

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE VETERINARIE

Ciclo XXIV

07/H4 CLINICA MEDICA E FARMACOLOGIA VETERINARIA

VET/08 CLINICA MEDICA VETERINARIA

**PROTEINURIA E SINDROME NEFROSICA NEL CANE: STUDIO
RETROSPETTIVO SU 338 CASI**

Presentata da: Dott.ssa Rosaria Isaya

Coordinatore Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Dott. Francesco Dondi

Esame finale anno 2012

Sommario

INTRODUZIONE	4
CAPITOLO I	6
LA SINDROME NEFROSICA IN MEDICINA UMANA.....	6
DEFINIZIONE, EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA	6
FISIOPATOLOGIA.....	7
<i>Proteinuria</i>	7
<i>Ipoalbuminemia</i>	8
<i>Edema</i>	8
<i>Iperlipidemia</i>	12
<i>Tromboembolismo</i>	13
<i>Infezioni</i>	15
<i>Insufficienza renale acuta</i>	15
<i>Anemia</i>	15
CAPITOLO II	16
LA SINDROME NEFROSICA E LE PATOLOGIE GLOMERULARI NEL CANE	16
DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA.....	16
EZIOLOGIA	18
<i>Glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN)</i>	21
<i>Nefropatia membranosa (MN) o glomerulonefrite membranosa (MGN)</i>	22
<i>Glomerulonefrite proliferativa (mesangioproliferativa)</i>	23
<i>Amiloidosi</i>	24
<i>Glomerulosclerosi</i>	26
<i>Nefrite ereditaria</i>	27
<i>Minimal change disease (MCD)</i>	27
DIAGNOSI E ALTERAZIONI CLINICOPATOLOGICHE IN MEDICINA UMANA E VETERINARIA	27
<i>Proteinuria</i>	30
<i>Ipoalbuminemia</i>	31
<i>Iperlipidemia</i>	32
<i>Accumulo extravascolare di fluidi</i>	32
COMPLICAZIONI.....	33
<i>Fenomeni tromboembolici</i>	33

<i>Iperazotemia</i>	35
<i>Iperensione</i>	35
<i>Anemia</i>	36
<i>Mortalità e outcome</i>	36
CAPITOLO III PARTE SPERIMENTALE	38
OBIETTIVI.....	38
MATERIALI E METODI	38
<i>Criteri di inclusione e selezione dei casi</i>	38
<i>Metodica di prelievo, processazione e stoccaggio dei campioni</i>	40
<i>Analisi statistica</i>	57
RISULTATI	57
DISCUSSIONE E CONCLUSIONE.....	88
BIBLIOGRAFIA	97

INTRODUZIONE

La sindrome nefrosica (SN) è definita come la presenza concomitante di una proteinuria maggiore di 3.5g/24 h, ipoalbuminemia, ipercolesterolemia e presenza di edemi (de Seigneux e Martin, 2009).

Le cause possono essere sia glomerulopatie primarie, sia malattie sistemiche che provocano un danno renale.

Indipendentemente dalle cause, la perdita proteica provoca numerose complicazioni dovute sia alla tossicità che la proteinuria ha sul rene, sia alla perdita di numerose proteine. Tra le complicazioni principali ci sono la ritenzione di sodio, l'ipertensione, l'iperlipidemia, le infezioni, l'anemia e una maggiore tendenza a fenomeni trombotici (de Seigneux e Martin, 2009).

In Medicina Umana, i pazienti con SN sono più a rischio di quelli che presentano una nefropatia glomerulare non nefrosica (NNGD) per lo sviluppo di complicazioni tromboemboliche come la trombosi venosa profonda, l'embolismo polmonare, la trombosi della vena renale e per una più rapida progressione verso l'insufficienza renale (Singhal e Brimble, 2006; Mahmoodi et al., 2008).

Nei pazienti proteinurici numerosi fattori contribuiscono ad uno stato di ipercoagulabilità in particolare l'ipovolemia, l'aumentata aggregabilità piastrinica, la carenza di antitrombina (AT III), l'ipoalbuminemia, l'ipercolesterolemia, l'iperfibrinogenemia e l'incremento dei D-dimeri (Zaffanello et al., 2009).

In Medicina Veterinaria, nella specie canina, la sindrome nefrosica rappresenta una complicazione non molto frequente delle glomerulopatie proteino-disperdenti e, come nell'uomo, è caratterizzata dalla concomitante presenza di proteinuria, ipoalbuminemia, iperlipidemia e accumulo extravascolare di fluidi, anche se non è ancora stato stabilito un valore *cut-off* di rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC) al di sopra del quale si possa parlare di proteinuria nefrosica.

