature of the study, the type of sample used to perform the test was not consistently recorded in all centres, however at least 12/18 (66%) of the diagnosis tests were performed using serum. Nevertheless, the technology used in all SNAP® assays<sup>15</sup> has a wash step where the buffer removes unbound debris and conjugate from the matrix. That produces a clean background and the blue-coloured positive results can be easily interpreted<sup>15</sup> therefore this interaction seems less probable. Bilirubinaemia presents in haemolytic process have been also considered, although they do not seem to interact with the SNAP® Combo FeLV/FIV.<sup>15</sup>

## 2. **Real FeLV antigenemia without the detection of virus DNA**

### 2.1. *False negative results in pro-virus PCR*

Pro-virus PCR was performed in all patients in five different laboratories,<sup>7</sup> patients had quantitative PCRs (qPCR) and 11 had qualitative results, for the reason that quantitative evaluation became more commercially available during the study period. Quantitative PCRs are preferred since the amount of pro-virus DNA present in the blood of infected cats is higher in patients with progressive disease<sup>21</sup> and it is more difficult to miss patients below the cut-off value of the qualitative test. All the cats studied had negative results which were interpreted as patients free of disease.<sup>1</sup> However, it is interesting to note that in a study performed by IDEXX® laboratory to correlate the pro-virus load with the presence of p27 antigen in blood using quantitative ELISA, 24 of the 353 feline samples (7%) had FeLV pro-virus DNA below the limit of quantification but p27 antigen was detected.<sup>22</sup> Clinicopathological data and evolution of these cats is not available.<sup>22</sup>

## 2.2. *Antigemia during primary viremia:*

An alternative explanation of these results is the detection of p27 during the primary viremia. p27 is a structural protein present in the virus membrane and theoretically it could be detected since the virus enters to the blood. However, negligible amounts of p27 are detected in this primary phase and in experimental studies p27 blood concentration increases 2 weeks post-infection,<sup>2</sup> that coincides with the time that usually takes a cat with non-abortive disease to become FeLV pro-virus positive.<sup>1</sup>

## 2.3. *Atypical FeLV presentation:*

Atypical FeLV presentation was also debated. Diagnosis of atypical FeLV infection is confirmed by pro-virus positive results in the infected tissue. However, when whole blood tests are performed, inconsistent results in p27, virus and pro-virus PCRs are observed. FeLV antibodies are positive and FeLV RNA could be present. Focal or atypical FeLV infections are rare cases, uncommonly associated with systemic clinical signs and that do not show response to immunosuppressive therapy. Most of the cats with “atypical” presentation were classified before 2000, when laboratory viral detection techniques were under development and the transport and storage of the samples had shown to lead to false-negative results.<sup>23,24</sup> This clinical outcome is currently uncommon and it was not considered a presentation option according to the last AAFP retrovirus guidelines.<sup>14</sup> In our cases, atypical FeLV infection is considered unlikely and false positive POC antigen results are suspected. Nevertheless, negative results in FeLV antibodies, viral RNA PCR and post mortem studies, could had helped to clarify this hypothesis.

All the theories exposed above need from further investigations to clarify the underlying mechanism. However, until more clarity is achieved, positive results using POC FeLV diagnosis test should be taken with cautious until molecular confirmation is completed.

In regards of the second aim of the study, at the moment of writing this article 78% of the patients were alive and estimated mean survival time was 769 days. Previous studies in cats with immune-

mediated anaemia showed a median survival time around 1,5 years with 60% of the patients surviving more than 6 months.<sup>10,25</sup> Treatment was administered at clinician's discretion, but all patients received prednisolone and doxycycline. Twelve patients did not received additional immunosuppressive treatment, in eleven of them the disease was controlled and one patient died before adding a second immunosuppressive drug. Six cats received an additional immunosuppressive drug and 3 of them died due to non-responsive disease despite the treatment. Prognosis for these patients was not statistically worse ( $p=0.062$ ), however these results should be cautiously considered because of the small population studied. (Figure 2)

The main limitation of this study, as with most of the retrospective studies, is the inconsistency diagnosis and management of each case. Better description, classification and diagnosis could have been done if an ordered approach was made. Moreover, FeLV antibodies and RNA could have helped to completely rule out atypical FeLV infection. A control group (either with FeLV infected patients with anaemia or with immune-mediated disease without FeLV) was not performed due to the heterogeneity of the described population, making more difficult to draw solid assumptions.

In conclusion, this study showed inconsistent results between FeLV POC and pro-virus PCR in cats with ASIMO. These results confirmed the necessity of confirming positive POC FeLV tests using further essays like pro-virus PCR, especially if a haemolytic or immune-mediated process is suspected.

## **Bibliography**

1. Hofmann-Lehmann, R., & Hartmann, K. Feline leukaemia virus infection: A practical approach to diagnosis. *J Feline Med Surg* 2020;22:831–846.
2. Cattori, V., Tandon, R., Riond, B., Pepin, A. C., Lutz, H., & Hofmann-Lehmann, R. The kinetics of feline leukaemia virus shedding in experimentally infected cats are associated with infection outcome. *Vet Microbiology* 2009;133:292–296.
3. Levy, J. K., Crawford, P. C., & Tucker, S. J. Performance of 4 Point-of-Care Screening Tests for Feline Leukemia Virus and Feline Immunodeficiency Virus. *J Vet Intern Med* 2017;31:521–526.
4. Cotter, S.M. Management of healthy feline leukemia virus-positive cats. *J Am Vet Med Assoc* 1991;199:1470-1473.
5. Hartmann, K. Clinical aspects of feline retroviruses: A review. *Viruses* 2012; 4:2684–2710.
6. Garden, O. A., Kidd, L., Mexas, A. M., et al. ACVIM consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2019;33:313–334.
7. Swann, J. W., Szladovits, B., & Glanemann, B. Demographic Characteristics, Survival and Prognostic Factors for Mortality in Cats with Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med* 2016;30:147–156.
8. L. Izquierdo Robert, L. J. Feo Bernabé, M. Seth, J. Puig Prat. Feline leukemia virus false positive results using an in-house test in cats with immune-mediated hemolytic anemia. Research communications of the 30th ECVIM-CA online congress. *J Vet Intern Med* 2020, 17;34:3058-3166.
9. Winzelberg Olson, S., & Hohenhaus, A. E. Feline non-regenerative anemia: Diagnostic and treatment recommendations. *J Feline Med Surg* 2019;21:615–631.

10. Black, V., Adamantos, S., Barfield, D., & Tasker, S. Feline non-regenerative immune-mediated anaemia: features and outcome in 15 cases. *J Feline Med Surg* 2016;18:597–602.
11. Lucidi, C. de A., de Rezende, C. L. E., Jutkowitz, L. A., & Scott, M. A. Histologic and cytologic bone marrow findings in dogs with suspected precursor-targeted immune-mediated anemia and associated phagocytosis of erythroid precursors. *Vet Clin Pathol* 2017;46:401–415.
12. Little, S., Levy, J., Hartmann, K., et al. 2020 American Association of Feline Practitioners' Feline Retrovirus Testing and Management. *J Feline Med Surg* 2020;22:5–30.
13. Tandon, R., Cattori, V., Gomes-Keller, M. A., et al. Quantitation of feline leukaemia virus viral and proviral loads by TaqMan® real-time polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods* 2005;130:124–132.
14. Studer, N., Lutz, H., Saegerman, C., et al. Pan-European study on the prevalence of the feline leukaemia virus infection - Reported by the european advisory board on cat diseases (ABCD Europe). *Viruses* 2019;11:1–27.
15. O'Connor, T. P. SNAP Assay Technology. *Topics in Companion Animal Medicine* 2015;30:132–138.
16. Anai, Y., Ochi, H., Watanabe, S., et al. Infectious Endogenous Retroviruses in Cats and Emergence of recombinant viruses. *J Virol* 2012;86:8634–8644.
17. Willett, B. J., & Hosie, M. J. Feline leukaemia virus: Half a century since its discovery. *Vet J* 2013;195:16–23.
18. Kawasaki, J., & Nishigaki, K. Tracking the continuous evolutionary processes of an endogenous retrovirus of the domestic cat: ERV-DC. *Viruses* 2018;10:1–13.
19. Polani, S., Roca, A. L., Rosensteel, B. B., et al. Evolutionary dynamics of endogenous feline leukemia virus proliferation among species of the domestic cat lineage. *Virology* 2010;405:397–407.

20. Barr MC. FIV, FeLV, and FIPV: interpretation and misinterpretation of serological test results. *Semin Vet Med Surg Small Anim.* 1996;11:144-153
21. Hofmann-lehmann, R., Cattori, V., Tandon, R., et al. How molecular methods change our views of FeLV infection and vaccination. *Vet Immunol Immunopathol* 2008;123:119–123.
22. Beall, M. J., Buch, J., Cahill, R. J., et al. Evaluation of a quantitative enzyme-linked immunosorbent assay for feline leukemia virus p27 antigen and comparison to proviral DNA loads by real-time polymerase chain reaction. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 2019;67
23. Hartmann, K., Werner, R. M., Egberink, H., & Jarrett, O. Comparison of six in-house tests for the rapid diagnosis of feline immunodeficiency and feline leukaemia virus infections. *Vet Rec* 2001;149:317–320.
24. Levy, J., Crawford, C., Hartmann, K., et al. 2008 American Association of Feline Practitioners' feline retrovirus management guidelines. *J Feline Med Surg* 2008;10:300–316.
25. Kohn, B., Weingart, C., Eckmann, V., et al. Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: Diagnosis, therapy, and outcome (1998-2004). *J Vet Intern Med* 2006;20:159–166.

## Capitolo 3

---

# **METHYLPREDNISOLONE ALONE OR COMBINED WITH CYCLOSPORINE OR MYCOPHENOLATE MOFETIL FOR THE TREATMENT OF IMMUNE-MEDIATED HEMOLYTIC ANEMIA IN DOGS, A PROSPECTIVE STUDY**

Chiara Agnoli, Michele Tumbarello, Kateryna Vasylyeva, Carola Sofia Selva Coddè, Erika Monari,  
Marta Gruarin, Roberta Troia, Francesco Dondi

*Journal of Veterinary Internal Medicine*; under revision (2023)

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie,  
Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria,  
Bologna

## **Abstract**

**Background:** There is currently no consensus regarding the benefit of adding a second-line immunosuppressive drug to glucocorticoids for the treatment of non-associative immune-mediated hemolytic anemia (naIMHA) in dogs.

**Hypothesis/Objectives:** To evaluate the efficacy of 3 different immunosuppressive protocols in dogs with naIMHA.

**Animals:** Forty-three client-owned dogs newly-diagnosed with naIMHA and hospitalized in a veterinary university hospital.

**Methods:** Open label, randomized, controlled, clinical trial. Dogs were prospectively enrolled and treated with methylprednisolone alone (M-group) or with a combined therapy: methylprednisolone plus cyclosporine (MC-group) or methylprednisolone plus mycophenolate mofetil (MM-group). Hematological recovery (HR) was defined as partial or complete HR and compared among groups at 14, 30, 60 days after admission (primary endpoint). Secondary endpoints included need for transfusions, duration of hospitalization, number and severity of complications, frequency of relapse. Survival was evaluated at discharge and at 60 and 365 days.

**Results:** At 60 days after inclusion, 46% of dogs displayed a partial or complete HR, 54% of dogs experienced major complications and 7% relapsed. HR, frequency of relapses and complications, number of transfusion treatments, and length of hospitalization were not significantly different among groups. Survival rate at 60 and 365 days was significantly higher for dogs belonging to MC compared to M and MM-groups ( $P=.03$  and  $P=.009$ , respectively).

**Conclusions and clinical importance:** Combined immunosuppressive treatments evaluated in this study seemed to have no additional benefits over methylprednisolone alone on the HR of dogs affected by naIMHA. However, survival rate was increased in dogs treated with a combination of methylprednisolone and cyclosporine.

## Introduction

Immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) is the most common autoimmune disease in dogs<sup>1</sup> and is based on a type II hypersensitivity reaction in which opsonized red blood cells (RBCs) are destroyed by phagocytosis, activation of the complement cascade, or both.<sup>1</sup> Immune-mediated hemolytic anemia has been recently classified into associative (aIMHA) and non-associative IMHA (naIMHA) based on the presence or absence of an underlying trigger for RBCs immune-mediated destruction, respectively.<sup>2</sup> Despite many aspects of the disease are well characterized, IMHA still represents a medical challenge, given the severity of the clinical signs, the common need for intensive care support and the high mortality rate, ranging from 50% to 70%.<sup>3,4</sup>

Treatment of IMHA relies on immunosuppression, mainly obtained by means of glucocorticoids, and aimed at limiting the harmful effects of the autoimmune response. Many dogs can be managed satisfactorily with steroids alone, while others develop life-threatening IMHA forms or severe steroid-induced adverse events, thereby potentially requiring the introduction of additional, second-line, immunosuppressive drugs to facilitate disease control or taper steroids.<sup>4</sup> Among second-line drugs, numerous studies have suggested the use of cytotoxic immunosuppressants such as azathioprine and mycophenolate mofetil (MMF), inhibitors of de novo purine biosynthesis in lymphocytes, or cyclosporine, a calcineurin inhibitor that exerts its effects by blocking the transcription of genes required for T-cell activation.<sup>5</sup> A clear benefit of adding these drugs to a standard steroid protocol has not been established yet,<sup>6-8</sup> and at the best of our knowledge, prospective randomized studies comparing different treatment regimens are lacking.

Therefore, the primary aim of this study was to document the efficacy of different immunosuppressive protocols randomly assigned to dogs with spontaneously occurring naIMHA. We hypothesized that dogs undergoing to a combined immunosuppressive treatment would have a better hematological response than dogs treated with glucocorticoid monotherapy. A secondary aim

was to assess the frequency of complications, recurrence, and survival rate in the different treatment groups.

## **Materials and methods**

### **Study design and case selection**

An open label, unblinded, randomized controlled clinical trial was designed to achieve the study aims. Dogs with newly diagnosed, previously untreated naIMHA admitted to the Veterinary University Hospital of the (\*masked for review\*), between April 2018 and October 2020, were consecutively enrolled. To be eligible for recruitment, dogs had to have history, clinical and clinicopathological signs suggestive of IMHA and had to fulfill the following inclusion criteria: presence of anemia defined as a hematocrit value (HCT) <37%, and at least one of the following:<sup>9,10</sup> 1) positive direct Coombs' test;<sup>11</sup> 2) positive saline agglutination test (SAT);<sup>12</sup> 3) presence of spherocytes on a fresh blood smear ( $\geq 5$  spherocytes/x100 oil immersion field).<sup>13</sup> Concurrent systemic disorders, administration of drugs recognized as potential triggers for IMHA,<sup>2</sup> previous transfusions or immunosuppressive treatments (including corticosteroids, cyclosporine, or mycophenolate mofetil) represented exclusion criteria.<sup>4,14,15</sup>

The study was approved by the local Scientific Ethical Committee for Animal Testing. Written consent was obtained from owners of included dogs.

### **Study groups and treatments**

Upon admission, dogs received an initial intravenous dose of methylprednisolone sodium succinate (Solu-Medrol Vet, Zoetis Italia S.r.l., Rome, Italy) at 2 mg/kg q12h IV for the first 48 hours, afterwards each dog was randomly assigned to one of three different therapeutic protocols using an online available number service website.<sup>16</sup>

Treatment protocols were as follows: 1) methylprednisolone sodium succinate (Solu-Medrol Vet or Medrol Vet, Zoetis Italia S.r.l., Rome, Italy) administered at 1 mg/kg q12h IV or PO (M-group); 2) methylprednisolone sodium succinate administered at 1 mg/kg q12h IV or PO and oral cyclosporine (Atoplus, Novartis animal Health S.p.a, Origgio, Italy) given at 2.5 mg/kg q12h (MC-group); 3) methylprednisolone sodium succinate administered at 1 mg/kg q12h IV or PO and oral mycophenolate mofetil (Cellcept, Roche Registration Limited, Welwyn Garden City, Hertfordshire, United Kingdom) given at 7.5 mg/kg q12h PO and compounded for individual patients (MM-group). Regardless of the assigned group, on day 24 methylprednisolone succinate was tapered gradually by 25% every 2-3 weeks, up to 0.25 mg/kg every other day and finally stopped after 4 months of treatment. A faster reduction in the dose of glucocorticoids was carried out in patients experiencing severe related adverse effects. The total dose of glucocorticoids received during the study was calculated for each dog.

After five months of treatment, for dogs in the MC-group, cyclosporine was reduced to a maintenance dose of 2.5 mg/kg q24h, whereas for dogs in the MM-group, mycophenolate mofetil was reduced to a maintenance dose of 7.5 mg/kg q24h. Both drugs were stopped after six months of treatment.

Dogs included in the M-group showing no hematological improvement (constant reduction of hematocrit value and persistent signs of immune-mediated RBCs destruction) and being still dependent on packed red blood cells (PRBCs) transfusions after two weeks of treatment, were switched to either MC or MM-groups. These dogs were included in the admission demographics and in the analysis of clinical and clinicopathological data but were excluded from the endpoints assessment for treatment protocol comparison.

During the study period, supportive care was standardized whenever possible and recorded for all animals. Pending the results of the tests for infectious diseases, empirical antimicrobial therapy with doxycycline (Vibravet, Zoetis Italia S.r.l., Roma, Italy, at 10 mg/kg q24h) was administered to dogs considered to have a high likelihood of vector-borne disease; furthermore, dogs with known or

potential risk factors for development of gastrointestinal ulceration, as well as those with evidence of gastrointestinal bleeding received omeprazole at 0.7 mg/kg q24h (Omeprazolo, Mylan generics Italia, Milan, Italy).

When indicated, dogs were treated with subcutaneous unfractionated heparin (Calciparina, Italfarmaco S.p.a, Milan, Italy), oral clopidogrel (Plavix, Sanofi Aventis group, Paris, France), or both, in accordance with recent guidelines.<sup>4,17,18</sup>

Packed red blood cells (PRBCs) and fresh frozen plasma transfusions were administered, whenever needed, either alone or in combination with IV fluids. The number and volume of transfusions were recorded. Once discharged, dogs were treated with adjunctive therapies based on individual needs.

#### **Data collection and follow up**

Data recorded upon admission (T0) included signalment, history, clinical findings, and clinicopathological and imaging results. Disease severity was assessed using the Acute Patient Physiologic and Laboratory Evaluation fast score (APPLEfast) as previously reported.<sup>19</sup> Thoracic radiographs, abdominal ultrasound and fine-needle aspiration of liver and spleen, regardless of their sonographic appearance, were performed within 48 hours from admission in all cases to rule out underlying diseases associated with IMHA.

Serial clinical and clinicopathological evaluations were recorded at baseline (T0) and at different timepoints from diagnosis. Further investigations were made whenever deemed necessary.

Complications occurring during the treatment period were registered and classified as IMHA-related (anemia-induced tissue hypoxia and thromboembolic events) or treatment-related (infections, or signs of iatrogenic hyperadrenocorticism). Specifically, hypoxic events were defined as a symptomatic reduction of oxygen supply to tissues directly attributable to the severity of anemia (e.g., weakness, tachypnea, lethargy, syncope).<sup>20</sup> Thromboembolic events included venous and arterial thrombosis and pulmonary thromboembolism. These events were suspected in case of consistent clinical,

laboratory and imaging findings, such as acutely increased respiratory rate and effort, hypoxemia, increased alveolar-to-arterial oxygen gradient, supportive radiographic findings, or direct evidence of arterial or venous thrombosis by means of clinical examination and ultrasound.<sup>21,22</sup> Infectious complications were defined as the presence of a septic focus documented by cytology, microbiology, or both, as previously reported.<sup>23,24</sup> Clinical and clinicopathological changes caused by the sustained use of glucocorticoids at immunosuppressive doses were defined as iatrogenic hyperadrenocorticism.<sup>25,26</sup>

Complications were classified as minor (mild or subclinical symptoms, yet negatively impacting on the patient's quality of life, on the owner's compliance, or both), and major (life-threatening conditions).

## **Endpoints**

The primary endpoint was defined as hematological recovery, assessed at day 14 (T14), 30 (T30) and 60 (T60), after inclusion in the study. Complete hematological recovery (CHR) was defined by a HCT >37%, negative SAT, absence of spherocytosis, normal serum total bilirubin concentration and absence of bilirubinuria (bilirubinuria defined as >1+ urine dipstick test for bilirubin).<sup>27</sup> Partial hematological recovery (PHR) was defined as persistency of anemia, however with a HCT increase up to 37%, negative SAT, and absence of spherocytosis, hyperbilirubinemia and bilirubinuria. Dogs not achieving CHR or PHR were classified as non-responders (NR). Times to normalization of antithrombin activity (AT), C-reactive protein (CRP) concentration and urine protein to creatine ratio (UPC) were also assessed.

Secondary endpoints included the need for PRBCs transfusions, the duration of hospitalization, the number and severity of complications, frequency of relapse and survival rate. Relapse was defined as a HCT decrease of at least 10%, in addition to  $\geq 1$  signs of immune-mediated RBCs destruction, with a concurrent increase in serum total bilirubin concentration and presence of hemoglobinuria,

bilirubinuria, or both.<sup>28</sup> Survival rate was measured at discharge, at day 60 (T60) and at day 365 (T365) after the enrollment.

The per protocol (PP) population included all dogs completing the study without major protocol deviations and performing all the required serial clinical and clinicopathological evaluations.

Primary endpoints were assessed in the PP population and compared between dogs treated with glucocorticoid monotherapy (M-group) and combined protocols (MC and MM-group evaluated together), and among the three different therapeutic groups (M, MC, and MM-group). Secondary endpoints were assessed in the overall population and compared among different groups, as reported above.

### **Clinicopathological evaluation**

Blood samples were collected by venipuncture using a blood vacuum collection system (Vacutest Kima Srl, Arzergrande, Italy). All blood and urine samples were processed and analyzed within 2 hours after collection.

A CBC was carried out by using an automated hematology system (ADVIA 2120, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown, NY). Blood smear microscopic evaluation was performed after May-Grünwald-Giemsa staining (Merk KGaA, Darmstadt, Germany). Presence and enumeration of spherocytes, and abnormal RBCs morphology were recorded. Saline agglutination test was performed by washing RBCs 3 times with saline as previously reported.<sup>12</sup> Results of SAT were considered positive if erythrocytes agglutinates were observed by microscopic visualization. The direct antiglobulin test (Lab test Alvedia, Limonest, France) was performed within four hours after blood collection, following the manufacturer's instructions.

The severity of anemia was graded as follows: mild (HCT 30-37%), moderate (HCT 20-29%), severe (HCT 13-19%), and very severe (HCT <13%).<sup>29</sup> Moreover, anemia was defined as regenerative if the

absolute reticulocyte number was greater than 120000/mm<sup>3</sup>.<sup>30</sup> Presence of hemolysis was detected by visual examination of the plasma.<sup>31</sup>

Chemistry and coagulation analyses including CRP, D-Dimer concentration and AT were performed by using an automated chemistry analyzer (OLYMPUS AU 480, Olympus/Beckman Coulter, Brea, California). Blood lactate concentration (Lactate Scout +, EKF Diagnostic, Barleben, Germany) and additional hemostatic variables including prothrombin time (Thromborel S, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany), activated partial thromboplastin time (Dade Actin, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany) and fibrinogen (Multifibren U, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany), were also obtained (BFT II Analyzer, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen, Germany). Urinalysis included urine specific gravity measurement by refractometer, (American Optical, Buffalo, New York), dipstick examination (Combur Test, F. Hoffmann-La Roche Ltd; Urisys 1100 Urine Analyzer, F. Hoffmann-La Roche Ltd) and microscopic evaluation of fresh urine sediment. Urine protein-to-creatinine ratio quantification was performed (Urinary/CSF Protein, OSR6170, Olympus/Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland; Creatinine OSR6178 Olympus/Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland), providing urine specimens were not pigmented.

Immunofluorescence antibody tests for *Leishmania infantum*, *Ehrlichia canis* and *Anaplasma phagocytophilum*, antinuclear antibody test and rapid in-clinic test for *Ehrlichia canis/ewingi*, *Anaplasma phagocytophilum/platys*, *Dirofilaria immitis* and *Borrelia burgdorferi* (SNAP 4Dx Idexx, Hoofddorp, The Netherlands) were also routinely performed in all the cases. A microscopic agglutination test (MAT) for *Leptospira* spp. and a PCR for *Babesia* spp. were carried out if exposure was suspected, as previously reported.<sup>32-34</sup>

All tests, except for the MAT (carried out at the National Reference Centre for Animal Leptospirosis, \*masked for review\*), were performed at the clinical pathology laboratory of the (\*masked for review\*).

## **Statistical analysis**

An a priori power analysis was performed to estimate the minimum number of dogs to be included in the study groups. Based on our preliminary results (unpublished data), the hypothesis was that at different time points, a higher percentage of dogs receiving the combined protocol (90%) would achieve a satisfactory (partial or complete) hematological response, compared to dogs receiving only steroids (50%). Based on the assumption of a 1:2 case ratio between single and combined-treatment groups, and in order to achieve 80% statistical power and 5% type I error rate ( $\alpha$ ), a minimum of 42 dogs had to be enrolled in the study. Distribution of data was assessed by graphic evaluation and using the D'Agostino-Pearson test. Data were reported using standard descriptive statistics as mean +/- standard deviation, or median and range (minimum-maximum value), if normally or non-normally distributed, respectively. Clinical and laboratory data, as well as primary and secondary endpoints, were compared among groups using the Mann Whitney U test (2 groups comparison) or the Kruskal-Wallis test with a compensated post-hoc analysis (3 group comparison) for continuous variables, while the Fisher exact test or the Chi-square test were used for categorical variables, respectively. Overall survival time was calculated as the time interval between the first day of hospitalization and IMHA-related death. The survival rate within therapeutic groups was measured at discharge, at T60 and T365. Dogs deceased for IMHA-unrelated causes were censored from this analysis. Survival plots were generated according to the Kaplan-Meier product limit method and results compared with the Log-rank test. Analyses were carried out using a commercially available statistical software (MedCalc® Statistical Software version 20.011, MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium). The significance level was set at  $P < .05$ .

## Results

### Demographics, clinical and clinicopathological data

Fifty-two dogs were diagnosed with IMHA during the study period. Four dogs were excluded because they were diagnosed with aIMHA (*Ehrlichia* spp. infection n=2; *Leishmania infantum* infection n=1; hemophagocytic histiocytic sarcoma n=1), moreover five dogs died before randomization. Therefore, 43 dogs fulfilled the inclusion criteria and were enrolled in the study.

The study included 19/43 (44%) males (16 intact and 3 castrated), and 24/43 (56%) females (7 intact and 17 spayed). Median age was 7 years (range, 0.5 – 14 years) and median body weight was 10.5 kg (range, 3.4 – 52.2 kg). Median duration of symptoms before admission was 2 days (range, 0 – 20 days). The most common clinical signs evaluated at T0 are presented in Table 1. Upon admission, anemia was moderate in 8/43 (19%) dogs, severe in 15/43 (35%), and very severe in 20/43 (46%). Anemia was regenerative in 18/43 (42%) dogs. Twenty-eight out of 43 (65%) dogs had leukocytosis and 18/43 (42%) had thrombocytopenia. Laboratory data collected upon admission are shown in Table 2 and 3.

**Table 1.** Clinical findings recorded upon admission in dogs with naIMHA (n=43) included in the study.

<b>Clinical sign</b>	<b>Number of affected dogs</b>	<b>Percentage of affected dogs</b>
Lethargy	43	100%
Pigmented urine	36	84%
Pale mucous membranes	35	83%
Anorexia	32	74%
Jaundice	19	44%
Diarrhea	8	19%
Fever ( $T^{\circ} > 39.2^{\circ}\text{C}$ )	6	14%
Vomiting	5	12%
Polyuria and polydipsia	1	2.5%

**Table 2.** Apple<sub>fast</sub> score and selected clinicopathological results in dogs with naIMHA (n=43) included in the study. Data are reported as median and range (min – max values) or mean ± standard deviation, based on their distribution. Frequency data are also reported.

<b>Variable</b>	<b>Results</b>	<b>Reference Interval</b>
Apple-fast score (n=43)	27 (16 – 39)	up to 50
Lactate (mmol/L) (n=43)	2.3 (0.6 – 12.1)	0 – 1 mmol/L
<i>Hematology (n=43)</i>		
HCT (%)	14.3 ± 5.7	37 – 55%
Mild anemia (HCT 30-37%)	/	/
Moderate anemia (HCT 20-29%)	8/43 (19%)	/
Severe anemia (HCT 13-19%)	15/43 (35%)	/
Very severe anemia (HCT < 13%)	20/43 (46%)	/
Hb (gr%)	5.08 ± 1.9	12 – 18 gr%
RBC (/mm <sup>3</sup> )	1913255 ± 805634	5500000 – 8500000/mm <sup>3</sup>
MCV (fL)	73.3 (56.3 – 111.6)	60 – 77 fL
MCHC (%)	34.4 (26.5 – 72.4)	32 – 38%

RDW (%)	20 (12.5 – 39.5)	13 – 15.7%
Reticulocytes (/mm <sup>3</sup> )	87400 (500 – 564500)	≥120000/mm <sup>3</sup>
WBC (/mm <sup>3</sup> )	19440 (5910 – 71160)	6000 – 17000/mm <sup>3</sup>
Neutrophils (/mm <sup>3</sup> )	15320 (4090 – 62426)	3000 – 12000/mm <sup>3</sup>
Lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	2130 (340 – 12830)	1000 – 4800/mm <sup>3</sup>
Monocytes (/mm <sup>3</sup> )	1640 (270 – 7078)	100 – 1400/mm <sup>3</sup>
Platelets (/mm <sup>3</sup> )	194000 (6000 – 911000)	160000 – 500000/mm <sup>3</sup>
MPV (fL)	17.5 (10.8 – 35.7)	6.6 – 10-9 fL

---

*Serum chemistry (n=43)*

ALT (U/l)	55 (10 – 7144)	15 – 52 U/L
AST (U/l)	68 (16 – 2535)	15 – 62 U/L
ALP (U/l)	320 (21 – 2782)	12 – 180 U/L
GGT (U/l)	2.4 (0.1 – 11.8)	0 – 5 U/L
Total bilirubin (mg/dL)	1.04 (0.16 – 19.31)	0.07 – 0.33 mg/dL
Total protein (g/dL)	6.3 ± 0.6	5.6 – 7.3 g/dL

Albumin (g/dL)	2.71 ± 0.36	2.75 – 3.85 g/dL
Albumin-to-globulin ratio	0.78 ± 0.16	0.75 – 1.35
Creatinine (mg/dL)	0.69 (0.45 – 2.11)	0.75 – 1.4 mg/dL
Urea (mg/dL)	52 (12 – 267)	17 – 48 mg/dL
Phosphate (mg/dL)	3.85 (2.2 – 8.56)	2.65 – 5.40 mg/dL
Sodium (mEq/L)	146 (129 – 150)	143 – 151 mEq/L
Potassium (mEq/L)	3.7 ± 0.6	3.8 – 5 mEq/L
Chloride (mEq/L)	113 ± 3	108 – 118 mEq/L
Total Calcium (mg/dL)	9.1 ± 0.6	9.3 – 11 mEq/L
Total iron (µg/dL)	235 ± 128	50 – 230 µg/dL
TIBC (µg/dL)	357 ± 80	240 - 440 µg/dL
TIBC saturation (%)	61 (11 – 116)	25 – 63%
CRP (mg/dL)	19.83 (1.06 – 48.80)	0 – 0.85 mg/dL
<i>Coagulation (n=43)</i>		
PT (sec)	7.5 (5.5 – 24)	5 – 7.5 sec

aPTT (sec)	12.2 (8.4 – 27)	8 – 16.5 sec
Fibrinogen (g/L)	3.75 (0.38 – 11.06)	1.45 – 3.85 g/L
D-dimer (µg/ml)	0.08 (0.01 – 3.83)	0 – 0.26 µg/mL
AT activity (%)	93 ± 18	105 – 166%
<hr/> <i>Urinalysis</i>		
USG (n=37)	1035 ± 14	> 1030
UPC* (n=32)	0.6 (0.1 – 5.6)	0 – 0.5

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine transaminase; aPTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate transaminase; AT activity, antithrombin activity; CRP, C-reactive protein; GGT, gamma-glutamyl transferase; Hb, total hemoglobin; HCT, hematocrit; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular volume; MPV, mean platelet volume; naIMHA, non-associative immune-mediated hemolytic anemia; PT, prothrombin time; RBC, red blood cells; RDW, red blood cells distribution width; TIBC, total iron binding capacity; UPC, urine protein-to-urine creatinine ratio; USG, urine specific gravity; WBC, white blood cells.

\* Quantification of the UPC value was carried out after resolution of macroscopic pigmenturia.

Table 3. Diagnostic criteria for naIMHA used in the study population. Data are expressed as frequency of presence or absence of the selected variable.

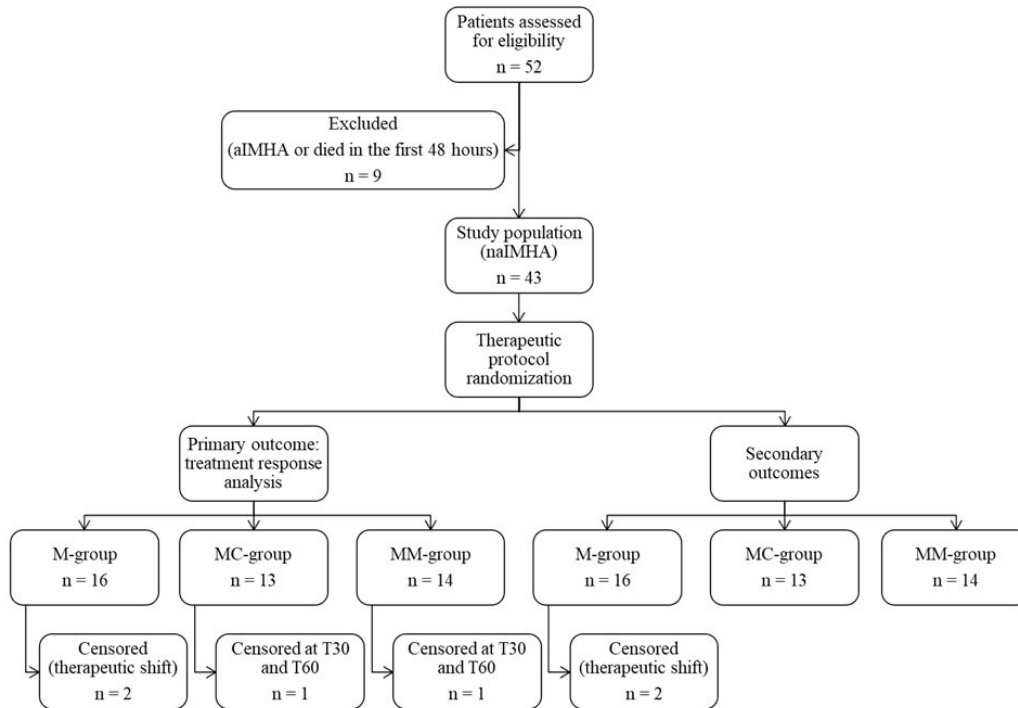
Variable	Presence	Absence
	n (%)	n (%)
Positive Coombs' test	24/36 (67%)	12/36 (33%)
Spherocytosis on blood smear evaluation	33/43 (77%)	10/43 (23%)
Positive SAT	33/43 (77%)	10/43 (23%)
Hyperbilirubinemia (>0.33 mg/dl)	38/43 (88%)	5/43 (12%)
Bilirubinuria (positive dipstick)	36/43 (84%)	7/43 (16%)
Hemoglobinemia (pigmented serum/plasma)	25/43 (58%)	18/43 (42%)

naIMHA, non-associative immune-mediated hemolytic anemia; SAT, saline autoagglutination test.

### **Therapeutic groups and PP population**

Sixteen out of 43 dogs were randomly assigned to M-group, 13/43 to MC-group and 14/43 to MM-group. Therapeutic groups were not different in terms of demographic data, clinicopathological variables, APPLEfast score (Table 4) and total dose of corticosteroids (Table 5). Two dogs in the M-group which had no improvement within the first 2 weeks of treatment were switched in other therapeutic groups, and were excluded from endpoints comparison; thus, 41 dogs were included in the T14 PP population. Serial clinical and clinicopathological data were lost for 2 dogs after the first 2 weeks, and consequently 39 dogs were included in the T30 and T60 PP population. The flow chart of patients' inclusion is shown in Figure 1.

**Figure 1.** Flow chart of dogs with immune-mediated hemolytic anemia (IMHA) included in the study: enrollment, randomization and comparison.



aIMHA, associative immune-mediated hemolytic anemia; naIMHA, non-associative immune-mediated hemolytic anemia; M-group, methylprednisolone sodium succinate therapeutic group; MC-group, methylprednisolone sodium succinate plus cyclosporine therapeutic group; MM-group, methylprednisolone sodium succinate plus mycophenolate mofetil therapeutic group. Secondary outcomes: need for packed red blood cells transfusions, duration of hospitalization, number and severity of complications, frequency of relapse and survival rate.

**Table 4.** Comparison of signalment data, duration of clinical signs and clinicopathological results among naIMHA dogs divided based on the therapeutic group and evaluated upon admission. Data are reported as median and range (min – max values) or mean  $\pm$  standard deviation, based on their distribution.

Variable	M-group n = 16	MC-group n = 13	MM-group n = 14	P value	Reference Interval
<i>Signalment and clinical signs</i>					
Age (months)	85.5 (10 – 142)	74 (24 – 156)	93 (5 – 168)	.57	/
Weight (kg)	18.8 (3.4 – 52.2)	8.9 (3.9 – 22.5)	8.9 (3.7 – 33.4)	.07	/
Sex				.44	/
Entire male	6	3	7		
Neutered male	/	1	2		
Entire female	2	3	2		
Neutered female	8	6	3		
Duration of illness before the presentation (days)	4 (0 – 20)	2 (1 – 10)	2 (1 – 10)	.25	/
<i>Clinicopathological variables</i>					

Apple <sub>fast</sub> score	27 (19 – 39)	28 (16 – 32)	26.5 (17 – 33)	.59	up to 50
Lactate (mmol/L)	2.5 (1.3 – 12.1)	2.15 (0.6 – 3.4)	2.3 (0.9 – 9.6)	.25	0 – 1 mmol/L
<hr/> <b><i>Hematology</i></b>					
HCT (%)	14.3 ± 6	14.1 ± 6	14.4 ± 5.6	.92	37 – 55%
Hb (gr%)	5 ± 1.8	5 ± 1.9	5.3 ± 2	.85	12 – 18 gr%
RBC (/mm <sup>3</sup> )	1860714 ± 849049	1905385 ± 748850	1977857 ± 850467	.94	5500000 – 8500000/mm <sup>3</sup>
MCV (fL)	80.2 (63.8 – 111.6)	73.9 (56.3 – 83.5)	69.8 (59.1 – 92.7)	.48	60 – 77 fL
MCHC (%)	33.9 (26.5 – 72.4)	34.5 (27.4 – 45.2)	35.45 (27.8 – 59)	.63	32 – 38%
RDW (%)	20 (13.4 – 39.5)	20 (12.9 – 39)	18.4 (12.5 – 39.2)	.67	13 – 15.7%
Reticulocytes (/mm <sup>3</sup> )	144100 (500 – 395700)	82900 (1800 – 264600)	102250 (1600 – 564500)	.46	≥120000/mm <sup>3</sup>
WBC (/mm <sup>3</sup> )	18325 (8660 – 68660)	18130 (5910 – 56120)	25210 (8250 – 71160)	.32	6000 – 17000/mm <sup>3</sup>
Neutrophils (/mm <sup>3</sup> )	18939 (5870 – 62426)	12710 (4680 – 38929)	20570 (4090 – 49880)	.30	3000 – 12000/mm <sup>3</sup>
Lymphocytes (/mm <sup>3</sup> )	2228 (340 – 8980)	2012 (620 – 4090)	2806,5 (860 – 12830)	.29	1000 – 4800/mm <sup>3</sup>
Monocytes (/mm <sup>3</sup> )	1816 (270 – 6480)	1350 (512 – 7078)	1825 (420 – 4470)	.56	100 – 1400/mm <sup>3</sup>
Platelets (/mm <sup>3</sup> )	212500 (6000 – 911000)	180000 (66000 – 784000)	224500 (63000 – 834000)	.65	160000 – 500000/mm <sup>3</sup>

MPV (fL)	19.4 (12.6 – 24.6)	20.1 (10.8 – 35.7)	15.85 (12.3 – 27)	.09	6.6 – 10.9 fL
<hr/> <i>Serum chemistry</i>					
ALT (U/L)	56 (22 – 2212)	50 (33 – 700)	64.5 (10 – 7144)	.82	15 – 52 U/L
AST (U/L)	61 (18 – 2535)	47 (16 – 424)	82.5 (22 – 1791)	.68	15 – 62 U/L
ALP (U/L)	181 (21 – 954)	373 (66 – 1931)	424 (122 – 2782)	.24	12 – 180 U/L
GGT (U/L)	1.9 (0.1 – 7.9)	3 (0.1 – 11.8)	2.25 (0.1 – 9.6)	.67	0 – 5 U/L
Total bilirubin (mg/dL)	0.85 (0.21 – 18.07)	0.91 (0.16 – 12.93)	2.75 (0.25 – 19.31)	.25	0.07 – 0.33 mg/dL
Total protein (g/dL)	6.21 ± 0.5	6.20 ± 0.9	6.20 ± 0.9	.30	5.6 – 7.3 g/dL
Albumin (g/dL)	2.75 ± 0.23	2.91 ± 0.50	2.90 ± 0.50	.63	2.75 – 3.85 g/dL
Albumin-to-globulin ratio	0.80 ± 0.10	0.90 ± 0.18	0.90 ± 0.18	.64	0.75 – 1.35
Creatinine (mg/dL)	0.67 (0.51 – 1.60)	0.68 (0.49 – 1.22)	0.71 (0.45 – 2.11)	.68	0.75 – 1.4 mg/dL
Urea (mg/dL)	58 (18 – 123)	49 (25 – 74)	58 (12 – 267)	.33	17 – 48 mg/dL
Phosphate (mg/dL)	3.70 (2.88 – 8.56)	3.72 (2.2 – 5.6)	4 (2.9 – 7.14)	.59	2.65 – 5.40 mg/dL

Sodium (mEq/L)	146 (129 – 149)	146 (140 – 149)	145 (138 – 150)	.78	143 – 151 mEq/L
Potassium (mEq/L)	3.8 ± 0.5	4.3 ± 0.7	4.35 ± 0.71	.47	3.8 – 5 mEq/L
Chloride (mEq/L)	113 ± 4	111 ± 4	111 ± 4	.20	108 – 118 mEq/L
Total Calcium (mg/dL)	9.1 ± 0.6	9.1 ± 0.6	9 ± 0.7	.75	9.3 – 11 mEq/L
Total iron (µg/dL)	250 ± 122	212.5 ± 126	210.4 ± 125	.83	50 – 230 µg/dL
TIBC (µg/dL)	333 ± 78	363 ± 72 n = 12	358 ± 73 n = 13	.67	240 - 440 µg/dL
TIBC saturation (%)	86 (22 – 99)	51 (11 – 96) n = 12	52 (18 – 116) n = 13	.38	25 – 63%
CRP (mg/dL)	18.28 (3.07 – 24.94)	9.87 (1.06 – 30.32)	21.22 (5.97 – 48.80)	.65	0 – 0.85 mg/dL

---

***Coagulation***

PT (sec)	7.9 (5.7 - 24) n = 12	7 (6 – 13.7) n=13	7.6 (5.5 – 11.2) n = 13	.61	5 – 7.5 sec
----------	--------------------------	----------------------	----------------------------	-----	-------------

aPTT (sec)	12.3 (8.4 – 23.7) n = 12	11 (9.3 – 27) n=13	12.2 (8.8 – 21) n = 13	.87	8 – 16.5 sec
Fibrinogen (g/L)	2.78 (0.38 – 3.57) n = 12	2.74 (2.15 – 6.61) n = 13	2.6 (2.06 – 11.06) n = 13	.82	1.45 – 3.85 g/L
D-dimer (µg/ml)	0.12 (0.01 – 0.9) n = 12	0.05 (0.01 – 1.76) n = 13	0.07 (0.01 – 3.83) n = 13	.45	0 – 0.26 µg/ml
AT activity (%)	88.2 ± 16.7 n = 15	78.2 ± 23.6 n = 12	76.8 ± 23.1 n=14	.29	105 – 166%

---

***Urinalysis***

USG	1035 ± 13 n = 12	1027 ± 15 n = 12	1027 ± 15 n = 13	.80	> 1030
UPC*	0.6 (0.1 – 4.8) n = 13	0.9 (0.1 – 5.6) n = 9	0.7 (0.2 – 2.7) n = 10	.78	0 – 0.5

---

ALP, alkaline phosphatase; ALT, alanine transaminase; aPTT, activated partial thromboplastin time; AST, aspartate transaminase; AT activity, antithrombin activity; CRP, C-reactive protein; GGT, gamma-glutamyl transferase; Hb, total hemoglobin; HCT, hematocrit; M therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate therapeutic group; MC therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate and cyclosporine therapeutic group; MCHC, mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV, mean corpuscular

volume; MM therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate and mycophenolate mofetil therapeutic group; MPV, mean platelet volume; PT, prothrombin time; RBC, red blood cells; RDW, red blood cells distribution width; TIBC, total iron binding capacity; UPC, urine protein-to-urine creatinine ratio; USG, urine specific gravity; WBC, white blood cells.

\* Quantification of the UPC value was performed after resolution of hemoglobinuria and/or bilirubinuri

## **Treatment response**

At T14, no dogs had a CHR and only 3/41 (7%) dogs had a PHR; at T30, 10/39 (26%) dogs achieved the hematological endpoint (7% CHR, 19% PHR). Finally, at T60, 18/39 (46%) dogs reached a CHR or PHR (28% and 18%, respectively).

Frequency in treatment response was not significantly different between dogs treated with methylprednisolone alone (M-group) and dogs treated with combined protocols (MC and MM-groups), nor among the 3 groups, at T14 ( $P=.22$ ;  $P=.42$  respectively), T30 ( $P=.84$ ;  $P=.64$  respectively) and T60 ( $P=.17$ ;  $P=.28$  respectively).

Times to normalization of AT and CRP concentration were not significantly different between first-line steroid therapy and combined immunosuppressive therapy ( $P=.08$  and  $P=.59$ , respectively), nor among the 3 therapeutic groups ( $P=.08$  and  $P=.75$ , respectively). Conversely, median time to normalization of UPC was significantly different between glucocorticoid monotherapy and combined treatment: dogs in MC and MM-group had a significantly longer UPC normalization time ( $P=.002$ ) if compared with M-group. The same difference was confirmed comparing the 3 therapeutic groups (median time to normalization of UPC among therapeutic groups was 119, 67 and 32 days for MC, MM and M-group, respectively), with dogs in M-group significantly different from MM and MC-groups ( $P=.007$ ).

## **Transfusion requirements and hospitalization**

Thirty-eight dogs out of 41 (93%) received at least one transfusion. Overall, 36/41 (88%) dogs received PRBCs (median volume administered, 18 ml/kg/patient, range 0-112 ml/kg). There was no difference between single-line and combined therapy, nor among therapeutic groups regarding the number of transfusion treatments ( $P=.86$  and  $P=.90$  respectively), and the median ml/kg of PRBCs administered ( $P=.10$  and  $P=.14$  respectively). The median length of hospitalization was 8 days (range 4-17 days) in the overall study population, with no difference documented between dogs receiving only steroids and dogs treated with combined therapy ( $P=.38$ ), nor among the 3 therapeutic groups

(P=.63). Patient characteristics and secondary outcomes are summarized and compared among groups in Table 5 and Table 6.

**Table 5.** Comparison of hematological and clinicopathological endpoints, frequency of complications and other outcomes among therapeutic groups. Data are reported as median and range (min – max values). Significant *P* values are reported in bold.

<b>Endpoint</b>	<b>M-group</b> <b>n = 14</b>	<b>MC-group</b> <b>n = 13</b>	<b>MM-group</b> <b>n = 14</b>	<b><i>P</i> value</b>
Resolution of anemia (days)	45.5 (16 – 120) n = 10	37 (11 – 155) n = 12	76 (18 – 120) n = 7	.61
Disappearance of spherocytosis (days)	30 (1– 109) n = 11	47.5 (14 – 84) n = 8	29 (2 – 76) n = 9	.34
Disappearance of positive microagglutination (days)	11 (1 – 79) n = 10	8 (1 – 52) n = 9	4 (2 – 14) n = 9	.65
Normalization of serum bilirubin concentration (days)	15 (2 – 60) n = 11	12.5 (3 – 74) n = 8	16 (4 – 47) n = 8	.74

Normalization of serum CRP concentration (days)	21 (13 – 120) n = 8	24 (8 – 184) n = 8	17 (12 – 93) n = 9	.75
Normalization of AT activity (days)	92 (32 – 150) n = 7	44 (4 – 79) n = 9	73 (32 – 137) n = 7	.08
Normalization of the UPC value (days)	32 (27 - 40)* n = 5	119 (44 – 339) n = 7	67 (43 – 150) n = 3	<b>.007</b>
Corticosteroid treatment dose (mean mg/kg/day)	1.25 (0.80 – 3.33) n = 14	1.05 (0.55 – 1.73) n = 12	1.14 (0.82 – 2.86) n = 13	.09
Total PRBCs volume administered (mL/kg)	15 (0 – 84) n = 14	22 (0 – 112) n = 12	26.5 (5 – 79) n = 14	.14
Length of hospitalization (days)	8 (4 – 17)	8 (4 – 13)	9 (5 – 16)	.63
Infectious complications (number of patients)	5/14	6/13	4/14	.63
Thrombotic complications (number of patients)	3/14	2/13	4/14	.70

Recurrence of IMHA (number of patients)	2/14	0/13	1/14	.36
Death at T365 (number of patients)	3/14	0/13	7/14	<b>.009</b>

---

AT activity, antithrombin activity; CRP, C-reactive protein; HCT, hematocrit; IMHA, immune-mediated hemolytic anemia; M therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate therapeutic group; IMHA, immune-mediated hemolytic anemia; MC therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate and cyclosporine therapeutic group; MM therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate and mycophenolate mofetil therapeutic group; PRBC, packed red blood cell; UPC, urine protein-to-urine creatinine ratio.

\*Significantly different from MC and MM groups.

**Table 6.** Comparison of clinicopathological endpoints, frequency of complications and secondary outcomes between methylprednisolone alone and combined therapy treatment groups. Data are reported as median and range (min – max values). Significant *P* values are reported in bold.

<b>Endpoint</b>	<b>M-group</b>	<b>MC + MM-group</b>	<b><i>P</i> value</b>
Resolution of anemia (days)	45.5 (16 – 120)	60 (11 – 155)	.58
	n = 10	n = 19	
Disappearance of spherocytosis (days)	30 (1– 109)	33 (2 – 84)	.57
	n = 11	n= 17	
Disappearance of positive microagglutination (days)	11 (1 – 79)	5 (1 – 52)	.42
	n = 10	n= 18	
Normalization of serum bilirubin concentration (days)	15 (2 – 60)	14 (3 – 74)	.56
	n = 11	n= 16	
Normalization of serum CRP concentration (days)	21 (13 – 120)	18 (8 - 184)	.59
	n = 8	n = 17	

Normalization of AT activity (days)	92 (32 – 150) n = 7	51 (4- 147) n = 16	.08
Normalization of the UPC value (days)	32 (27 - 40) n = 5	116 (43 – 339) n = 10	<b>.002</b>
Corticosteroid treatment (mean mg/kg/day)	1.25 (0.80 – 3.33) n = 14	1.07 (0.55 – 2.86) n= 27	.29
Total pRBCs volume administered (mL/kg)	15 (0 – 84) n = 14	22 (0 – 112) n = 27	.10
Length of hospitalization (days)	8 (4 – 17)	8 (4 – 16)	.38
Infectious complications (number of patients)	5/14	10/27	.93
Thrombotic complications (number of patients)	3/14	6/27	.95

Recurrence of IMHA (number of patients)	2/14	1/27	.22
Death at T365 (number of patients)	3/14	7/27	.89

---

AT activity, antithrombin activity; CRP, C-reactive protein; HCT, hematocrit; IMHA, immune-mediated hemolytic anemia; M therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate therapeutic group; IMHA, immune-mediated hemolytic anemia; MC therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate and cyclosporine therapeutic group; MM therapeutic group, methylprednisolone sodium succinate and mycophenolate mofetil therapeutic group; pRBC, packed red blood cell; UPC, urine protein-to-urine creatinine ratio

## **Complications and relapses**

Nineteen out of 41 (46%) dogs had minor complications, mainly related to iatrogenic hyperadrenocorticism, whereas 22/41 (54%) dogs experienced major complications. Of these, 13/41 (32%) dogs developed infections (sepsis, n=3; multidrug resistant urinary tract infection, n=3; multiple skin abscess, n=2; cholangitis, n=1; endocarditis, n=1; septic arthritis, n=1; pyelonephritis, n=1; pneumonia n=1), 9/41 (22%) dogs had thrombotic events and 1/41 (2.5%) dog died suddenly without a clearly identifiable cause at day 14. Unfortunately, the owner denied the necroscopic examination of this dog. Four out of 41 (9.7%) dogs faced both infectious and thrombotic complications.

The frequency of complications was not significantly different between steroids alone and combined therapy groups ( $P=.54$ ), nor among M, MC, and MM-group ( $P=.46$ ) (Table 5).

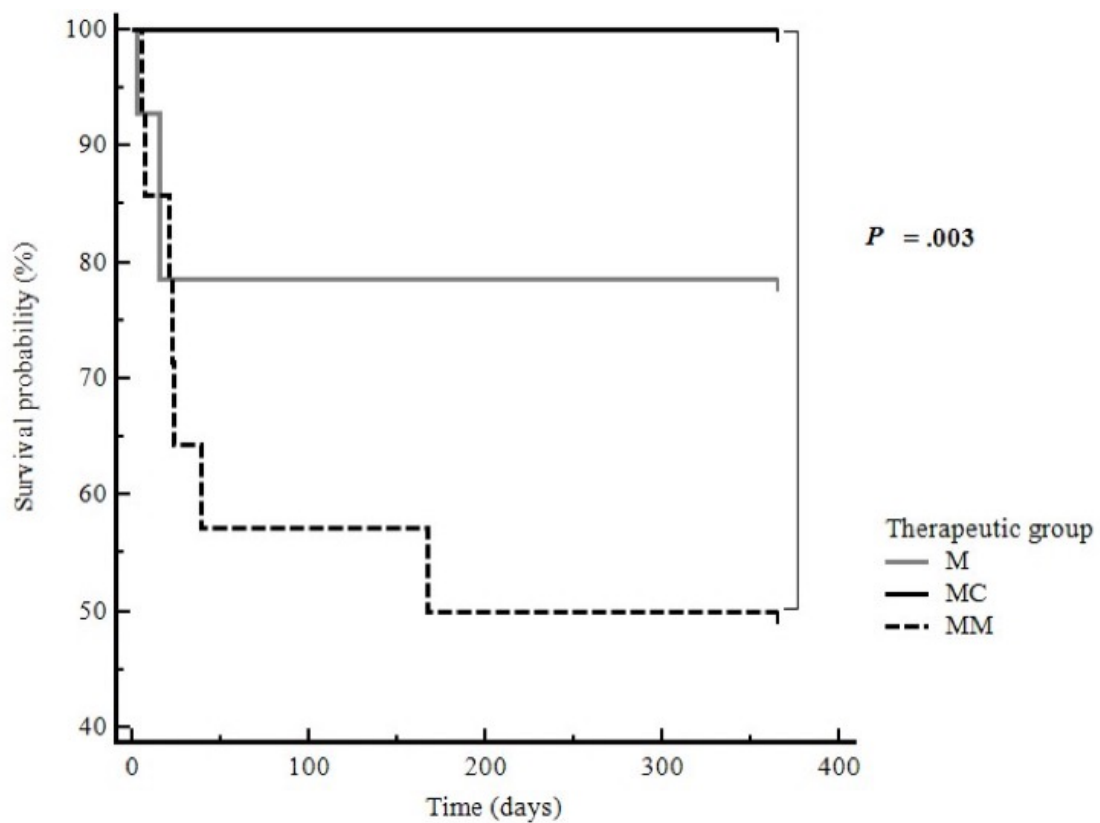
Two dogs in the M-group and 1 dog in MM-group (3/41; dogs, 7%) had a relapse of IMHA after 115, 243 and 131 days, respectively. Relapse rate was not significantly different between single and combined therapy and among different treatment groups ( $P=.22$  and  $P=.36$  respectively).

## **Mortality**

The survival rate in this study was 93% (38/41 dogs) at discharge and 78% (32/41 dogs) at T60. At data analysis closure (T365), 31/41 (75%) dogs were alive and 10/41 (25%) had died due to IMHA-related causes (n=3), treatment-related complications (n=6) (infection n=5; thrombotic event n=1) and unknown cause (n=1). Among non-survivors, 5/10 dogs (50%) died within the first 2 weeks (3 died during hospitalization, 2 died soon after discharge), whereas the remaining 5/10 (50%) dogs died after 21, 23, 24, 39 and 167 days from admission, respectively. When comparing the survival rate between single-line and combined therapy groups no significant difference was detected at discharge ( $P=.99$ ), at T60 ( $P=.96$ ) and at T365 ( $P=.89$ ). When cases were classified based on treatment groups, there was no significant difference in the survival rate at discharge ( $P=.38$ ). However, the survival rate at T60 and T365 was significantly higher for dogs belonging to MC-group compared to M and

MM-groups ( $P=.03$  and  $P=.009$ , respectively). Survival time for MC-group was significantly longer if compared to MM-groups ( $P=.009$ ), while it was not different if compared to M-group ( $P=0.08$ ). Kaplan-Meier survival curves are shown in Fig 2.

**Figure 2.** Kaplan-Meier survival curves evaluating survival for dogs with naIMHA divided based on the 3 therapeutic groups. A shorter survival was detected for MM groups if compared to MC group ( $P=.003$ ).



## Discussion

Our study evaluated the efficacy of different immunosuppressive protocols for the treatment of naIMHA in dogs, suggesting a potential medium- and long-term survival benefit in dogs treated with a combined glucocorticoid and cyclosporine protocol. Currently, there is no consensus regarding the optimal immunosuppressive regimen or the benefit of adding a second-line drug to glucocorticoids, for the treatment of IMHA in dogs, despite it being a common hematological disorder.<sup>4</sup> In our prospective clinical trial, dogs were randomly assigned to receive either glucocorticoids alone, or combined with cyclosporine or mycophenolate mofetil. In contrast to our initial hypothesis, administration of a combined protocol did not significantly improve the hematological response of enrolled dogs in any of the three timepoints considered (T14, T30, T60), when compared to glucocorticoid monotherapy. In this regard, the hematological recovery of our study population was relatively slow: specifically, a low percentage of dogs (26% and 7%, respectively) achieved a partial or complete response during the first month of treatment, and less than half of the study population fulfilled the criteria for complete or partial hematological recovery after 2 months of treatment. Concurrent comorbidities or treatment-related complications, including systemic inflammation leading to defective erythropoiesis, may have accounted for a delayed hematological recovery. These findings could also highlight a chronic course of naIMHA in a significant number of dogs included in the study, in which hemolysis and anemia could require several weeks to completely recover, regardless of the underlying treatment.

After 2 months of therapy, 54% of dogs failed to reach any of the afore-mentioned endpoints for hematological recovery. The high percentage of NR dogs could potentially indicate a poor efficacy of the therapeutic protocols used in this study. It should be mentioned, however, that there is no consensus on the criteria to define hematological recovery in dogs with IMHA, and the ones used to define CHR or PHR in our study were fairly restrictive. Only a previous veterinary study compared the hematological response of different immunosuppressive protocols in canine IMHA. In that study,

92/149 dogs treated with azathioprine and prednisolone were classified as improved or completely recovered at a median of 25 (range 2-83) days after the initiation of therapy.<sup>6</sup> However, less restrictive hematological endpoints were used precluding any meaningful comparison with our findings. Furthermore, the cited study had some biases as underlined by the Authors themselves (e.g., retrospective nature, incomplete description of treatment regimens, weak inclusion criteria, variable response evaluation time).<sup>6</sup> In human medicine, a recent systematic review<sup>35</sup> of the literature observed that the terminology for assessing the response to treatment of autoimmune hemolytic anemia was inconsistent among studies, and in 2020 the first Autoimmune Hemolytic Anemia International Consensus Group proposed standard criteria and response definitions.<sup>36</sup> Although the criteria used in our study conceptually approximate the human model, further veterinary studies should define standard criteria to monitor the hematological recovery in canine IMHA, aiming at simplifying comparison of studies and applying published evidence to therapeutic decision-making.

In our study, short-term survival rate, evaluated at discharge, did not differ among the three therapeutic groups and between dogs treated with glucocorticoid monotherapy and those treated with combined protocols. In our opinion, this is likely due to the fact that during the initial phase of the disease the therapeutic benefit is mainly related to glucocorticoids administration, given the longer expected time of onset of cyclosporine and MMF effect in dogs.<sup>37,38</sup> With regard to the medium (T60) and long-term (T365) survival rate, the comparison between steroids and combined therapy groups did not lead to a significant difference. However, when dogs were divided according to the specific treatment group, the combination of cyclosporine and methylprednisolone was associated with higher survival rates at both timepoints. A previous retrospective study failed to document a significant difference in the percentage of mortality at 1 month or 1 year after discharge in dogs treated with single-agent prednisolone versus combined protocols including cyclosporine.<sup>3</sup> However, the same study was limited by incomplete description of treatment regimens. Furthermore, in the cited study, some dogs belonging to the cyclosporine group also received single injections of cyclophosphamide, which was potentially detrimental to long term prognosis.<sup>3,4</sup> Future studies would be useful to

investigate and confirm the beneficial clinical effect of the combination of cyclosporine and corticosteroids arisen from our study.

In our study population, the mortality rate at 1 year after diagnosis was 25%, which is lower than previously reported<sup>1,3,39-42</sup>, but in line with more recent publications.<sup>43,44</sup> This finding could suggest that, to date, better outcomes can be achieved in dogs treated with standardized therapeutic approaches and undergoing supportive treatment strategies and strict monitoring. Among the non-survivors (n=10), five dogs died during the first two weeks after diagnosis and the majority of the others (n=3) within the first month. Six dogs died because of thrombosis or infections, whereas three died due to the persistence of hemolysis and severe hypoxia. One dog died suddenly without an identified cause and following an apparent hematological stabilization. Unfortunately, the impossibility to perform a necropsy did not allow us to categorize this event. Seven out of ten deceased dogs were in the MM-group and, of these, four died because of infectious complications. Although there was no significant difference in outcome between MM and M-group, this result deserves consideration, requires assessment in a larger population and could suggest that more caution is needed when MMF is administered as a second-line immunosuppressive drug.

In people with hematologic disorders, a higher infectious risk is reported in patients treated with immunosuppressive drugs.<sup>45</sup> In our study, overall side effects were observed in 83% of dogs, similarly to another recent study.<sup>28</sup> Minor complications, such as polyuria and polydipsia, polyphagia, dermatological signs, and muscle atrophy, were observed in 46% of dogs, in line with previously reported side effects observed among dogs undergoing chronic glucocorticoid therapy.<sup>46-49</sup> Notably, almost half of the patients (46%) exhibited life-threatening complications which were mainly of infectious (25%), or thromboembolic (17%) origin. The frequency of complications highlighted in our study was similar in the different therapeutic groups. However, the relatively small number of cases may have biased these results and our findings should be further confirmed.

Except for UPC results, no other significant differences in clinicopathological endpoints (i.e., normalization of AT and CRP) were observed among groups. The normalization of UPC in MC and MM dogs occurred significantly slower than in M dogs ( $P=.007$ ). This finding could possibly be attributable to a preexisting kidney injury worsened by cyclosporine or MMF or to de novo induced nephrotoxicity. In humans, cyclosporine can cause both acute and chronic nephrotoxicity due to thrombotic microangiopathy, tubular vacuolization and fibrosis,<sup>50</sup> mirroring murine data.<sup>51,52</sup> Cyclosporine-induced nephrotoxicity is only rarely reported in dogs and cats,<sup>53,54</sup> being dose-dependent and usually observed at higher doses.<sup>55,56</sup> Renal damage with azotemia was not documented in the overall population, and no significant differences in renal function were observed among groups upon admission. Nevertheless, the development of subclinical kidney injury during long-standing combined immunosuppressive treatments cannot be excluded. In the future, a specific evaluation of renal function in this clinical context may be warranted to provide valuable data to support this correlation.

To date, there is no uniformity in predicting or objectifying the severity of naIMHA.<sup>43,57</sup> The APPLEfast score has been used in hospitalized dogs with systemic inflammation demonstrating a highly accurate prediction of mortality in critically ill dogs,<sup>58-60</sup> and it was applied in our study as a method to categorize illness severity. This scoring system includes perfusion indices (such as blood lactate) and platelets, which have already been mentioned as possible prognostic factors in dogs with IMHA.<sup>39</sup> A more extended version of this score, the acute patient physiologic and laboratory evaluation, has been applied in a canine IMHA study, recently.<sup>61</sup> Although these scoring systems have not been validated specifically for this hematological context, the application of these indexes, in our opinion, could improve the current clinical stratification limits of dogs with IMHA, and allow more objective comparisons during clinical trials.

There are limitations that should be considered when interpreting our results. The inclusion criteria of this study were established before the recent American College of Veterinary Internal Medicine

(ACVIM) Consensus Statement on the diagnosis of IMHA<sup>2</sup> and were based on the documentation of anemia (HCT <37%) and at least one sign of immune-mediated erythrocyte destruction (positive SAT, observation of spherocytosis on blood smear, positive Coombs' test), in patients with a suggestive clinical presentation. Seven dogs had only one of the proposed diagnostic criteria to assess the presence of RBCs autoantibodies. Based on the recent Consensus Statement,<sup>2</sup> the diagnosis of IMHA would only be likely in these dogs. However, all of them had signs of hemolysis, an underlying cause of hemolytic anemia was not identified through rigorous search, and all responded to immunosuppression with a favorable course. Although the therapeutic protocols used in our study are in line with the recent guidelines, two aspects differ. Firstly, methylprednisolone was used as first line immunosuppressive drug due to the availability of an injectable solution, which is simpler to administer in the early stages of the disease when patients do not tolerate oral drug administration. This molecule, maintained in all dogs after discharge through oral formulation, is commonly marketed in Europe and has previously been described in the treatment of human autoimmune hemolytic anemia.<sup>62</sup> Furthermore, methylprednisolone has a similar anti-inflammatory potency to prednisolone and prednisone.<sup>63-65</sup> The choice to use a lower dose of cyclosporine (2.5 mg/kg q12h), compared to the one that has been recommended in the ACVIM consensus statement<sup>4</sup>, represents the second difference in the therapeutic protocols set in our study. This dose is however still considered therapeutic according to previous IMHA studies in which prednisolone and cyclosporine were combined, and may expose the patient to fewer complications.<sup>3,66</sup> Additionally, no tentative was made to categorize IMHA cases into intra- or extra-vascular, autoantibody class, acute or chronic, presence or absence of bone marrow compensation; as previously reported,<sup>67</sup> these pathogenetic entities may have different therapeutic responses and outcome and may need an ad hoc therapeutic and prognostic evaluation. Finally sample size was estimated hypothesizing a difference of HR between steroids alone and combined therapy groups of 40%. Based on our data, this difference was not reached a posteriori. For this reason, negative results arising from our study should be interpreted with caution. This bias should be overcome through future larger trials.

In conclusion, dogs with naIMHA undergoing combined immunosuppressive therapy seem not to have a better hematological response if compared with dogs treated with corticosteroids alone. However, dogs treated with a combination of cyclosporine and methylprednisolone seem to have a higher survival. Further prospective investigations including a larger number of patients are required to confirm these data and to better identify reliable markers of hematological treatment response in canine naIMHA.

## **Bibliography**

1. Piek CJ. Canine idiopathic immune-mediated haemolytic anaemia: a review with recommendations for future research. *Vet Q* 2011; 31(3):129-141.
2. Garden OA, Kidd L, Mexas AM, et al. ACVIM Consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2019; 33(2):313-334.
3. Swann JV, Skelly BJ. Evaluation of immunosuppressive regimens for immune-mediated haemolytic anaemia: a retrospective study of 42 dogs. *J Small Anim Pract* 2011; 52(7):353-358.
4. Swann JV, Garden OA, Fellman CL, et al. ACVIM Consensus statement on the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J Vet Intern Med* 2019; 33(3):1141-1172.
5. Whitley NT, Day MJ. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *J Small Anim Pract* 2011; 52(2):70-85.
6. Piek CJ, Van Spil WE, Junius G, et al. Lack of evidence of a beneficial effect of azathioprine in dogs treated with prednisolone for immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective cohort study. *BMC Vet Res* 2011; 7(1):15.
7. Swann JW, Skelly BJ. Systematic review of evidence relating to the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J Vet Intern Med* 2013; 27(1):1-9.
8. Wang A, Smith JR, Creevy KE. Treatment of canine immune-mediated haemolytic anaemia with mycophenolate mofetil and glucocorticoids: 30 cases (2007 to 2011). *J Small Anim Pract* 2013; 54(8):399-404.
9. Piek C. Immune-Mediated Hemolytic Anemias and Other Regenerative Anemias. In: Ettinger JE, Feldman EC: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 8th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2015: 2078-2099.

10. Day MJ, Mackin AJ. Immune-mediated haematological disease. In: Day MJ. Clinical immunology of the dog and the cat. 2nd ed. London, UK: Manson Publishing Ltd, 2011: 94-120.
11. Caviezel LL, Raj K, Giger U. Comparison of 4 direct Coombs' test methods with polyclonal antiglobulins in anemic and nonanemic dogs for in-clinic or laboratory use. *J Vet Intern Med* 2014; 28(2):583-591.
12. Villiers E. Disorders of erythrocytes. In: Villiers E, Ristić J. BSAVA Manual of canine and feline clinical pathology. 3rd ed. Waterwalls business park, Quedgeley, GL: British Small Animal Veterinary Association, 2014: 38-66.
13. Paes G, Paepe D, Meyer E, et al. The use of the rapid osmotic fragility test as an additional test to diagnose canine immune-mediated haemolytic anaemia. *Acta Vet Scand.* 2013; 55(1):74.
14. Czock D, Keller F, Rasche FM, et al. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet* 2005; 44(1):61-98.
15. Swann JW, Skelly BJ. Canine autoimmune hemolytic anemia: management challenges. *Vet Med (Auckl)* 2016; 7:101-112.
16. Random.org □Internet□. Available from: <https://www.random.org>.
17. Goggs R, Bacek L, Bianco D, Koenigshof A, Li RHL. Consensus on the Rational Use of Antithrombotics in Veterinary Critical Care (CURATIVE): Domain 2-Defining rational therapeutic usage. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2019;29(1):49-59.
18. Blais MC, Bianco D, Goggs R, et al. Consensus on the Rational Use of Antithrombotics in Veterinary Critical Care (CURATIVE): Domain 3-Defining antithrombotic protocols. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2019; 29(1):60-74.

19. Hayes G, Mathews K, Doig G, et al. The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24(5):1034-1047.
20. Haskins SC. Hypoxemia. In: Silverstein DC, Hopper K. *Small animal critical care medicine*. 2nd ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2015: 81-86.
21. Ralph AG, Brainard BM. Hypercoagulable states. In: Silverstein DC, Hopper K. *Small animal critical care medicine*. 2nd ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2015: 541-554.
22. DeLaforcade A, Bacek L, Blais MC, et al. Consensus on the Rationale Use of Antithrombotics in Veterinary Critical Care (CURATIVE): Domain 1 – Defining population at risk. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2019; 29:37-48.
23. Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg* 1997; 26(5):393-397.
24. Troia R, Ciuffoli E, Vasylyeva K, et al. Circulating methemoglobin fraction in dogs with sepsis. *Front Vet Sci* 2020; 7:341.
25. Huang HP, Yang HL, Liang SL, et al. Iatrogenic hyperadrenocorticism in 28 dogs. *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35(3):200-207.
26. Whittemore JC, Mooney AP, Price JM, et al. Clinical, clinicopathologic, and gastrointestinal changes from administration of clopidogrel, prednisone, or combination in healthy dogs: A double-blind randomized trial. *J Vet Intern Med* 2019; 33(6):2618-2627.
27. Stockham SL, Scott MA. Urinary system. In: Stockham SL, Scott MA. *Foundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008: 708–871.
28. Weingart C, Thielemann D, Kohn B. Primary immune-mediated haemolytic anaemia: a retrospective long-term study in 61 dogs. *Aust Vet J* 2019; 97(12):483-489.

29. Tvedten H. Laboratory and clinical diagnosis of anemia. In: Weiss DJ, Wardrop J. Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Iowa, MO: Wiley-Blackwell, 2010: 152-161.
30. Couto CG. Anemia. In: Nelson RW, Couto CG. Small Animal Internal Medicine. 5th ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2014: 1201-1219.
31. Ni J, Zhu W, Whang Y, et al. A reference chart for clinical biochemical tests of hemolyzed serum samples J Clin Lab Anal 2021; 35(1):23561.
32. Schuller S, Francey T, Hartmann K, et al. European consensus statement on leptospirosis in dogs and cats. J Small Anim Pract 2015; 56(3):159-179.
33. Troia R, Balboni A, Zamagni S, et al. Prospective evaluation of rapid point-of-care tests for the diagnosis of acute leptospirosis in dogs. Vet J 2018; 237:37-42.
34. Farwell GE, LeGrand EK, Cobb CC. Clinical observations of Babesia gibsoni and Babesia canis infections in dogs. J Am Vet Med Assoc. 1982; 180: 507-511.
35. Hill QA, Hill A, Berentsen S. Defining autoimmune hemolytic anemia: a systematic review of the terminology used for diagnosis and treatment. Blood Adv.2019; 3:1897–906.
36. Jäger U, Barcellini W, Broome CM, et al. Diagnosis and treatment of autoimmune hemolytic anemia in adults: Recommendations from the First International Consensus Meeting. Blood Rev. 2020; 41:100648.
37. Boothe DM. Immunomodulators or biological response modifiers: introduction and miscellaneous agents. In Boothe DM. Small animal clinical pharmacology and therapeutics. 2nd ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2012: 1150-1192.
38. Mulligan C, Seo CS, Kaplan B, et al. Oral mycophenolate mophetil, dose escalation trial assessing adverse effects and pharmacodynamic responses in normal dogs. Proceedings of the 34th ACVIM congress; 2017 Jun 8-9; National Harbor, Maryland, USA.

39. Ralph AG, Brainard BM. Hypercoagulable states. In: Silverstein DC, Hopper K. Small animal critical care medicine. 2nd ed. St Louis, MO: Elsevier Saunders, 2015: 541-554.
40. Reimer ME, Troy GC, Warnick LD. Immune-mediated hemolytic anemia: 70 cases (1988-1996). *J Am Anim Hosp Assoc* 1999; 35(3):384-391.
41. Carr AP, Panciera DL, Kidd L. Prognostic factors for mortality and thromboembolism in canine immune-mediated hemolytic anemia: a retrospective study of 72 dogs. *J Vet Intern Med* 2002; 16(5):504-509.
42. Goggs R, Boag AK, Chan DL. Concurrent immune-mediated hemolytic anaemia and severe thrombocytopenia in 21 dogs. *Vet Rec* 2008; 163(11):323-327.
43. Goggs R, Dennis SG, Di Bella A, et al. Predicting outcome in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia: results of a multicenter case registry. *J Vet Intern Med* 2015; 29(6):1603-1610.
44. Bestwick JP, Sharman M, Whitley NT, et al. The use of high-dose immunoglobulin M-enriched human immunoglobulin in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* 2022;36(1):78-85.
45. Barcellini W, Fattizzo B, Zaninoni A, et al. Clinical heterogeneity and predictors of outcome in primary autoimmune hemolytic anemia: A GIMEMA Study of 308 Patients. *Blood* 2014; 124(19):2930–2936.
46. McDonough AK, Curtis JR, Saag KG. The epidemiology of glucocorticoid-associated adverse events. *Curr Opin Rheumatol* 2008; 20(2):131-137.
47. Dye TL, Diehl KJ, Wheeler SL, et al. Randomized, controlled trial of budesonide and prednisone for the treatment of idiopathic inflammatory bowel disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2013; 27(6):1385-1391.

48. Rhoades AC, Vernau W, Kass PH, et al. Comparison of the efficacy of prednisone and cyclosporine for treatment of dogs with primary immune-mediated polyarthritis. *J Am Vet Med Assoc* 2016; 248(4):395-404.
49. Masters AK, Berger DJ, Ware WA, et al. Effects of short-term anti-inflammatory glucocorticoid treatment on clinicopathologic, echocardiographic, and hemodynamic variables in systemically healthy dogs. *Am J Vet Res* 2018; 79(4):411-423.
50. Naesens M, Kuypers DRJ, Sarwal M. Calcineurin inhibitor nephrotoxicity. *Clin J Am Soc Nephrol* 2009; 4(2):481-508.
51. Yüce A, Ateşşahin A, Ceribaşı AO. Amelioration of cyclosporine A-induced renal, hepatic and cardiac damages by ellagic acid in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2008; 103(2):186-191.
52. Gökce A, Süleyman O, Yönden Z, et al. Protective effect of caffeic acid phenethyl ester on cyclosporine A-induced nephrotoxicity in rats. *Ren Fail* 2009; 31(9):843-847.
53. Aronson LR, Gregory C. Possible hemolytic uremic syndrome in three cats after renal transplantation and cyclosporine therapy. *Vet Surg* 1999; 28(3):135-140.
54. Archer TM, Boothe DM, Langston VC, et al. Oral cyclosporine treatment in dogs: a review of the literature. *J Vet Intern Med* 2014; 28(1):1-20.
55. Robson D. Review of the pharmacokinetics, interactions and adverse reactions of cyclosporine in people, dogs and cats. *Vet Rec* 2003; 152(24):739-748.
56. Segev G, Cowgill LD. Treatment of acute kidney injury associated with cyclosporine overdose in a dog using hemodialysis and charcoal hemoperfusion. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2018; 28(2):163-167.
57. Swann JW, Skelly BJ. Systematic review of prognostic factors for mortality in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med* 2015; 29(1):7-13.

58. Holowaychuk MK, Hanel RM, Wood RD, et al. Prospective multicenter evaluation of coagulation abnormalities in dogs following severe acute trauma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2014; 24(1):93-104.
59. Giunti M, Troia R, Bergamini Famigli P, et al. Prospective evaluation of the acute patient physiologic and laboratory evaluation score and an extended clinicopathological profile in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)* 2015; 25(2):226-233.
60. Wainberg SH, Brisson BA, Reabel SN, et al. Evaluation of risk factors for mortality in dogs with lung lobe torsion: A retrospective study of 66 dogs (2000-2015). *Can Vet J* 2019; 60(2):167-173.
61. Cuq B, Blois SL, Bédard C, et al. Serum interleukin 17 concentrations in dogs with immune-mediated hemolytic anemia. *J Vet Intern Med.* 2021;35(1):217-225.
62. Barcellini W, Zaninoni A, Giannotta JA, Fattizzo B. New Insights in Autoimmune Hemolytic Anemia: From Pathogenesis to Therapy Stage. *J Clin Med.* 2020; 9(12):3859-3878.
63. Boothe DM, Mealey KA. Glucocorticoids and mineralocorticoids. In: Boothe DM. ed. *Small Animal Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2nd edn. St. Louis, MO: Saunders; 2012, 1119–1149.
64. Notari L, Kirton R, Mills DS. Psycho-Behavioural Changes in Dogs Treated with Corticosteroids: A Clinical Behaviour Perspective. *Animals (Basel).* 2022; 26;12(5):592-604.
65. Aharon MA, Prittie JE, Buriko K. A review of associated controversies surrounding glucocorticoid use in veterinary emergency and critical care. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio).* 2017; 27(3):267-277.
66. Helmond SE, Polzin DJ, Armstrong PJ, et al. Treatment of immune-mediated hemolytic anemia with individually adjusted heparin dosing in dogs. *J Vet Intern Med* 2010; 24(3):597-605.

67. Goggs R, Rishniw M. Developing randomized clinical trials to evaluate treatment effects in canine IMHA. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2016;26(6):763–5.

## Capitolo 4

---

### TROMBOCITOPENIA IMMUNOMEDIATA DEL CANE E DEL GATTO

Michele Tumbarello, Kateryna Vasylyeva, Chiara Agnoli

*Veterinaria*; accepted (2023)

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie,

Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria,

Bologna

## **Riassunto**

La trombocitopenia immunomediata (ITP) è un disturbo dell'emostasi primaria più frequente nel cane rispetto al gatto. Grazie ai progressi della medicina umana, la comprensione della patogenesi dell'ITP è migliorata anche in medicina veterinaria. Tradizionalmente veniva considerata una malattia mediata da anticorpi, oggi è invece risaputo che l'ITP è una sindrome complessa ed eterogenea, che risulta da una combinazione di distruzione umorale e cellulo-mediata sia delle piastrine a livello ematico, sia dei loro precursori, i megacariociti, nel midollo osseo. La trombocitopenia può avere manifestazioni cliniche variabili che vanno da assenza di sintomatologia a grave diatesi emorragica muco-cutanea. Le strategie terapeutiche dovrebbero mirare alla risoluzione dell'eventuale quadro sintomatologico e alla ripresa della funzionalità emostatica; il ripristino di una conta piastrinica "normale" non sempre è un obiettivo terapeutico necessario. *Panel* di esperti stanno ad oggi lavorando sulla definizione di linee guida terapeutiche condivise. Ad oggi la terapia di prima linea prevede l'utilizzo di dosi immunosoppressive di glucocorticoidi. Nei soggetti ritenuti più critici la terapia cortisonica può essere combinata a farmaci immunosoppressivi di seconda linea, e/o a vincristina o immunoglobuline. La terapia deve essere individualizzata al meglio in base alla gravità della malattia per bilanciare il rischio di sanguinamento con i rischi legati all'immunosoppressione.

## **Abstract**

Immune-mediated thrombocytopenia (ITP) is the most common acquired disorder of primary hemostasis in dogs and affects cats too. Thanks to the ITP human knowledge, the understanding of its pathogenesis in veterinary medicine is rapidly improving. ITP has previously been considered an antibody-mediated disease, but today it is known that it is rather a complex and heterogeneous syndrome resulting from a combination of humoral and cell-mediated destruction of platelets in the blood and the destruction of their precursors, the megakaryocytes, in the bone marrow. The resulting thrombocytopenia leads to variable clinical signs, ranging from the absence of symptoms to severe

mucocutaneous bleeding diathesis. Modern treatment strategies should aim to restore an adequate platelet count to support hemostasis, rather than obtaining a “normal” platelet count. Panels of experts are currently working on the definition of shared therapeutic guidelines. First-line therapy involves the use of immunosuppressive doses of glucocorticoids combined, when necessary, with second-line immunosuppressive drugs, with vincristine and/or immunoglobulins in the most critically ill subjects. The best therapy approach should be evaluated according to the severity of the patient's clinical condition, to balance the risk of bleeding with the risks connected with the immunosuppression.

## Trombocitopenia immunomediata: classificazione, epidemiologia e presentazione clinica

Come anticipato nella precedente trattazione, il termine trombocitopenia immunomediata (*Immune Mediated Thrombocytopenia* - ITP) si riferisce ad una condizione patologica nella quale le piastrine, o i loro precursori, sono “distrutti” ad opera del sistema immunitario. Classicamente l’ITP può essere distinta in secondaria o primaria, a seconda che siano o meno individuati una malattia concomitante o un evento potenzialmente scatenante (*trigger*) (Tabella 1).

**Tabella 1:** Trigger e fattori di rischio nella ITP secondaria (modificato da Schalm’s Veterinary Hematology VII ed.).<sup>14</sup>

<b>Categoria</b>	<b>Eziologia</b>
<b>Malattie infettive (cane)</b>	<i>Ehrlichiosi, anaplasmosis, febbre delle montagne rocciose, leishmaniosi, babesiosi, filariosi, leptospirosi, borreliosi, prostatite, piometra/endometrite</i>
<b>Malattie infettive (gatto)</b>	<i>Peritonite infettiva felina, virus della leucemia felina, virus dell’immunodeficienza felina, pielonefrite</i>
<b>Neoplasie (cane)</b>	<i>Linfoma, leucemia, sarcoma istiocitico, emangiosarcoma, tumore delle ghiandole mammarie</i>
<b>Neoplasie (gatto)</b>	<i>Linfoma, leucemia</i>
<b>Farmaci (cane)</b>	<i>Sulfamidici, cefazedone, carprofen</i>
<b>Farmaci (gatto)</b>	<i>Propiltiouracile</i>
<b>Malattie infiammatorie (cane)</b>	<i>Epatite, pancreatite, sindrome da risposta infiammatoria sistemica</i>
<b>Malattie infiammatorie (gatto)</b>	<i>Epatite, steatonecrosi</i>

I cani di qualsiasi età, sesso o razza possono sviluppare una ITP primaria; i soggetti affetti, tuttavia, sono più comunemente cani giovani o giovani-adulti, con un’età mediana di presentazione che varia dai 4 agli 8 anni,<sup>1,2,3,4</sup> e i soggetti di sesso femminile risultano generalmente sovra-rappresentati.<sup>1,2,3</sup>

Le razze predisposte includono cocker spaniel, barboncino e bobtail.<sup>1,2,5,6,7</sup> La reale prevalenza dell'ITP felina non è stata chiaramente definita; l'ITP primaria viene raramente riportata nei gatti, nei quali è più frequente una forma secondaria.<sup>8,9,10,11,12,13,14</sup> Non è chiaro se la IMT primaria si verifichi più sporadicamente nei gatti, o se semplicemente venga diagnosticata meno frequentemente a causa della presunta ridotta tendenza al sanguinamento di questa specie. In un ampio studio retrospettivo, la trombocitopenia è stata segnalata nell'1,2% dei gatti e solo per un paziente è stata confermata un'ITP; tale paziente presentava la conta piastrinica più bassa dei 41 gatti trombocitopenici e marcati sanguinamenti spontanei.<sup>8</sup>

I segni clinici presenti in corso di ITP sono estremamente variabili sia nel cane, sia nel gatto. L'ITP può manifestarsi con forme clinicamente asintomatiche e diagnosticate accidentalmente durante un esame ematologico di *screening*, o con forme nelle quali i pazienti presentano invece sanguinamenti patologici, anche di grado grave. Nonostante l'esame fisico dei pazienti con ITP possa occasionalmente non evidenziare alterazioni, i reperti clinici più tipici includono petecchie ed ecchimosi, sanguinamenti buccali, epistassi, emorragie gastrointestinali (melena, ematochezia ed ematemesi) e/o ematuria.<sup>4,15</sup> Petecchie ed ecchimosi sono particolarmente comuni a livello di mucosa orale, mucosa oculare, padiglioni auricolari e addome. (Figura 1) In tutti i pazienti con ITP è consigliato eseguire un esame approfondito del fondo dell'occhio; spesso, infatti, si verificano emorragie oculari, che vanno da una lieve emorragia sclerale e sanguinamenti retinici puntiformi, a ifema e gravi emorragie retiniche.<sup>16</sup> Possono essere evidenti anche segni clinici correlati all'anemia come pallore mucosale, tachicardia, soffio sistolico e tachipnea. Una grave emorragia che porta ad anemia significativa è più comunemente associata a sanguinamenti gastrointestinali, sebbene possa derivare anche da epistassi ed ematuria.<sup>4,5</sup> Sanguinamenti patologici possono essere osservati anche a seguito dei prelievi ematici. I cani con ITP primaria possono occasionalmente manifestare febbre, che potrebbe essere dovuta al processo immunomediato ma anche a delle comorbidity non diagnosticate o evidenziate;<sup>2,4</sup> inoltre, alla palpazione addominale, si può apprezzare una splenomegalia che solitamente è imputabile a meccanismi di emopoiesi/eritrocateresi.<sup>2</sup> Infine,

sebbene rare, possono verificarsi emorragie intracraniche e del midollo spinale con conseguenti alterazioni dello stato mentale o deficit neurologici localizzati riferibili alla sede dell'emorragia.

Pazienti con analoghe conte piastriniche possono presentare una diversa presentazione clinica. Come già discusso per le trombocitopenie in senso lato, sebbene il sanguinamento spontaneo si verifichi in genere con una conta piastrinica inferiore a 30.000 piastrine/ $\mu$ l, molti pazienti con ITP e con una conta piastrinica inferiore a tale *cut-off*, possono non mostrare segni clinici riferibili alla trombocitopenia. Il numero di piastrine in definitiva non è in grado di prevedere in modo affidabile il rischio di sanguinamento per i singoli pazienti.<sup>15</sup> La causa della variabilità clinica tra i pazienti con conta piastrinica simile è poco compresa e può essere rappresentativa della combinazione di processi patogenetici concomitanti, come l'attivazione piastrinica da parte degli autoanticorpi, interferenza degli anticorpi con la funzione piastrinica,<sup>17,18</sup> alterazioni dell'integrità endoteliale secondarie alla trombocitopenia,<sup>19,20</sup> e presenza di microparticelle procoagulanti circolanti.<sup>21,22</sup> Infine, in merito ai pazienti felini, questi, pur presentando spesso livelli di trombocitopenia marcati, solitamente presentano minori sanguinamenti spontanei rispetto ai cani.<sup>8</sup> Questa inferiore propensione al sanguinamento del gatto con trombocitopenia immunomediata sembra essere correlata al maggiore quantitativo di serotonina, un agonista piastrinico, contenuto nei granuli densi delle piastrine del gatto.<sup>11,23</sup>

**Figura 1:** Emorragie spontanee in corso di trombocitopenia immunomediata.



a) ematuria macroscopica; b): soffiusioni a livello di padiglione auricolare; c) emorragie cutanee nella regione addominale ed inguinale.

### **Trombocitopenia immunomediata: diagnosi clinico-patologica**

L'ITP è sempre una diagnosi complessa e ottenibile ad oggi solo “ad esclusione”.

Come anticipato nella precedente review il primo *step* nel *management* diagnostico dell'ITP è sempre quello di confermare la trombocitopenia attraverso la valutazione microscopica dello striscio di sangue opportunamente allestito e colorato. Ciò permette di constatare la correttezza della lettura automatizzata, verificando direttamente la quantità di piastrine visualizzabili e l'eventuale presenza di loro aggregati. Altre condizioni che dovranno essere prese in considerazione prima di procedere nel protocollo diagnostico di un paziente con una ridotta conta piastrinica sono le specificità di razza<sup>24,25</sup> (es. macrotrombocitopenia del Cavalier King Charles), condizioni para-fisiologiche su base congenita che spesso non comportano rischi e non richiedono alcun trattamento.

Una volta confermata la presenza di una ridotta conta piastrinica non esistono test diagnostici in grado di confermare con una buona specificità la patogenesi immunomediata e per rafforzare il sospetto

diagnostico è necessario escludere la presenza di un consumo, di una mancata produzione e quando possibile di un sequestro.

Sottolineati questi aspetti fondamentali, a seguire saranno affrontati alcuni indicatori ematologici che potrebbero orientare nella diagnosi di ITP.

### **Conta piastrinica:**

Diversi studi hanno riportato che la conta piastrinica risultava significativamente più bassa nei cani con ITP primaria rispetto ai cani con altre cause di trombocitopenia.<sup>6,15,26</sup> Confrontando la ITP primaria con quella secondaria, la trombocitopenia era più grave nei cani con malattia primaria.<sup>15,26</sup> In un paziente con trombocitopenia grave (<20000 piastrine/ $\mu$ l) è pertanto corretto sospettare una forma di ITP; va tuttavia ricordato che questo cut-off non è specifico e non aiuta ad escludere al 100% altre cause di trombocitopenia.<sup>14</sup>

### **Volume piastrinico medio:**

Un volume piastrinico medio (MPV) elevato è generalmente una peculiarità delle piastrine giovani e più attive; tuttavia, studi di validazione di medicina umana non hanno ancora dimostrato l'utilità diagnostica degli indici piastrinici dimensionali nel differenziare le varie cause di trombocitopenia.<sup>27</sup> Anche in medicina veterinaria le opinioni sono controverse. In uno studio è stato riscontrato che i cani con ITP hanno un MPV significativamente più elevato rispetto a dei cani sani appartenenti ad un gruppo di controllo.<sup>28</sup> Altri studi non hanno invece rilevato differenze significative.<sup>29,14</sup> La presenza di un MPV ridotto è stata evidenziata in cani con ITP primaria in uno studio che confrontava cani con ITP con cani trombocitopenici a seguito di cause non immunomediate.<sup>26</sup> Un MPV ridotto può riflettere un'alterata trombopoiesi dovuta alla distruzione mirata dei megacariociti presenti a livello midollare. Con le evidenze attuali è possibile concludere che l'aumento dell'MPV può essere una caratteristica dell'ITP in alcuni casi, ma il riscontro di un MPV da normale a basso non esclude questa diagnosi.<sup>14</sup>

### **Piastrinocrito:**

I pazienti con una conta piastrinica inferiore al *range* di normalità, ma con aumento del valore piastrinico medio e un piastrinocrito normale sono in grado di conservare la propria capacità emostatica. La determinazione del piastrinocrito come misura della “massa piastrinica totale” è stata descritta come un test utile per differenziare trombocitopenia clinicamente rilevante da forme parafisiologiche di macrotrombocitopenia, e in particolare dalla macrotrombocitopenia ereditaria nel Cavalier King Charles Spaniels.<sup>30</sup>

### **Anticorpi anti-piastrine:**

Gli anticorpi diretti contro gli antigeni piastrinici (PAIg), svolgono un ruolo chiave nella patogenesi della trombocitopenia; attualmente la valutazione di questo parametro non è tuttavia inclusa nei criteri diagnostici dell’ITP dell’uomo poiché complessivamente le *performance* dei test disponibili risultano ancora non ottimali (limiti di sensibilità e specificità).<sup>31</sup> In particolare, per quanto riguarda la sensibilità, in medicina umana, fino al 40% dei pazienti con ITP non possiede PAIg rilevabili, presumibilmente a causa del ruolo dei linfociti T citotossici nel mediare la distruzione piastrinica.<sup>32</sup> La specificità è invece limitata dalla presenza a livello piastrinico di legami anticorpali non specifici che complicano l’interpretazione di risultati positivi.<sup>14</sup> Anche nel cane, la misurazione dei PAIg è aspecifica e non è inoltre in grado di differenziare l’ITP primaria da quella secondaria.<sup>33</sup> Studi recenti consigliano di utilizzare eventualmente questi PAIg per predire la recidiva della malattia.<sup>34</sup>

Diverse tipologie di test rilevano anticorpi anti-piastrinici circolanti (metodi indiretti) e PAIg legati alla membrana piastrinica (metodi diretti). I metodi di analisi diretta sono generalmente più sensibili rispetto a quelli indiretti.<sup>35,36</sup> In medicina umana, la specificità del dosaggio anticorpale migliora notevolmente misurando autoanticorpi diretti contro specifici antigeni piastrinici. Gli antigeni piastrinici oggetto dell’attacco anticorpale includono principalmente GPIIb/IIIa (CD41/CD61, recettore del fibrinogeno), GPIb/IX (CD42c/CD42a, recettore del fattore di von Willebrand) e GPV (CD42d).<sup>36</sup> Studi di medicina umana condotti sui pazienti con ITP rivelano che gli anticorpi mirati a

GPIIb/IIIa sono i più comuni, riscontrati in circa il 70-80% dei pazienti, mentre anticorpi anti-GpIb sono stati rilevati nel 20-40% dei pazienti.<sup>37</sup> Nel cane, un solo studio valuta la tipologia degli antigeni piastrinici coinvolti in corso di ITP, identificando anticorpi anti-GPIIb e GPIIIa nel siero di 4 /17 (24%) pazienti.<sup>38</sup>

### **Esame citologico del sangue midollare:**

Questa valutazione nei cani con presunta ITP ad oggi non è abitualmente raccomandata, in quanto non sembra fornire informazioni diagnostiche o prognostiche precise.<sup>4,39</sup> Le possibili indicazioni per eseguire un prelievo di midollo osseo e la valutazione citologica del sangue midollare nei pazienti con ITP includono: la scarsa risposta alla terapia immunosoppressiva, la presenza di citopenie multiple, la ricerca di possibili neoplasie emolinfoproliferative occulte. Eseguire un prelievo di sangue midollare in un paziente affetto da grave trombocitopenia non si accompagna a elevati rischi e generalmente una buona compressione del sito di prelievo è l'unica accortezza necessaria per contrastare il sanguinamento dei tessuti molli locali.

### **Ulteriori accertamenti clinico patologici:**

Una volta ipotizzata una patogenesi immunomediata, l'ITP primaria deve essere distinta dall'ITP secondaria, indotta da agenti infettivi, farmaci, processi infiammatori o neoplasie.<sup>14</sup> Questa distinzione è molto importante sia a fini terapeutici, sia prognostici. Fra le valutazioni utilizzabili per escludere cause secondarie di ITP ricordiamo (oltre ad un'accurata anamnesi farmacologica ed ambientale), il profilo di chimica clinica, l'analisi delle urine, e lo *screening* per patologie infettive trasmesse da vettore. La raccomandazione, in merito ai test infettivi, è quella di combinare test molecolari (PCR) e test sierologici al fine di migliorare la sensibilità delle indagini.<sup>40</sup> Uno studio recente ha infatti documentato come la combinazione di queste metodologie (sierologica e molecolare) aumentati la sensibilità diagnostica fino al 58%.<sup>40</sup> Non vi è, tuttavia, ancora adeguata evidenza scientifica su quali malattie possano avere una forte associazione causale con l'ITP nel cane e nel gatto, e pertanto la scelta di quali valutazioni eseguire deve basarsi sulla storia del paziente.

Oltre alle valutazioni clinico patologiche descritte, infine è importante sottolineare l'importanza delle indagini di diagnostica per immagini. Radiografie del torace, ed esame ecografico dell'addome in particolare, permettono di evidenziare eventuali condizioni infiammatorie e infettive, nonché neoplastiche, occulte.

## **Terapia e prognosi**

### **Trattare il paziente ITP stabile**

Sia in medicina veterinaria che in medicina umana i pazienti possono presentare trombocitopenie di grado variabile. Come anticipato, la gravità della trombocitopenia non è un indice predittivo del rischio di sanguinamento. Infatti, alcuni pazienti con una conta piastrinica più elevata richiedono un ampio supporto trasfusionale, mentre altri, con conta piastrinica inferiore a 20.000 piastrine/uL, non manifestano sanguinamenti o presentano petecchie come unico segno clinico.<sup>14</sup> Una domanda che ritroveremo anche nel seguito della trattazione è: tutti i pazienti richiedono una terapia immunosoppressiva standard?

L'immunosoppressione con glucocorticoidi, somministrati ad alti dosaggi e a lungo termine, talvolta in combinazione con agenti immunosoppressivi aggiuntivi (o di seconda linea), rappresenta tradizionalmente il cardine del trattamento dell'ITP primaria nel cane e nel gatto. Il prednisone è generalmente somministrato, a dosaggi a scalare, a partire da 2 mg/kg/die o 50-60 mg/m<sup>2</sup> nei pazienti di peso superiore a 25 kg, nel cane. La terapia con prednisone somministrato una volta al giorno, rispetto alla terapia frazionata, potrebbe essere associata in alcuni casi a un minor numero di effetti collaterali.<sup>41</sup> I gatti hanno un inefficiente assorbimento del prednisone; quindi, il prednisolone dovrebbe essere preferito al prednisone per il trattamento della ITP felina, i dosaggi di partenza sono analoghi a quelli descritti per il cane o leggermente più elevati.<sup>42</sup> Per quanto riguarda l'utilizzo di altri immunosoppressori in associazione ai glucocorticoidi, attualmente non ci sono studi prospettici in grado di determinare né se la terapia combinata sia più efficace della sola terapia steroidea, né quale

farmaco sia eventualmente la migliore seconda linea. Indicazioni empiriche per l'utilizzo di immunosoppressori aggiuntivi nel cane affetto da ITP possono includere la presenza di gravi diatesi emorragiche che richiedono un continuo supporto trasfusionale, o pazienti di peso > 25 kg; cani di grande taglia potrebbero infatti essere più sensibili agli effetti collaterali dei glucocorticoidi.<sup>14</sup>

I farmaci immunosoppressori di seconda linea comunemente utilizzati nei pazienti canini sono la ciclosporina, l'azatioprina e il micofenolato mofetile. L'azatioprina non deve invece essere mai somministrata nei gatti a causa dei gravi effetti tossici in tale specie. Questi sono dovuti alle ridotte concentrazioni di tiopurina metiltransferasi del gatto e alla sua ridotta capacità di metabolizzazione del farmaco.<sup>43</sup>

In medicina veterinaria, l'efficacia di ciclosporina, azatioprina e micofenolato mofetile non è stata analizzata comparativamente e pertanto non esistono indicazioni precise in merito. Non esistono, come anticipato, studi in grado di guidare il veterinario nella selezione di un secondo immunosoppressore, né prove di beneficio per la terapia immunosoppressiva combinata con più di due agenti immunosoppressivi.<sup>4</sup> Proprio per iniziare a colmare questo *gap*, attualmente, un gruppo di esperti veterinari facenti parte dell'*ITP Consensus Panel*, sta valutando sistematicamente la letteratura per stilare delle linee guida dedicate all'ITP e al suo trattamento. Un punto molto importante sul quale il panel sta lavorando è rappresentato dal target terapeutico. In un paziente con ITP stabile, la conta piastrinica deve essere normale o il target terapeutico potrebbe essere il raggiungimento di una conta piastrinica sufficiente a non determinare sanguinamenti spontanei, come già di prassi avviene in medicina umana? Nella attuale gestione terapeutica dei cani e gatti con ITP, solitamente, ci si pone l'obiettivo di normalizzare la conta piastrinica. Verosimilmente l'aumento delle conoscenze in quest'ambito permetterà di considerare adeguato un target piastrinico inferiore per ridurre al minimo gli effetti collaterali di una terapia immunosoppressiva prolungata.

## **Trattare il paziente ITP con diatesi emorragica**

L'approccio al paziente affetto da ITP che presenta sanguinamenti spontanei (tratto gastroenterico, respiratorio o sistema nervoso centrale) dovrebbe essere più aggressivo. Ad oggi, in questi tipi di pazienti si prospettano in particolare due opzioni terapeutiche aggiuntive. Vincristina e immunoglobuline umane (IVIg), somministrate per via endovenosa hanno dimostrato di potere aumentare rapidamente la conta piastrinica nei cani con ITP e sono farmaci indicati nei pazienti con gravi sanguinamenti e in pericolo di vita. La vincristina è un farmaco citotossico, comunemente utilizzato in ambito oncologico, che aumenta la conta piastrinica sia agendo sulla trombopoiesi (attraverso l'inibizione della polimerizzazione dei microtubuli dei megacariociti), sia inibendo la distruzione piastrinica operata dai macrofagi.<sup>44</sup> In uno studio prospettico condotto su cani affetti da grave ITP, un'unica somministrazione endovenosa di vincristina (al dosaggio di 0,02 mg/kg) in combinazione con prednisone è stata associata a un aumento più rapido della conta piastrinica e a un tempo di ospedalizzazione ridotto, rispetto ai pazienti trattati con solo prednisone. È importante sottolineare però che lo studio non ha evidenziato differenze significative nei due gruppi terapeutici, in termini di sopravvivenza.<sup>45</sup> Alcuni autori hanno in passato messo in discussione la capacità emostatica delle piastrine indotte dalla vincristina; tuttavia, uno studio recente basato su tecniche citofluorimetriche, ha testimoniato che le piastrine reticolate (giovani) indotte dalla vincristina sono ugualmente funzionali.<sup>46</sup> La vincristina è un farmaco facilmente reperibile e poco costoso, tuttavia la sua somministrazione è resa complessa dai notevoli rischi che l'operatore corre nel maneggiarla, è pertanto importante che la sua preparazione e somministrazione avvenga in maniera protetta grazie all'utilizzo di appositi presidi per la somministrazione delle sostanze citotossiche e dispositivi di protezione individuale (Figura 2). Poiché inoltre, per i primi giorni dopo la somministrazione di vincristina, metaboliti attivi del farmaco possono essere eliminati principalmente attraverso le urine, il personale medico a contatto con il paziente e i proprietari, devono essere correttamente informati dei rischi e delle procedure da utilizzare.

**Figura 2:** Somministrazione endovenosa di vincristina mediante sistema chiuso e dispositivi di protezione individuale in un cane affetto da ITP.



IVIg è invece un plasmaderivato di derivazione umana, costituito principalmente da *pool* di IgG di donatori sani. Il meccanismo d'azione delle IVIg nell'ITP è probabilmente multifattoriale, ma principalmente si basa sul blocco della *clearance* piastrinica mediata da anticorpi attraverso la saturazione dei recettori Fc dei macrofagi.<sup>47</sup> Altri meccanismi includono la regolazione dei linfociti T reg e l'inibizione della produzione di autoanticorpi.<sup>47</sup> Uno studio clinico prospettico sulla ITP canina ha dimostrato che il trattamento con IVIg combinato con prednisone ha ridotto il tempo per raggiungere una conta piastrinica target e la durata dell'ospedalizzazione rispetto al solo trattamento con prednisone.<sup>48</sup> Uno studio successivo ha dimostrato che vincristina e IVIg sono ugualmente efficaci nel ridurre i tempi di ripristino di conta piastrinica normale e la durata dell'ospedalizzazione nei cani con ITP.<sup>44</sup> A causa dell'elevato costo delle IVIg, la vincristina in Italia è solitamente la prima

terapia a cui si fa ricorso in casi selezionati di ITP primaria. In quadri clinici molto gravi, queste terapie possono essere utilizzate in combinazione.<sup>14</sup>

### **Nuove frontiere terapeutiche**

In medicina umana, i trattamenti di prima linea dell'ITP si basano sulla somministrazione di brevi cicli di corticosteroidi e IVIg; le terapie di seconda linea includono, fra le varie, splenectomia e utilizzo di agonisti del recettore per la trombopoietina (TPO).<sup>49</sup> In particolare, l'utilizzo degli agonisti del recettore per la TPO, romiplostim ed eltrombopag, ha rivoluzionato il trattamento dell'ITP nell'uomo negli ultimi decenni. In medicina veterinaria, purtroppo non si hanno molte informazioni riguardo queste molecole. Romiplostim sembra interagisce con una regione del recettore canino del TPO in maniera simile alla proteina umana, ed è stato utilizzato con successo in uno studio pilota su cinque cani affetti da ITP.<sup>50</sup> A causa degli attuali limiti diagnostici, tuttavia, non è noto se la TPO sia presente in concentrazioni ridotte nei cani o nei gatti affetti da ITP è quindi ancora difficile prevedere l'utilità di questa categoria di farmaci nel singolo paziente.

Per quanto riguarda la splenectomia invece, i dati sulla sua efficacia nell'ITP canina e felina sono ancora limitati; un recente studio retrospettivo condotto nel cane ha riportato un aumento significativo della conta piastrinica e una percentuale di sopravvivenza a breve termine (20 giorni) dell'80% (12/15 cani), nei pazienti sottoposti a rimozione chirurgica della milza.<sup>51</sup> I risultati di questo studio devono però essere confermati da studi prospettici con più solidi criteri di inclusione e tempi di follow up maggiori.

### **Terapia trasfusionale piastrinica**

Le linee guida della ITP umana raccomandano che le trasfusioni di piastrine siano riservate ai pazienti che presentano diatesi emorragica importante o che dovranno sottoporsi ad una procedura chirurgica invasiva.<sup>49</sup> Sebbene le piastrine trasfuse abbiano infatti sempre un'emivita breve e non determinino un

aumento significativo della conta piastrinica, possono, in alcune occasioni, fornire un supporto emostatico essenziale nei siti critici di sanguinamento.

In medicina veterinaria, i prodotti utilizzabili per la trasfusione delle piastrine includono sangue intero fresco, plasma fresco ricco di piastrine, concentrato piastrinico (il prodotto utilizzato nell' uomo di routine), piastrine crioconservate e un nuovo prodotto piastrinico canino liofilizzato, StablePlateRx™. Non essendo semplice reperire prodotti crioconservati o liofilizzati, attualmente il sangue intero fresco è la fonte di piastrine più prontamente disponibile nella maggior parte dei contesti clinici. È importante ricordare che le piastrine hanno un'emivita breve, pertanto, l'utilizzo di sangue intero conservato non è mai una risorsa di piastrine efficace.

Nella tabella 2 sono riassunti i principali farmaci utilizzati in corso di IMT del cane e del gatto.

**Tabella 2:** Principali opzioni terapeutiche e loro meccanismi d'azione in corso di ITP nel cane e nel gatto.

Terapia	Meccanismo d'azione
<b>Terapie di prima linea</b>	
Corticosteroidi	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibizione della distruzione delle piastrine opsonizzate da parte dei macrofagi</li> <li>- Inibizione della produzione anticorpale</li> <li>- Stimolazione della trombopoiesi</li> </ul>
Vincristina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Accelerata frammentazione dei megacariociti</li> <li>- Inibizione della distruzione piastrinica</li> <li>- Riduzione dell'attività fagica dei macrofagi</li> </ul>
Immunoglobuline umane	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blocco dei recettori Fc dei monociti e macrofagi</li> </ul>
Trasfusione di piastrine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Apporto immediato di piastrine</li> </ul>
<b>Terapie di seconda linea</b>	
Ciclosporina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibizione dell'attività della calcineurina e conseguente riduzione della sintesi di alcune citochine necessarie per la proliferazione e maturazione dei linfociti T</li> </ul>
Micofenolato Mofetile	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibizione dell'inosina monofosfato deidrogenasi, enzima necessario per la sintesi delle purine (inibitore selettivo dei linfociti)</li> </ul>
Azatioprina	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inibizione della sintesi delle purine con conseguente riduzione della proliferazione e attivazione linfocitaria</li> </ul>
Romiplostim, eltrombopag	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Agonisti dei recettori della trombopoietina</li> </ul>
Splenectomia	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Rimozione del principale organo coinvolto nella distruzione delle piastrine opsonizzate</li> </ul>

## Score prognostici dell'ITP

Sia in medicina umana, sia veterinaria, il sanguinamento clinico sembra riflettere meglio la gravità della malattia rispetto al conteggio piastrinico.<sup>15,52</sup> Marker di gravità della malattia validati possono quindi rivelarsi utili nel guidare l'intensità e la tipologia del trattamento. A questo riguardo, per migliorare gli strumenti a nostra disposizione, in medicina umana, i test citofluorimetrici di funzionalità piastrinica, la tromboelastometria e l'IPF assoluto (frazione di piastrine immature), hanno mostrato risultati promettenti nel predire il sanguinamento nei pazienti con ITP.<sup>33,53,54</sup> In medicina veterinaria, in particolare nel cane, sono stati descritti alcuni marker di gravità della malattia, ed è stato sviluppato uno score clinico ad hoc "DOGIBAT".<sup>15</sup> In uno studio retrospettivo su 73 cani, un aumento dell'azoto ureico (BUN) alla diagnosi, è stato associato a una ridotta sopravvivenza.<sup>4</sup> Nello stesso studio, i cani che presentavano melena durante il ricovero avevano inferiori probabilità di sopravvivere alla dimissione (60%) rispetto ai cani senza melena (90%), ed era più probabile che richiedessero un trattamento trasfusionale.<sup>4</sup>

## Prognosi dell'ITP primaria

La prognosi generale per i cani con ITP è buona. La maggior parte dei soggetti raggiunge una conta piastrinica adeguata entro 5-7 giorni dall'inizio della terapia immunosoppressiva, sebbene alcuni pazienti mostrino tempi di recupero prolungati.<sup>4,12,45</sup> Le percentuali di mortalità riportate in letteratura variano dal 10 al 30%.<sup>1,2</sup> Mentre nella maggior parte dei cani il *trial* terapeutico immunosoppressivo può essere sospeso dopo alcuni mesi di terapia (riducendo la dose cortisonica del 25% ogni 2-3 settimane dopo aver confermato una conta piastrinica stabile), altri pazienti possono presentare una recidiva della malattia e richiedere una terapia immunosoppressiva cronica.<sup>2,4,5</sup> Nel cane la percentuale di recidiva riportata per l'ITP nei diversi lavori pubblicati va dal 9 al 58%.<sup>2,4,5</sup> Tuttavia, questo dato andrà riconfermato, poiché molti studi definiscono la recidiva come una qualsiasi diminuzione della conta piastrinica e non necessariamente una diminuzione clinicamente

significativa. Sebbene non sia una malattia comunemente descritta nei gatti, la percentuale di sopravvivenza riportata alla dimissione dall'ospedale per i pazienti felini con ITP primaria è stata dell'85% in uno studio di *Weingart e colleghi*.<sup>13</sup> In una serie di casi clinici descritti retrospettivamente, la maggior parte dei gatti ha avuto una sopravvivenza a lungo termine che variava da 15 mesi a oltre 5 anni; si segnalano in alcuni studi, però, altrettante frequenti recidive, sviluppo di diabete mellito secondario a terapia steroidea cronica<sup>10,12,13</sup>, o infezioni secondarie all'immunodepressione cronica.<sup>9</sup>

## **Bibliografia**

1. Lewis DC, Meyers KM. Canine idiopathic thrombocytopenic purpura. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 10(4):207- 218, 1996.
2. Putsche JC, Kohn B. Primary immune-mediated thrombocytopenia in 30 dogs (1997-2003). *Journal of American Animal Hospital Association* 44(5): 50-257, 2008.
3. Botsch V, Küchenhoff H, Hartmannet K, et al. Retrospective study of 871 dogs with thrombocytopenia. *Veterinary Record* 164(21):647-651, 2009.
4. O'Marra SK, Delaforcade AM, Shaw SP. Treatment and predictors of outcome in dogs with immune- mediated thrombocytopenia. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 238(3):346-352, 2011.
5. Williams DA, Maggio-Price L. Canine idiopathic thrombocytopenia: clinical observations and long-term follow-up in 54 cases. *Journal of American Veterinary Medical Association* 185(6):660-663, 1984.
6. Grindem CB, Breitschwerdt EB, Corbett WT, et al. Epidemiologic survey of thrombocytopenia in dogs: a report on 987 cases. *Veterinary Clinical Pathology* 20(2):38-43, 1991.
7. Lewis DC, Meyers KM, Callan MB et al. Detection of platelet-bound and serum platelet-bindable antibodies for diagnosis of idiopathic thrombocytopenic purpura in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 206(1):47-52, 1995.
8. Jordan HL, Grindem CB, Breitschwerdt EB. Thrombocytopenia in cats: a retrospective study of 41 cases. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 7(5):261-265, 1993.
9. Garon CL, Scott MA, Selting KA, et al. Idiopathic thrombocytopenic purpura in a cat. *Journal of American Veterinary Medical Association* 35(6):464-470, 1999.
10. Tasker S, Mackin AJ, Day MJ. Primary immune-mediated thrombocytopenia in a cat. *Journal of Small Animal Practice* 40(3):127-131, 1999.

11. Kohn B, Linden T, Leibold W. Platelet-bound antibodies detected by a flow cytometric assay in cats with thrombocytopenia. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 8(4):254-260, 2006.
12. Bianco D, Armstrong PJ, Washabau RJ. Presumed primary immune-mediated thrombocytopenia in four cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 10(5):495-500, 2008.
13. Wondratschek C, Weingart C, Kohn B. Primary immune-mediated thrombocytopenia in cats. *Journal of American Veterinary Medical Association* 46(1):12-19, 2010.
14. LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia. In: Brooks MB, Harr KE, Seeling DM et al.: *Schalm's veterinary hematology*, 7th edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2022, pp. 3302-3365.
15. Makielski KM, Brooks MB, Wang C, et al. Development and implementation of a novel immune thrombocytopenia bleeding score for dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 32(3):1041-1050, 2018.
16. Shelah-Goraly M, Aroch I, Kass PH, et al. A prospective study of the association of anemia and thrombocytopenia with ocular lesions in dogs. *Veterinary Journal* 182(2):187-192, 2009.
17. Olsson A, Andersson PO, Tengborn L, et al. Serum from patients with chronic idiopathic thrombocytopenic purpura frequently affect the platelet function. *Thrombosis Research*. 107(3-4):135-139, 2002.
18. De Cuyper IM, Meinders M, Van de Vijver E, et al. A novel flow cytometry-based platelet aggregation assay. *Blood* 121(10):70-80, 2013.
19. Goerge T, Ho-Tin-Noe B, Carbo C, et al. Inflammation induces hemorrhage in thrombocytopenia. *Blood* 111(10):4958-4964, 2008.
20. LeVine DN, Cianciolo RE, Linder KE, et al. Endothelial alterations in a canine model of immune thrombocytopenia. *Platelets* 30(1):88-97, 2019.
21. Jy W, Horstman LL, Arce M, et al. Clinical significance of platelet microparticles in autoimmune thrombocytopenias. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 119(4):334-345, 1992.

22. Tantawy AA, Matter RM, Hamed AA, et al. Platelet microparticles in immune thrombocytopenic purpura in pediatrics. *Pediatric Hematology and Oncology* 27(4):283-296, 2010.
23. Meyers KM, Holmsen H, Seachord CL. Comparative study of platelet dense granule constituents. *American Journal of Physiology* 243(3):454–461, 1982.
24. Campora C, Freeman KP, Serra M, et al. Reference intervals for Greyhounds and Lurchers using the Sysmex XT-2000iV hematology analyzer. *Veterinary Clinical Pathology* 40(4):467–474, 2011.
25. Gelain ME, Bertazzolo W, Tutino G, et al. A novel point mutation in the beta1-tubulin gene in asymptomatic macrothrombocytopenic Norfolk and Cairn Terriers. *Veterinary Clinical Pathology* 43(3):317-321, 2014.
26. Dircks BH, Schuberth HJ, Mischke R. Underlying diseases and clinicopathologic variables of thrombocytopenic dogs with and without platelet-bound antibodies detected by use of a flow cytometric assay: 83 cases (2004-2006). *Journal of American Veterinary Medical Association* 235(8):960-966, 2009.
27. Leader A, Pereg D, Lishner M. Are platelet volume indices of clinical use? A multidisciplinary review. *Annals of Medicine* 44(8):805–816, 2012.
28. Schwartz D, Sharkey L, Armstrong PJ, et al. Platelet volume and plateletcrit in dogs with “presumed primary immune-mediated thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28(5):1575–1579, 2014.
29. Pankraz A, Bauer N, Moritz A. Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 38(1):30–38, 2009.
30. Tvedten H, Lilliehook I, Hillstrom A, et al. Plateletcrit is superior to platelet count for assessing platelet status in Cavalier King Charles Spaniels. *Veterinary Clinical Pathology* 37(3):266–271, 2008.
31. Provan D, Stasi R, Newland AC, et al. International consensus report on the investigation and management of primary immune thrombocytopenia. *Blood* 115(2):168–186, 2010.

32. Cooper N. State of the art - how I manage immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 177(1):39-54, 2017.
33. Bachman DE, Forman MA, Hostutler RA, et al. Prospective diagnostic accuracy evaluation and clinical utilization of a modified assay for platelet-associated immunoglobulin in thrombocytopenic and nonthrombocytopenic dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 44(3):355-368, 2015.
34. Shropshire S, Dow S, Lappin M. Detection and dynamics of anti-platelet antibodies in thrombocytopenic dogs with and without idiopathic immune thrombocytopenia. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 34(2):700-709, 2020.
35. Tomer A, Koziol J, McMillan R. Autoimmune thrombocytopenia: flow cytometric determination of platelet-associated autoantibodies against platelet-specific receptors. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3(1):74–78, 2005.
36. Porcelijn L, Huiskes E, Oldert G, et al. Detection of platelet autoantibodies to identify immune thrombocytopenia: state of the art. *British Journal of Haematology* 182(3):423–426, 2018.
37. Li J, Sullivan JA, Ni H. Pathophysiology of immune thrombocytopenia. *Current Opinion in Hematology* 25(5):373–381, 2018.
38. Lewis DC, Meyers KM. Studies of platelet-bound and serum platelet-bindable immunoglobulins in dogs with idiopathic thrombocytopenic purpura. *Experimental Hematology* 24(6):696–701, 1996.
39. Miller MD, Lunn KF. Diagnostic use of cytologic examination of bone marrow from dogs with thrombocytopenia: 58 cases (1994-2004). *Journal of American Veterinary Medical Association*, 2007. 231(10):1540-1544.
40. Maggi RG, Birkenheuer AJ, Hegarty BC, et al. Comparison of serological and molecular panels for diagnosis of vector-borne diseases in dogs. *Parasites & Vectors* 7:127, 2014.
41. Swann JW, Szladovits B, Threlfall AJ, et al. Randomised controlled trial of fractionated and unfractionated prednisolone regimens for dogs with immune-mediated haemolytic anaemia. *Veterinary Record* 184(25):771, 2019.

42. Center SA, Randolph JF, Warner KL, et al. Influence of body condition on plasma prednisolone and prednisone concentrations in clinically healthy cats after single oral dose administration. *Research in Veterinary Science* 95(1):225–230, 2013.
43. Foster AP, Shaw SE, Duley JA, et al. Demonstration of thiopurine methyltransferase activity in the erythrocytes of cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14(5):552–554, 2000.
44. Balog K, Huang AA, Sum SO, et al. A prospective randomized clinical trial of vincristine versus human intravenous immunoglobulin for acute adjunctive management of presumptive primary immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 27(3):536–541, 2013.
45. Rozanski EA, Callan MB, Hughes D, et al. Comparison of platelet count recovery with use of vincristine and prednisone or prednisone alone for treatment for severe immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 220(4):477–481, 2002.
46. Allen EC, Targio JL, LeVine DN, et al. Platelet number and function in response to a single intravenous dose of vincristine. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 35(4):1754-1762, 2021.
47. Zufferey A, Kapur R, Semple JW. Pathogenesis and therapeutic mechanisms in immune thrombocytopenia (ITP). *Journal of Clinical Medicine* 6(2):16, 2017.
48. Bianco D, Armstrong PJ, Washabau RJ. A prospective, randomized, double-blinded, placebo-controlled study of human intravenous immunoglobulin for the acute management of presumptive primary immune-mediated thrombocytopenia in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 23(5):1071–1078, 2009.
49. Neunert C, Lim W, Crowther M, et al. The American Society of Hematology 2011 evidence-based practice guideline for immune thrombocytopenia. *Blood* 117(16):4190–4207, 2011.
50. Kohn B, Bal G, Chirek A, et al. Treatment of 5 dogs with immune-mediated thrombocytopenia using Romiplostim. *BMC Veterinary Research* 12:96, 2016.

51. Gettinger MR, Glanemann B, Viall A, et al. Retrospective evaluation of splenectomy in the treatment of canine primary immune thrombocytopenia *Journal of Veterinary Internal Medicine* 33(5):2479–2480, 2019.
52. Page LK, Psaila B, Provan D, et al. The immune thrombocytopenic purpura (ITP) bleeding score: assessment of bleeding in patients with ITP. *British Journal of Haematology* 138(2):245–248, 2007.
53. Greene LA, Chen S, Seery C, et al. Beyond the platelet count: immature platelet fraction and thromboelastometry correlate with bleeding in patients with immune thrombocytopenia. *British Journal of Haematology* 166(4):592–600, 2014.
54. Frelinger AL, Grace RF, Gerrits AJ, et al. Platelet function in ITP, independent of platelet count, is consistent over time and is associated with both current and subsequent bleeding severity. *Thrombosis & Haemostasis* 118(1):143–151, 2018.

## Capitolo 5

---

### LA POLIARTRITE IMMUNOMEDIATA NEL CANE E NEL GATTO:

### TERAPIA E PROGNOSI

Michele Tumbarello, Isotta Buldrini, Francesco Dondi

*Veterinaria* 2021, 2:73-80.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie,

Scuola di Agraria e Medicina Veterinaria,

Bologna

## **Riassunto**

La poliartrite immunomediata (IMP) rappresenta una difficile sfida terapeutica per il clinico. Dopo aver seguito un corretto iter diagnostico e aver escluso malattie infettive e altri possibili trigger, in molti casi si deve ricorrere ad una terapia immunosoppressiva prolungata.

La IMP presenta nella maggior parte di casi una buona risposta ai corticosteroidi, che vengono somministrati con un protocollo di “dose a scalare”, iniziando con dosi elevate che sono progressivamente ridotte fino alla sospensione del trattamento. Se la risposta agli steroidi non è soddisfacente è possibile utilizzare immunosoppressori c.d. di seconda linea quali micofenolato mofetile, ciclosporina, leflunomide o altre molecole.

Nei casi di IMP primaria o idiopatica, la sospensione del trattamento, o il raggiungimento di dosi ridotte di farmaco può esitare nella comparsa di recidive. In animali che richiedano un trattamento a lungo termine, l’obiettivo finale della terapia è quello di mantenere la remissione clinica utilizzando la minor dose di immunosoppressore, riducendo gli effetti collaterali dei farmaci e garantendo al paziente una buona qualità di vita.

## **Abstract**

Treatment of Immune-mediated polyarthritis (IMP) is challenging for clinicians and after an oriented diagnostic approach (excluding infectious diseases and other triggers) frequently requires an immunosuppressive therapy.

IMP patients appear to respond favorably to corticosteroid treatment at tapering doses (starting with high dose and until a complete discontinuation of the drug in weeks to months). When the response to the steroid treatment is unsatisfactory, a second line immunosuppressive treatment with mofetil-mycophenolate, cyclosporine, leflunomide or other molecules, should be considered.

During IMP therapy with progressive tapering doses, the complete discontinuation of the immunosuppressive treatment can be associated with a relapse of the clinical signs. The final therapeutic goal in IMP treatment is the achievement of a steady state in which the clinical signs of the patients are well controlled with the lowest possible dose of immunosuppressive drugs.

## Terapia immunosoppressiva e collaterale

La gestione terapeutica dei pazienti con IMP ha i seguenti obiettivi generali:

- raggiungere la remissione a lungo termine con la dose più bassa possibile di farmaco/i;
- migliorare il quadro clinico del paziente/ridurre i segni clinici;
- prevenire la comparsa o ridurre la frequenza di recidive.

Per tali scopi, risultano fondamentali sia l'individuazione ed il trattamento della causa sottostante (se presente), sia il controllo del dolore e dell'infiammazione.<sup>1</sup>

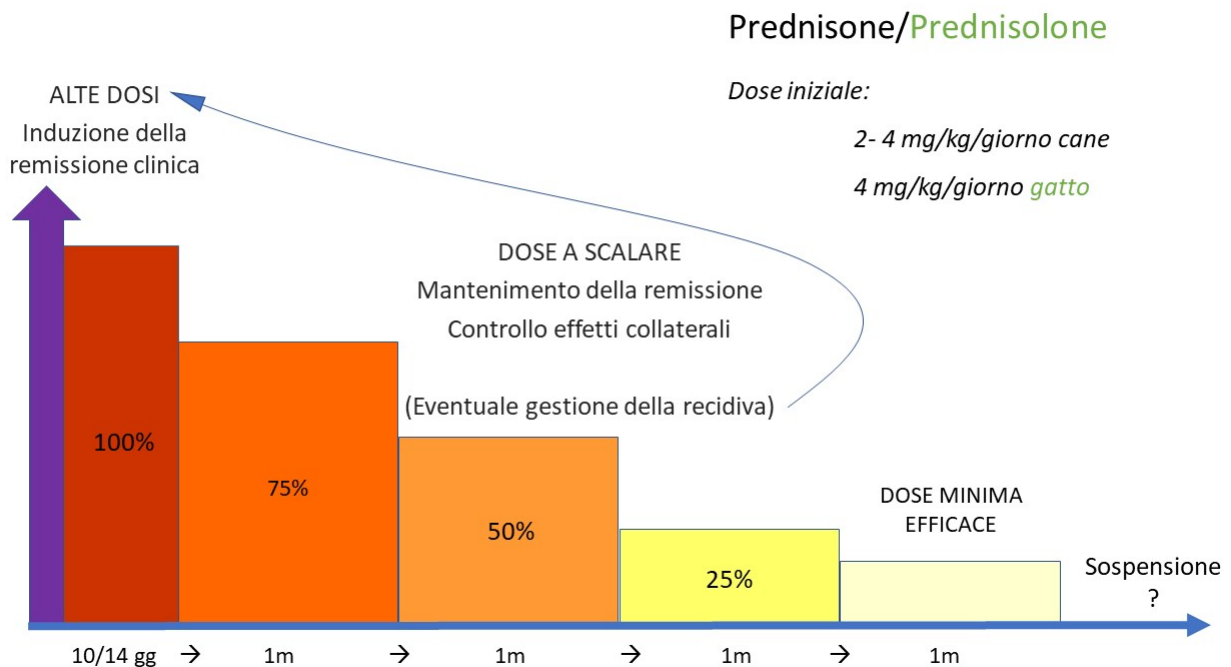
Nei casi in cui vi sia un forte sospetto di un *trigger* infettivo (poliartrite secondaria/infettiva, vedi *Ruolo delle principali malattie infettive in corso di poliartrite immunomediata nel cane e nel gatto*), come ad es. per malattie trasmesse da vettori, o nelle zone in cui siano comuni le malattie trasmesse da zecche, la terapia iniziale per l'IMP potrebbe essere limitata all'utilizzo di analgesici e al trattamento con doxiciclina (10 mg/Kg/die, eventualmente divisa in due somministrazioni, per 21-28 giorni). I cani con poliartrite associata a malattie trasmesse da zecche evidenziano tipicamente un miglioramento clinico entro i primi 7 giorni dalla somministrazione di doxiciclina e possono non necessitare di un approccio farmacologico immunosoppressivo.<sup>2</sup> Anche in corso di leishmaniosi, la priorità in questi pazienti è rappresentata, infatti, dal trattamento eziologico (vedi *Ruolo delle principali malattie infettive in corso di poliartrite immunomediata nel cane e nel gatto*), con eventuale associazione di una terapia corticosteroidica a dosaggio anti-infiammatorio.

Per le forme di IMP primarie idiopatiche è indicato, invece, l'utilizzo di una terapia immunosoppressiva, che viene prescritta solo dopo aver ragionevolmente escluso una poliartrite infettiva.

I corticosteroidi (prednisone, prednisolone, metil-prednisolone) risultano ad oggi i farmaci più efficaci (definiti di prima linea) nel trattamento dei cani con IMP. Il dosaggio di corticosteroidi inizialmente consigliato è di 1-2 mg/Kg BID,<sup>1,3,4</sup> tale dosaggio deve essere continuato fino alla completa remissione della sintomatologia clinica del paziente, generalmente per un periodo non

inferiore alle 2 settimane. Ottenuto un'iniziale e convincente miglioramento clinico, la dose potrà essere gradualmente ridotta (es.: del 25% circa ogni 2-3 settimane), ed eventualmente trasformata in una terapia a giorni alterni nei mesi successivi, fino all'eventuale sospensione o alla ricomparsa dei segni clinici (Figura 1).<sup>3</sup> Ridurre troppo rapidamente la dose dei glucocorticoidi potrebbe portare a ricadute che possono essere meno responsive al trattamento rispetto alla prima presentazione della malattia.<sup>1</sup> Per tale motivo la terapia glucocorticoidea è tutt'ora raccomandata per una durata minima di 4 mesi.<sup>4</sup> Nella pratica clinica di chi scrive, tuttavia, esistono casi che beneficiano di dosi anti-infiammatorie di corticosteroidi, senza necessariamente utilizzare protocolli immunosoppressivi. Come per altre malattie immunomediate/autoimmuni vale sempre la regola di utilizzare la dose minima di farmaco che consente la remissione dei segni clinici per quel paziente.

**Figura 1** - Rappresentazione schematica della riduzione progressiva della terapia corticosteroidea



L'aggiunta di farmaci immunosoppressori di seconda linea deve essere presa in considerazione se non si ottiene la remissione della sintomatologia, se si verifica una recidiva durante il trattamento con terapia steroidea, se il controllo della sintomatologia si ottiene a dosi persistentemente elevate di corticosteroidi o, infine, qualora si verificano dei gravi effetti collaterali associati alla terapia corticosteroidica.

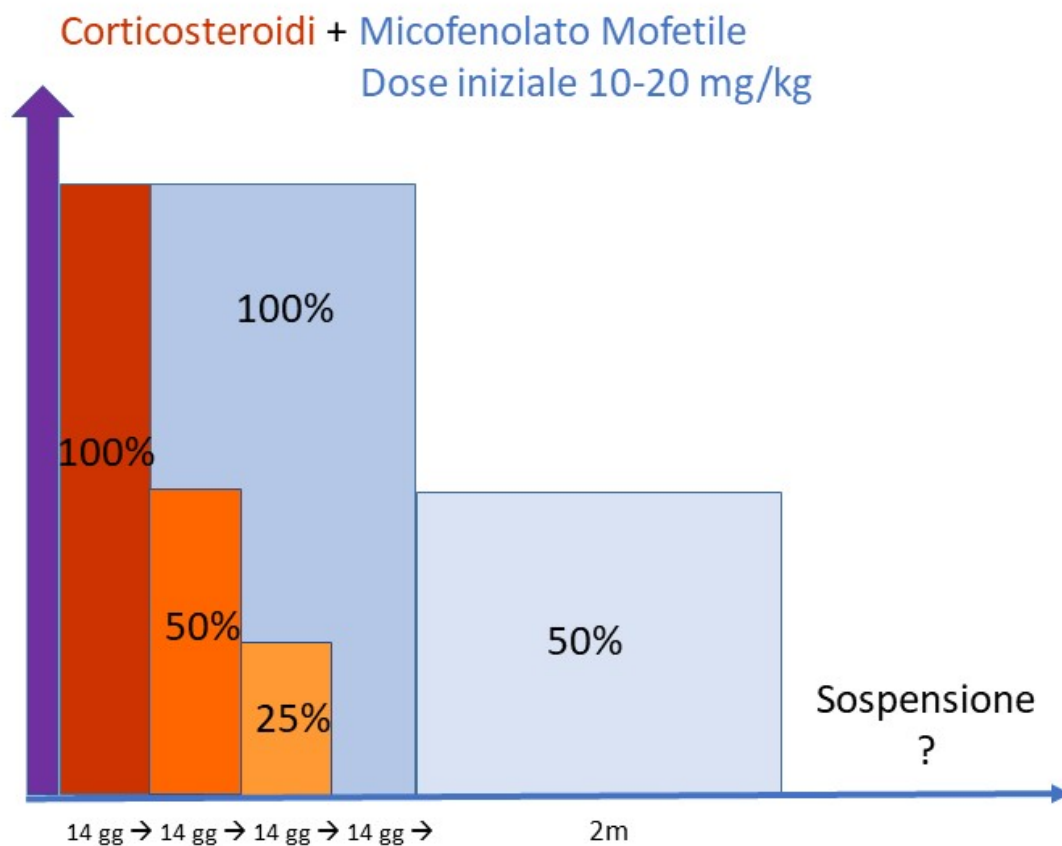
I farmaci immunosoppressori di seconda linea sono generalmente utilizzati in combinazione con i glucocorticoidi e comprendono principalmente: micofenolato mofetile, leflunomide, azatioprina, e ciclosporina (Tabella 1).<sup>3</sup> Purtroppo, ad oggi, non è presente molta evidenza scientifica riguardante il loro dosaggio ed il loro utilizzo (basato, per lo più, sull'esperienza del clinico) e mancano informazioni definitive riguardanti l'efficacia di queste molecole in associazione ai glucocorticoidi in corso di IMP.

Lo scopo di questi protocolli combinati generalmente è quello di sospendere i corticosteroidi o ridurre fortemente le dosi, mantenendo una remissione completa della sintomatologia.

Il **micofenolato mofetile (MMF)** è un farmaco antimetabolita che agisce inibendo la sintesi delle purine e conseguentemente l'attività dei linfociti (e di altre cellule). MMF è stato impiegato in associazione ai corticosteroidi, con risultati clinici sovrapponibili e minori effetti collaterali rispetto alla monoterapia steroidea. Il protocollo terapeutico iniziale prevede l'utilizzo di prednisone (1 mg/Kg SID o BID) e MMF (10 mg/Kg BID);<sup>4</sup> successivamente la dose di prednisone viene ridotta ogni due settimane, mentre quella di MMF è mantenuta costante. Nel caso in cui dopo due mesi di terapia con MMF venisse mantenuta la remissione clinica è indicato dimezzarne il dosaggio per ulteriori due mesi e poi sospenderlo (Figura 2). Gli animali che recidivano alla sospensione del MMF devono essere trattati nuovamente con corticosteroidi (terapia a breve termine, induzione), mentre il MMF (10 mg/Kg SID o BID) dovrà essere mantenuto probabilmente per tutta la vita. Gli effetti avversi dell'utilizzo di MMF sono di solito di lieve entità e prevalentemente gastroenterici (diarrea), è riportata tuttavia la possibilità di mielosoppressione e pertanto è indicato un controllo ematologico

periodico (es.: una volta al mese). Se i segni clinici non sono controllati con l'utilizzo di MMF come monoterapia o il farmaco non è tollerato è consigliato modificare il protocollo terapeutico (es. corticosteroidi associati a leflunomide).<sup>4</sup>

**Figura 2** - Rappresentazione schematica di esempio di terapia combinata corticosteroidea + immunosoppressiva



**Leflunomide** è un farmaco inibitore della sintesi delle pirimidine, con complessi meccanismi immunosoppressivi sia diretti, sia legati ad alcuni suoi metaboliti. Leflunomide si somministra al dosaggio di 2-4 mg/Kg/die.<sup>5,6</sup> Si procede scalando gradualmente la dose di corticosteroidi con l'obiettivo di sospenderli. Nel caso in cui si riesca ad ottenere un buon controllo clinico con leflunomide come monoterapia si può gradualmente diminuire il dosaggio (2-4 mg/Kg ogni 48 ore

per tre mesi, poi ogni 72 ore per tre mesi, e poi sospendere). Gli effetti avversi della leflunomide di solito sono lievi (anoressia, letargia, sintomi gastroenterici), ma in alcuni soggetti sono riportati anche epatotossicità e mielotossicità ed è pertanto consigliabile eseguire esami ematochimici di controllo con modalità seriale (es.: una volta al mese). Uno studio specifico ha valutato retrospettivamente la risposta terapeutica di cani con IMP trattati in monoterapia con leflunomide al dosaggio iniziale di 3-4 mg/Kg ogni 24 ore; la remissione completa, valutata sul piano clinico, era visibile nel 57% dei soggetti trattati, con minimi effetti collaterali legati alla terapia.<sup>7</sup>

In taluni casi, infine, viene riportato l'utilizzo di altri immunosoppressori di seconda linea: ciclosporina (5-10 mg/Kg/die) o azatioprina (inizialmente 2 mg/Kg/die per 2 settimane, poi dose di mantenimento 0,5-1 mg/Kg a giorni alterni).<sup>1</sup>

La **ciclosporina**, in particolare, è un immunosoppressore diffusamente utilizzato nelle malattie immunomediate del cane e del gatto che agisce mediante l'inibizione delle calcineurine. I pazienti sottoposti a tale terapia possono manifestare effetti collaterali soprattutto gastroenterici (vomito, diarrea, anoressia), iperplasia gengivale e meno frequentemente, epato-nefrotossicità.<sup>8</sup> Non è invece riportata mielotossicità con uso prolungato di ciclosporina. Rhoades e colleghi, in un recente studio randomizzato, hanno confrontato l'efficacia terapeutica e gli effetti collaterali di due protocolli immunosoppressivi in cani affetti da IMP uno dei quali utilizzava ciclosporina.<sup>9</sup> La risposta terapeutica, valutata attraverso la remissione della sintomatologia clinica, dei cani trattati con ciclosporina (5 mg/Kg ogni 12 ore) si è dimostrata sovrapponibile a quella dei pazienti sottoposti a sola terapia steroidea (prednisone, 1 mg/Kg ogni 12 ore). Inoltre, i pazienti sottoposti a terapia corticosteroidica, hanno mostrato una maggiore prevalenza di effetti collaterali quali poliuria, polidipsia e polifagia. Tali dati hanno portato gli autori ad ipotizzare che la ciclosporina possa rappresentare una valida alternativa alla terapia steroidea in corso di IMP del cane.<sup>9</sup>

Nel paziente felino sembra essere maggiormente indicato utilizzare altri corticosteroidi (prednisolone, metil-prednisolone) rispetto al prednisone. In letteratura, fra gli altri, è riportato

l'utilizzo combinato di corticosteroidi e clorambucile. Il dosaggio di clorambucile consigliato è 15 mg/m<sup>2</sup> SID (spesso 4 mg/gatto/die) per quattro giorni da ripetere ogni tre settimane o 2 mg/gatto somministrati poi ogni 2-3 giorni. Gli effetti avversi riscontrati sono anoressia e mielosoppressione.<sup>4</sup>

Quando si utilizza un protocollo immunosoppressivo combinato, una volta ottenuta la remissione dei segni clinici, il farmaco che causa gli effetti collaterali più preoccupanti (o, se non si osservano effetti collaterali importanti, il farmaco più costoso) è quello per il quale si procede per primo ad una riduzione del dosaggio.

Come già accennato in precedenza, nella letteratura che tratta IMP di cane e gatto non sono presenti molti studi che dimostrino che un farmaco immunosoppressore sia migliore di un altro e l'efficacia sembra essere quindi estremamente individuale. Pertanto, se un immunosoppressore dovesse fallire nel controllo della malattia, potrebbe essere indicato sostituirlo con una molecola alternativa. In alcuni pazienti, tutta la terapia farmacologica può essere gradualmente ridotta e poi interrotta senza che si verificano recidive. In altri pazienti è necessaria una dose bassa e continuativa di corticosteroidi in combinazione con un immunosoppressore di seconda linea. In questi ultimi casi, devono essere somministrate le dosi più basse possibili utili al fine di mantenere la remissione clinica.<sup>1,3,10</sup>

In una fase iniziale, soprattutto, per trattare la flogosi articolare ed il dolore ad essa associato alcuni pazienti vengono sottoposti a terapia con antinfiammatori non steroidei (FANS) (es.: carprofen, meloxicam). Tale approccio terapeutico richiede, tuttavia, particolare attenzione. La combinazione di FANS e corticosteroidi, infatti, si associa ad elevato rischio di ulcere gastrointestinali e predispone alla comparsa di danno renale acuto (AKI). In caso di cambio di terapia da FANS a corticosteroidi pertanto è consigliabile effettuare un periodo di "washout" di almeno 7 giorni. Durante questo periodo può essere iniziata la somministrazione di micofenolato mofetile o leflunomide ed è consigliato eventualmente associare altre terapie analgesiche (es.: tramadolo o oppioidi, gabapentin).<sup>1</sup> Anche il controllo del dolore è infatti una parte fondamentale del management terapeutico dei pazienti con

IMP; una corretta gestione del dolore consente infatti il ripristino di una buona qualità di vita del paziente e facilita la riduzione graduale dei farmaci immunosoppressori.

**Tabella 1** - Principali farmaci immunosoppressori utilizzati in corso di IMP nel cane e nel gatto.

<b>FARMACO</b>	<b>MECCANISMO D'AZIONE</b>	<b>DOSAGGIO</b>	<b>EFFETTI AVVERSI</b>
<b>Corticosteroidi</b> prednisone, prednisolone, metilprednisolone	Riduzione concentrazione linfocitaria circolante ed alterazione funzione cellulare citochino-mediata	1-2 mg/kg BID	Cushing iatrogeno, pu/pd, alterazioni cutanee, alopecia, atrofia muscolare, polifagia, infezioni secondarie
<b>Micofenolato Mofetile</b>	Inibizione selettiva linfociti T e B	10 mg/kg BID	Gastroenterite emorragica, anoressia, diarrea, infezioni secondarie
<b>Leflunomide</b>	Effetto antiproliferativo nei confronti dei linfociti T e B	2-4 mg/kg SID	Anoressia, vomito, letargia, epatotossicità, mielotossicità
<b>Ciclosporina</b>	Inibisce l'attività della calcineurina ed ha un effetto antiproliferativo nei confronti dei linfociti T	2,5-5 mg/kg BID	Vomito, diarrea, anoressia, iperplasia gengivale, ipertricosi, alterazioni cutanee, epato/nefrotossicità, infezioni secondarie
<b>Azatioprina</b>	Antagonista purinico	2 mg/kg SID	Vomito, diarrea, anoressia, mielosoppressione, necrosi epatica, pancreatite
<b>Clorambucile</b>	Agente alchilante, inibizione della sintesi anticorpale	2 mg/gatto (4 giorni su 7)	Sintomi gastroenterici, mielosoppressione

## **Monitoraggio dei pazienti**

I tempi di follow-up di questi pazienti solitamente sono stabiliti sulla base della risposta clinica, della necessità di monitorare malattie concomitanti o alterazioni clinicopatologiche, ed effetti avversi riscontrati durante il trattamento terapeutico (es.: mielosoppressione). La mancata risposta clinica

entro sette giorni dall'inizio del trattamento con corticosteroidi richiede una rivalutazione del caso (riconsiderazione della diagnosi, rivalutazione del dosaggio e della corretta somministrazione dei farmaci, aggiunta di un immunosoppressore di seconda linea). Ripetere le artrocentesi e la valutazione citologia del liquido sinoviale dopo l'inizio del trattamento non è attualmente raccomandato nella routine clinica per monitorare l'andamento della malattia e la remissione dei sintomi, ma può essere indicato nei casi in cui si sospetti e si voglia confermare la presenza di una recidiva<sup>9</sup>. Risulta invece utile, per i pazienti con IMP, il monitoraggio degli esami emato-chimici comprensivi della valutazione della proteina C-reattiva (CRP). Le elevate concentrazioni di tale proteina in risposta all'infiammazione, e la conseguente breve emivita in circolo, rendono questa proteina un ottimo marker di risposta clinica, ma soltanto nel cane.<sup>11</sup>

La CRP, infatti, spesso risulta significativamente elevata sia prima del trattamento nei cani con IMP, sia quando la malattia si mantiene attiva (per esempio in seguito ad un mancato controllo clinico iniziale o durante la recidiva). In particolare, in corso di IMP nel cane, si è assistito ad una riduzione significativa delle concentrazioni di CRP sia a due che a quattro settimane dall'inizio della terapia immunosoppressiva.<sup>11</sup>

Infine, il monitoraggio ematochimico e la valutazione urinaria sono utili in questi pazienti anche al fine di monitorare eventuali effetti collaterali derivanti dalla terapia immunosoppressiva in atto (citopenie, sofferenza epatica e renale, Cushing iatrogeno). L'immunosoppressione combinata potrebbe altresì essere il viatico per lo sviluppo di sovrainfezioni batteriche; tra le infezioni più frequenti, si segnalano quelle respiratorie, cutanee e delle vie urinarie, e nel gatto la Toxoplasmosi (Figura 3).

**Figura 3** – Complicazioni secondarie alla somministrazione di farmaci immunosoppressori nel cane.



a),d): complicazioni infettive (lesioni ascessuali e necrotico-ulcerative) in un cane sottoposto a terapia immunosoppressiva combinata (corticosteroidi e micofenolato mofetile); b),c): *calcinosis cutis* in un carlino sottoposto a terapia prolungata con corticosteroidi.

## Prognosi

Nella maggior parte dei cani con IMP la risposta clinica alla terapia è rapida (90% dei casi) e si arriva spesso a sospendere ogni terapia o il controllo clinico è mantenuto con dosaggi molto bassi di farmaci immunosoppressori. Alcuni di questi soggetti recidivano periodicamente e possono essere comunque adeguatamente gestiti con un nuovo protocollo di immunosoppressione seguito poi da una dose a scalare. Esistono, tuttavia, alcuni casi più complessi, che non rispondono alle terapie e vanno spesso incontro a recidive difficili da controllare; questi pazienti purtroppo continuano a manifestare algia ed un progressivo danno articolare anche di tipo cronico (artrosi, degenerazione articolare). Inoltre, comunemente molti pazienti sviluppano segni clinici associati alla somministrazione prolungata di corticosteroidi o effetti collaterali causati dall'immunosoppressione non selettiva operata da tutti i farmaci sopracitati. I dati prognostici presenti nei gatti con IMP sono scarsi o assenti.

Infine, soprattutto nei quadri erosivi (fortunatamente più rari) il trattamento è reso complicato a causa delle degenerazioni progressive del tessuto articolare ed osseo peri-articolare. In questi pazienti il controllo della malattia e la remissione clinica sono molto più difficili da ottenere e a loro gestione purtroppo risulta frustrante sia per il medico veterinario, sia per il proprietario.<sup>4</sup>

## **Ruolo delle principali malattie infettive in corso di poliartrite immunomediata nel cane e nel gatto – 4 esempi**

### **Leishmaniosi canina**

La Leishmaniosi del cane è una malattia potenzialmente associata alla comparsa di poliartrite. Le poliartriti associate alla infezione da *Leishmania spp.* sono comuni e possono essere forme erosive o non erosive. La poliartrite, in questi casi è il risultato di un fenomeno immunomediato legato alla deposizione di immunocomplessi circolanti a livello sinoviale o alla formazione in loco degli stessi. La leishmania, infatti, può essere presente a livello articolare (c.d. poliartrite infettiva), ma più frequentemente stimola una massiva formazione di anticorpi circolanti (poliartrite immunomediata secondaria reattiva)

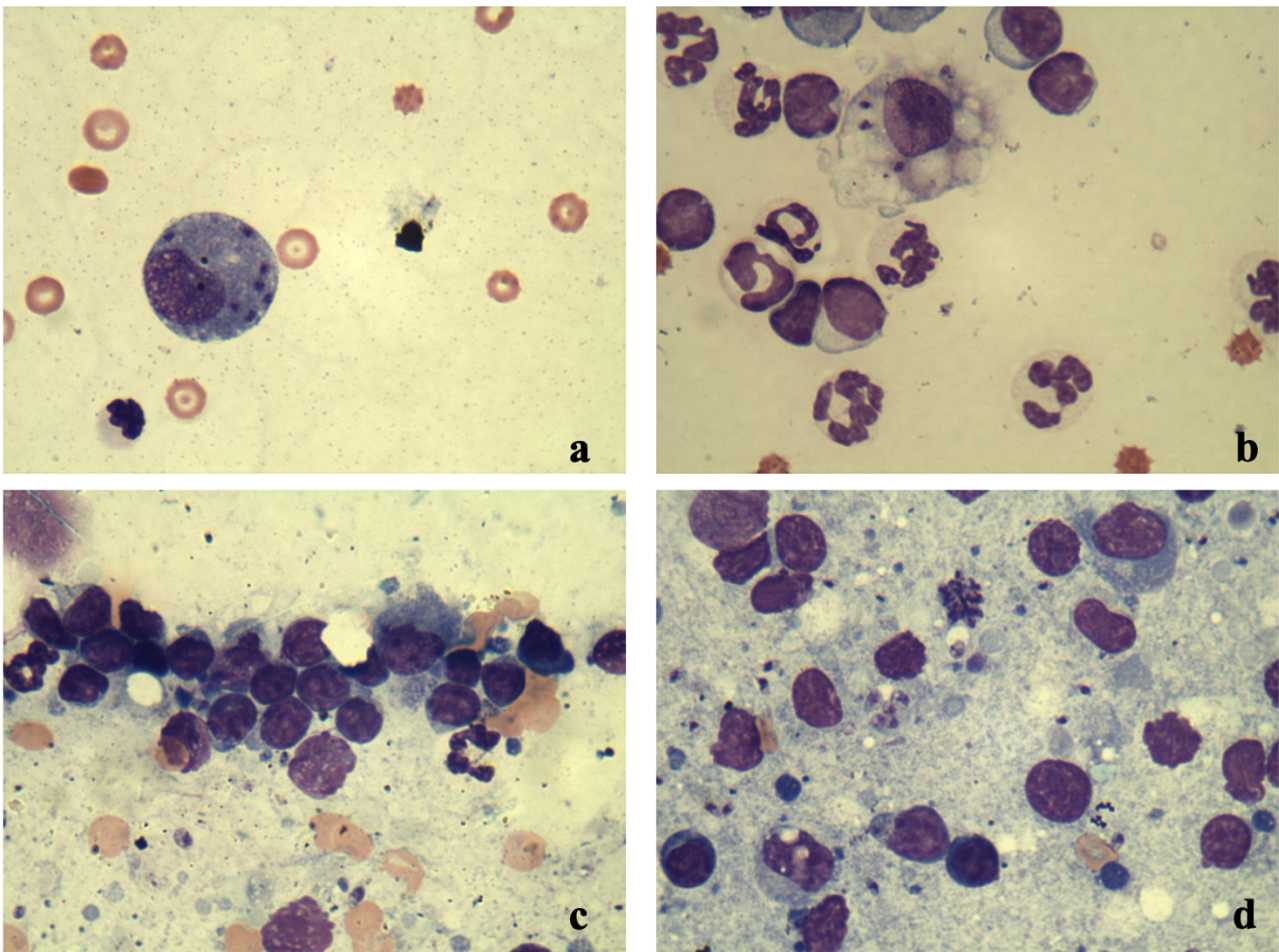
La poliartrite può essere sospettata in corso di leishmaniosi quando sono presenti riluttanza al movimento, zoppie altalenanti, dolore articolare (o altri segni di IMP, vedi *review* Parte 1) e soprattutto quando il cane manifesta febbre (raramente, infatti, il cane con leishmaniosi si presenta febbrile). In uno studio riportato in letteratura, dolore e tumefazione articolari erano gli unici sintomi in 5/14 cani con Leishmaniosi e poliartrite.<sup>12</sup>

La diagnosi definitiva prevede la valutazione citologica sinoviale multipla e l'esclusione di altre comorbidità, come riportato nella prima parte di questa revisione della letteratura (Figura 4).

Il clinico deve ricordare che la diagnosi di poliartrite in corso di leishmaniosi è appunto il segno della presenza di immunocomplessi circolanti e che tale condizione attualmente è considerata come

negativa da un punto di vista prognostico in analogia, ad esempio, alla presenza di glomerulonefrite o uveite.<sup>13</sup> Nonostante la letteratura specifica sia scarsa/assente, attualmente molti esperti di Leishmaniosi riportano che i cani con IMP e forme cliniche sembrano/possano beneficiare di un trattamento con corticosteroidi a dosaggio anti-infiammatorio combinato alla terapia anti-leishmania e alle terapia di supporto necessarie al caso specifico.

**Figura 4** – Reperti citologici di un cane, Beauceron, femmina sterilizzata di 4 anni con zoppia, febbre ed ipergammaglobulinemia.



a), b): centesi articolare con evidenza di macrofagi sinoviali e amastigoti di *Leishmania spp.* (May Grunwald Giemsa, 1000x); c), d): agoinfissione linfonodale compatibile con flogosi linfoplasmocellulare e amastigoti di *Leishmania spp.* (May Grunwald Giemsa, 1000x).

### ***Ehrlichiosi, Anaplasmosi canina e malattie trasmesse da zecca (in generale)***

Analogamente alla Leishmaniosi, il coinvolgimento articolare con sviluppo di IMP è riportato anche in corso di infezioni da Anaplasmataceae e in particolare di Ehrlichiosi canina. Si ritiene che queste malattie possano coinvolgere le articolazioni con meccanismi analoghi a quelli sopra riportati per la leishmaniosi (deposito/formazione di immunocomplessi) e tali infezioni sono annoverate tra le cause infettive di poliartrite. Il ruolo di queste malattie in corso di IMP, tuttavia, è stato recentemente ridimensionato. Uno studio relativamente recente, in cui è stata indotta sperimentalmente l'infezione da *Ehrlichia canis*, non è riuscito a riprodurre sperimentalmente l'infezione articolare e nessuno dei sintomi di IMP nei cani infettati.<sup>14</sup>

La diagnosi di infezione da *Ehrlichia canis* o *Anaplasma phagocytophilum* si ottiene sulla base del sospetto clinico (es.: febbre, flogosi sistemica, diatesi emorragica, dolore articolare) associato alle alterazioni clinico-patologiche più caratteristiche quali ad esempio piastrinopenia, leucopenia o altre citopenie combinate, ipoalbuminemia e iperglobulinemia, e proteinuria.

In aree endemiche, le malattie trasmesse da vettore (*Borrelia burgdorferi*, *Anaplasma phagocytophilum*, *Rickettsia rickettsii* e *Ehrlichia canis*) possono rappresentare una causa di poliartrite e devono sempre essere escluse tramite test molecolari o sierologici specifici o attraverso un trial terapeutico mirato (es.: terapia con doxiciclina).

La diagnosi eziologica per quasi tutte queste malattie si ottiene con una combinazione di test molecolari (es.: PCR da sangue o eventualmente liquido sinoviale) e ricerca di anticorpi tramite sierologia quantitativa (es.: immunofluorescenza indiretta). I test sierologici possono confermare la diagnosi eziologica, ma, in caso di malattia acuta, possono risultare falsamente negativi perché i segni clinici possono manifestarsi prima dello sviluppo di anticorpi.

La terapia della IMP associata a Ehrlichiosi/Anaplasmosi o altre malattie trasmesse dal morso della zecca prevede l'uso di doxiciclina (vedi *review* Parte I) ed eventualmente di corticosteroidi a dose

antinfiammatoria o più raramente immunosoppressiva. La risposta clinica al trattamento farmacologico antibiotico avviene di solito entro 72 ore.

### **Calicivirus felino**

Le poliartriti associate a Calicivirus felino sono riportate nei gattini (età compresa tra 6-12 settimane). Queste forme sono state associate sia all'infezione da Calicivirus, sia alla somministrazione vaccinale di Calicivirus vivo attenuato. I segni clinici includono zoppia, andatura rigida e ipertermia che possono associarsi o meno alle forme respiratorie e alle lesioni del cavo orale tipiche della Calicivirosi. Solitamente i segni clinici sono in miglioramento spontaneo in 2-4 giorni, ma talvolta possono durare più a lungo. Il coinvolgimento articolare è possibile anche nelle forme c.d. virulente sistemiche di Calicivirus felino, che si manifestano in forma grave e di solito letale. All'esame citologico del liquido sinoviale si evidenzia flogosi cronica associata a granulociti neutrofili, macrofagi e mononucleati.<sup>15</sup> La diagnosi può essere ottenuta mediante PCR da tamponi orofaringei o articolari.<sup>16</sup>

### **Micoplasmi nel gatto**

Sono presenti in letteratura alcuni report di poliartriti erosive e non erosive associate ad infezione da micoplasmi (*M. gatae*, *M. felis* nel gatto e *M. spumans* nel cane). In questi casi, l'esame citologico del liquido articolare mostra flogosi neutrofilica con granulociti neutrofili non degenerati. L'esame batteriologico effettuato di routine, per germi aerobi e anaerobi, risulta negativo in quanto i micoplasmi richiedono terreni particolari e lunghi tempi per la loro crescita. La diagnosi eziologica può essere raggiunta tramite l'esecuzione di indagini molecolari sul liquido sinoviale (PCR per micoplasmi) o con una diagnosi *ex juvantibus*. Il trattamento farmacologico di prima scelta è la somministrazione di doxiciclina o flurochinoloni.<sup>17</sup>

## Bibliografia

1. Johnson KC, Mackin A. Canine immune-mediated polyarthritis: Part 2: diagnosis and treatment. *Journal of the American Animal Hospital Association* 48:71–82, 2012.
2. Littman MP, Goldstein RE, Labato MA, *et al.* ACVIM small animal consensus statement on Lyme disease in dogs: diagnosis, treatment, and prevention. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 20:422–434, 2006.
3. Kohn B. Immune mediated polyarthritis. *European Journal of Companion Animal Practice* 17:119–124, 2007.
4. Stone M. Immune-mediated Polyarthritis and other Polyarthritides. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 8th ed. (Ettinger, SJ, Feldman, EC and Côté, E.eds.), Elsevier, St. Louis 203:861-865, 2017.
5. Colopy SA, Baker TA, Muir P. Efficacy of leflunomide for treatment of immune-mediated polyarthritis in dogs: 14 cases (2006–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236:312–318, 2010.
6. Shaughnessy ML, Sample SJ, Abicht C, *et al.* Clinical features and pathological joint changes in dogs with erosive immune-mediated polyarthritis: 13 cases (2004–2012). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 249:1156-1164, 2016.
7. Colopy SA, Baker TA, Muir P. Efficacy of leflunomide for treatment of immune-mediated polyarthritis in dogs: 14 cases (2006–2008). *Journal of the American Veterinary Medical Association* 236:312–318, 2010.
8. Gregory CR. Immunosuppressive Agents. *Kirk's Veterinary Therapy XV*, 15th ed. (Bonagura JD, Twedt DC), Elsevier, St. Louis 59:268-274, 2014.
9. Rhoades AC, Vemau W, Kass PH, *et al.* Comparison of the efficacy of prednisolone and cyclosporine for treatment of dogs with primary immune-mediated polyarthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 248:395- 404, 2016.
10. Clements DN, Gear RNA, Tattersall J, *et al.* Type I immune-mediated polyarthritis in dogs: 39 cases (1997–2002). *Journal of the American Animal Hospital Association* 224:1323–7, 2004.

11. Foster JD, Sample S, Kohler R, *et al.* Serum biomarkers of clinical and cytologic response in dogs with idiopathic immune-mediated polyarthropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 28:905-911, 2014.
12. Sbrana S, Marchetti V, Mancianti F, *et al.* Retrospective study of 14 cases of canine arthritis secondary to *Leishmania* infection. *Journal of Small Animal Practice* 55:309-313, 2014.
13. Leishvet group. LeishVet's guidelines on canine Leishmaniosis. <http://www.leishvet.org/wp-content/uploads/2018/09/IT-Guidelines.pdf>, 2018-19.
14. Theodorou K, Leontides L, Siarkou VI, *et al.* Synovial fluid cytology in experimental acute canine monocytic ehrlichiosis (*Ehrlichia canis*). *Veterinary Microbiology* 177:224-227, 2015.
15. Levy JK, Marsh A. Isolation of calicivirus from the joint of a kitten with arthritis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 201:753-755, 1992.
16. Lemetayer J, Taylor S. Inflammatory joint disease in cats: diagnostic approach and treatment. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 16:547-562, 2014.
17. Sykes JE. *Mycoplasma* infections. *Canine and feline infectious diseases* (Sykes JE), 1<sup>st</sup> ed., Elsevier, St Louis 382-389, 2014.

## Capitolo 6

---

### DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Ad oggi, in medicina veterinaria, la complessità della disregolazione immunitaria che si sviluppa nelle malattie immunomediate non è ancora stata completamente compresa; si assiste, probabilmente, ad alterazioni multifattoriali, che includono fattori genetici intrinseci e fattori scatenanti ambientali (ad esempio, agenti infettivi, farmaci, vaccini o neoplasie).<sup>1,2</sup> Il sistema immunitario stimolato in modo inappropriato produce una marcata risposta infiammatoria locale o sistemica che porta alla distruzione dei tessuti e alla malattia clinica.

Alcune delle malattie infiammatorie sistemiche più comuni con un'eziologia immunomediata nei cani e nei gatti includono: l'IMHA, l'ITP e l'IMP.<sup>1,2</sup> In letteratura sono stati descritti vari criteri per la diagnosi di queste malattie, ma esiste poco consenso su quali di essi siano richiesti per la diagnosi definitiva.<sup>1</sup> Recentemente, basandosi sulle poche evidenze attualmente presenti in ambito scientifico, un gruppo di medici veterinari specialisti riunitisi nell'IMHA *Consensus Panel*, ha definito alcuni capisaldi nella diagnosi dell'IMHA del cane e del gatto.<sup>3</sup> Queste evidenze sono ancora latenti sia per ciò che concerne l'IMP, sia l'ITP, condizioni patologiche nelle quali per raggiungere una diagnosi è necessario ancora procedere "ad esclusione".<sup>4,5</sup>

Nell'approccio diagnostico a queste malattie, la differenziazione tra forme primarie di malattia (malattia autoimmune) e forme associate a presunti fattori scatenanti rappresenta un primo passaggio fondamentale; infatti, la rimozione di potenziali cause sottostanti, ove possibile, risulta una componente cruciale del trattamento.<sup>1,6</sup> Mancano allo stato attuale delle linee guida per la valutazione diagnostica dei fattori scatenanti di una malattia immunomediata. Una documentazione di questo tipo consentirebbe ai medici veterinari di valutare la probabilità che una data comorbidità sia implicata nella patogenesi della malattia e di conseguenza indicare i test diagnostici necessari per escluderla. A tale proposito, nel **capitolo 2**, è stato riportato uno studio incentrato su una popolazione di gatti con IMHA e sospetta positività FeLV. Lo studio ha descritto i dati clinici, clinicopatologici e la sopravvivenza di 20 gatti con una diagnosi o un sospetto diagnostico di IMHA; si trattava di pazienti che evidenziavano all'ammissione una positività al test POC FeLV, associata ad una PCR del DNA provirale FeLV negativa.

I dati clinicopatologici di questi pazienti hanno confermato come nei pazienti felini con IMHA spesso l'anemia all'ammissione sia di grado molto grave (mediana ematocrito 9%) e non rigenerativa (mediana reticolociti assoluti 35.000 K/ $\mu$ L).<sup>7</sup> In merito ai criteri diagnostici dell'IMHA, l'iperbilirubinemia era presente nel 67% dei casi, con il 70% dei pazienti che ha mostrato una positività alla prova di agglutinazione microscopica o l'evidenza di *ghost cells* alla valutazione dello striscio ematico. Tutti i pazienti sono stati trattati con glucocorticoidi e nel 33% di questi è stato utilizzato anche un immunosoppressore di seconda linea (micofenolato mofetile o ciclosporina). Relativamente al trattamento, è stato anche valutato l'effetto della terapia immunosoppressiva combinata sulla sopravvivenza; in particolare, il regime immunosoppressivo non ha avuto un impatto significativo sull'outcome dei pazienti. Alla fine dello studio, la mortalità è stata del 22%, dato che rispecchia le percentuali riportate in letteratura per l'IMHA felina.<sup>8</sup>

Come già accennato, tutti i pazienti inclusi nello studio presentavano una discordanza di risultati tra test POC FeLV e PCR provirale FeLV. Da sottolineare, inoltre, che nel 50% dei pazienti è stato eseguito un test POC FeLV di controllo, dopo la risoluzione dei segni clinici e delle alterazioni ematologiche e che in tutti i casi il test di controllo si è rivelato negativo. Inoltre, nei due soggetti che hanno evidenziato una recidiva della malattia, il test POC FeLV è stato ripetuto, con esito rivelatosi nuovamente positivo. Le possibili spiegazioni proposte e riguardanti la discordanza tra questi test per la diagnosi di FeLV sono state due. Una possibilità è che ci si trovi dinanzi a veri risultati falsi positivi del test POC; i falsi positivi in questo caso potrebbero essere causati da anticorpi che si legano ad epitopi specifici presenti nei gatti con IMHA, oppure all'interazione tra la tipologia di matrice utilizzata per il test (soprattutto se alterata, per esempio per la presenza di emolisi) ed alcune componenti del test stesso. La seconda possibile spiegazione, ritenuta attualmente meno probabile, riguarda lo sviluppo, in questa popolazione di gatti con IMHA, di vere infezioni FeLV senza che vi sia un rilevamento del DNA del virus; questo può avvenire a causa, per esempio, di tipologie di infezioni FeLV con presentazioni cliniche e comportamento biologico ancora da definire. Tutte queste possibili interpretazioni necessitano di ulteriori indagini e approfondimenti. Pertanto, nei gatti

anemici, fino a quando non si otterrà maggiore chiarezza nei test diagnostici FeLV, i risultati positivi utilizzando il test POC devono essere interpretati con cautela fino al completamento della conferma molecolare mediante PCR.

Nonostante in questo gruppo di malattie immunomediate i meccanismi patogenetici siano ancora poco chiari, alcuni aspetti della patologia sono stati ben caratterizzati. Infatti, è stato ampiamente dimostrato come la disfunzione immunitaria sia alla base del danno cellulare/tissutale e per questo richieda l'utilizzo di terapie immunomodulatorie o immunosoppressive.<sup>1</sup> Gli obiettivi del trattamento sono indurre la remissione dei segni clinici legati alla malattia, inibendo l'infiammazione e riducendo al minimo gli effetti avversi dei farmaci immunosoppressivi. La scelta del regime di trattamento dovrebbe essere basata sulla conoscenza della fisiopatologia della singola malattia immunomediata, sia nel cane, sia nel gatto;<sup>2</sup> spesso, tuttavia, i farmaci e i protocolli utilizzati sono derivati e traslati dal modello umano della malattia. Nella letteratura scientifica veterinaria non sono presenti solide evidenze che dimostrino che un farmaco immunosoppressore sia migliore di un altro. Le ricerche fin qui prodotte suggeriscono che l'utilizzo dei soli glucocorticoidi, solitamente, può garantire la remissione della malattia in un'elevata percentuale di casi.<sup>1</sup> Sono stati descritti, tuttavia, un'ampia gamma di dosaggi relativi alla terapia glucocorticoidea, ma l'effetto del dosaggio sull'outcome è difficile da valutare negli studi in cui mancano informazioni dettagliate sulla durata del trattamento, sullo schema di riduzione graduale, sull'uso di farmaci aggiuntivi. Inoltre, devono essere considerati l'incidenza degli effetti avversi associati all'uso di glucocorticoidi e l'impatto di questi sulla qualità della vita del paziente e sul grado di soddisfazione del proprietario. Questi aspetti, unitamente al mancato controllo della malattia, rappresentano i motivi che spingono il medico veterinario a ricorrere all'utilizzo di altri immunosoppressori in associazione ai glucocorticoidi.<sup>1,2,6</sup> Attualmente non ci sono studi prospettici in grado di determinare né se la terapia combinata sia più efficace della sola terapia steroidea, né quale farmaco sia eventualmente la migliore seconda linea.

Inoltre, mancano in letteratura dei dati relativi al monitoraggio di questi pazienti; in alcuni contesti tutta la terapia farmacologica può essere gradualmente ridotta e poi interrotta senza che si verifichino

recidive. In altri pazienti, invece, è indicata una dose bassa, ma continuativa di corticosteroidi in combinazione con un immunosoppressore di seconda linea.<sup>4,5,6</sup>

Lo scopo principale dello studio prospettico randomizzato riportato nel **capitolo 3** era documentare l'efficacia di tre diversi protocolli immunosoppressivi in una popolazione di cani con naIMHA. Contrariamente alla nostra ipotesi iniziale, i cani sottoposti a terapia immunosoppressiva combinata (metilprednisolone+ciclosporina o metilprednisolone+MMF) non hanno evidenziato una migliore risposta ematologica, in nessuno dei tre tempi considerati (14, 30, 60 giorni dalla diagnosi), rispetto ai pazienti che hanno ricevuto la terapia con solo metilprednisolone. La risposta ematologica, che si basava sulla risoluzione dell'anemia e sulla scomparsa dei tipici segni di distruzione immunomediata, si è dimostrata relativamente lenta in tutta la popolazione di studio. Dopo il primo mese di terapia, infatti, solo il 33% dei cani ha ottenuto una risposta ematologica parziale o completa; questa percentuale si è assestata al 46% quando è stato considerato l'endpoint dei due mesi dall'inizio della terapia immunosoppressiva. Va detto, tuttavia, che i criteri stabiliti per definire la risposta ematologica di questi pazienti sono stati per la prima volta utilizzati in ambito veterinario e potrebbero essere considerati abbastanza restrittivi. Purtroppo, però, ad oggi, non esistono dei parametri riconosciuti per definire la risposta ematologica dei cani con IMHA. Sebbene i criteri utilizzati nel nostro studio si avvicinino concettualmente al modello umano della malattia, futuri studi veterinari dovrebbero definire criteri standard per monitorare la risposta ematologica nella naIMHA del cane, con l'obiettivo di semplificare il processo decisionale terapeutico.

L'obiettivo secondario dello studio riportato nel **capitolo 3** era confrontare la frequenza di recidive e di complicazioni, nonché la sopravvivenza tra i tre diversi regimi immunosoppressivi nella sopracitata popolazione di cani con naIMHA. L'IMHA, infatti, rappresenta ancora una sfida per il clinico, data la gravità dei segni clinici, la comune necessità di supporto intensivo dei pazienti con trattamenti trasfusionali e l'elevata mortalità, che è intorno al 50% nella specie canina.<sup>6</sup> Nella popolazione oggetto di studio, la maggior parte delle complicazioni che mettevano a rischio la vita del paziente hanno riguardato lo sviluppo di patologie infettive o eventi trombotici (rispettivamente,

nel 32% e 22% dei soggetti inclusi nello studio). Per ciò che concerne le recidive, queste sono state osservate nel 7% dei cani, dato inferiore rispetto a quello che viene riportato in letteratura.<sup>9</sup> La tipologia di terapia immunosoppressiva non ha avuto un impatto né sulla frequenza delle complicazioni, né sullo sviluppo di recidive. Il tasso di mortalità a 1 anno dalla diagnosi è stato del 25%; certamente, la standardizzazione del protocollo terapeutico e il miglioramento nella terapia di supporto (trasfusionale, *in primis*) possono avere un ruolo nella riduzione della mortalità in questi pazienti, rispetto alle percentuali riportate in studi precedenti.<sup>6</sup> Inoltre, quando i cani sono stati considerati in base allo specifico gruppo di trattamento, la combinazione di ciclosporina e metilprednisolone è stata associata ad una percentuale di sopravvivenza maggiore, sia a due mesi che ad un anno dalla diagnosi. Ulteriori studi saranno utili per indagare e confermare l'effetto clinico benefico della combinazione di ciclosporina e corticosteroidi nella naIMHA canina.

In conclusione, le ricerche future nell'ambito delle malattie immunomediate dovrebbero essere rivolte all'applicazione di criteri di arruolamento solidi e standardizzati, che non lascino dubbi sulla diagnosi; altro obiettivo dovrà essere quello di segnalare protocolli di trattamento coerenti, che tengano conto del trattamento a lungo termine, della riduzione graduale e del *target* terapeutico in corso di recidiva della malattia. Inoltre, si dovrebbe maggiormente considerare l'eterogeneità della presentazione clinica in queste diverse malattie; è probabile, infatti, che in alcuni contesti, la risposta clinica, o la prognosi migliore o peggiore, non dipendano solamente dal regime terapeutico, ma per esempio dalle diverse entità con cui una stessa malattia può presentarsi (forme rigenerative *vs* forme non rigenerative in corso di malattie ematologiche immunomediate).

La ridotta incidenza di queste malattie sottolinea, infine, anche l'importanza della cooperazione tra diversi centri di ricerca, per massimizzare l'arruolamento dei casi per studi prospettici.

## BIBLIOGRAFIA

1. Whitley NT, Day MJ. Immunomodulatory drugs and their application to the management of canine immune-mediated disease. *J Small Anim Pract.* 2011 Feb;52(2):70-85.
2. Gershwin LJ. Current and Newly Emerging Autoimmune Diseases. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2018 Mar;48(2):323-338.
3. Garden OA, Kidd L, Mexas AM, et al. ACVIM Consensus statement on the diagnosis of immune-mediated hemolytic anemia in dogs and cats. *J Vet Intern Med* 2019;33(2):313-334
4. LeVine DN, Brooks MB. Immune thrombocytopenia. In: Brooks MB, Harr KE, Seeling DM et al.: *Schalm's veterinary hematology*, 7th edition. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell, 2022, pp. 3302-3365.
5. Stone M. Immune-mediated Polyarthritides and other Polyarthritides. In: Ettinger SJ, Feldman EC, et al.: *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 8th ed. Elsevier, St. Louis 2017;203:861-865.
6. Swann JV, Garden OA, Fellman CL, et al. ACVIM Consensus statement on the treatment of immune-mediated hemolytic anemia in dogs. *J Vet Intern Med* 2019;33(3):1141-1172.
7. Kohn B, Weingart C, Eckmann V, Ottenjann M, Leibold W. Primary immune-mediated hemolytic anemia in 19 cats: diagnosis, therapy, and outcome (1998-2004). *J Vet Intern Med.* 2006;20:159-166.
8. Swann JW, Szladovits B, Glanemann B. Demographic Characteristics, Survival and Prognostic Factors for Mortality in Cats with Primary Immune-Mediated Hemolytic Anemia. *J Vet Intern Med.* 2016 Jan-Feb;30(1):147-56.
9. Weingart C, Thielemann D, Kohn B. Primary immune-mediated haemolytic anaemia: a retrospective long-term study in 61 dogs. *Aust Vet J.* 2019 Dec;97(12):483-489.