Nella realtà Veterinaria, la Letteratura riguardante l'argomento è molto limitata e non è ben nota la correlazione tra SN e gravità della proteinuria, ipoalbuminemia e sviluppo di tromboembolismo; tromboemboli sono stati documentati in 19/74 cani con patologie glomerulari sottoposti a necropsia, 6 di questi erano affetti da amiloidosi (Cook e Cowgill, 1996); in un altro studio 20/52 cani con amiloidosi renale hanno presentato fenomeni trombotici in particolare a livello polmonare ma erano colpiti anche altri organi quali il cuore, i reni e l'intestino (Slauson e Gribble, 1971).

Nei cani con patologie glomerulari è stata riportata una diminuita attività dell'antitrombina (Cook e Cowgill, 1996), un aumento dell'aggregabilità piastrinica (Green et al., 1985) e una alterazione dell'intero asse coagulativo (Ritt et al. 1997; Green e Kabel, 1982; Cook e Cowgill 1996).

Un recente studio condotto da Klosterman e coll. (2011) dimostra come l'albumina e il calcio siano significativamente più bassi mentre il colesterolo, la proteinuria e il fosforo significativamente più alti nei pazienti con SN rispetto a quelli con NNGD. Non sono state riscontrate differenze significative tra i due gruppi per quanto riguarda i parametri della coagulazione, mentre la presenza di SN è stata associata ad una prognosi peggiore nei cani non azotemici.

Nel presente lavoro retrospettivo vengono descritte e discusse le alterazioni cliniche e clinicopatologiche che si verificano nei cani con proteinurie elevate (UPC >2), con l'obiettivo di inquadrare con maggiore precisione lo stato clinico di questi pazienti, individuare quali sono le maggiori complicazioni a cui possono andare incontro, analizzarne la frequenza rilevata nella nostra realtà clinica e confrontarla con i dati riportati in Letteratura.

CAPITOLO I

LA SINDROME NEFROSICA IN MEDICINA UMANA

DEFINIZIONE, EPIDEMIOLOGIA ED EZIOLOGIA

La sindrome nefrosica (SN) è definita come la concomitante presenza di ipoalbuminemia, iperlipidemia, edemi e di una proteinuria maggiore di 3,5 g/24 h (UPC >3.5), definita proteinuria nefrosica (de Seigneux e Martin, 2009; Kodner, 2009).

Il termine di “sindrome nefrosica” si associa ad un quadro clinico complesso e a gravi sequele, in particolare ritenzione di sodio, iperlipidemia, complicazioni tromboemboliche ed infezioni (Orth e Ritz, 1998).

La sindrome nefrosica può essere causata da una malattia glomerulare primaria o da una malattia sistemica che comporta un danno renale secondario.

La nefropatia membranosa (pazienti caucasici) e la glomerulosclerosi segmentale focale (FSGC) (pazienti afroamericani) sono le malattie glomerulari primarie più frequentemente diagnosticate negli adulti, seguite da nefropatia da IgA e, più raramente da minimal change disease, (MCD) che invece è la glomerulopatia che colpisce più dell'80 % dei bambini tra i 2 e i 6 anni e il 30% degli adolescenti. Nei bambini, in ordine di frequenza dopo la MCD vengono diagnosticate la FSGC e la glomerulonefrite mesangioproliferativa (Bagga e Mantan, 2005; Hull e Goldsmith, 2008; Kodner, 2009) (Tabella 1).

Il diabete mellito rappresenta la causa più comune di glomerulopatia secondaria e di sindrome nefrosica, altre cause sono il lupus eritematosus sistemico (LES), l'amiloidosi, l'epatite B e C, il virus dell'immunodeficienza umana (HIV), neoplasie, infezioni, farmaci antiinfiammatori non steroidei, metalli pesanti etc. (de Seigneux e Martin, 2009).

<i>Histologic pattern</i>	<i>Key pathologic features</i>	<i>Key clinical features</i>
Focal segmental glomerulosclerosis	Sclerosis and hyalinosis of segments of less than 50 percent of all glomeruli on electron microscopy	May be associated with hypertension, renal insufficiency, and hematuria
Membranous nephropathy	Thickening of the glomerular basement membrane on electron microscopy; immunoglobulin G and C3 deposits with immunofluorescent staining	Peak incidence at 30 to 50 years of age; may have microscopic hematuria; approximately 25 percent of patients have underlying systemic disease, such as systemic lupus erythematosus, hepatitis B, or malignancy, or drug-induced nephrotic syndrome
Minimal change disease	Normal-appearing glomeruli on renal biopsy microscopy; effacement of foot processes on electron microscopy	Relatively mild or benign cases of nephrotic syndrome; may occur following upper respiratory infection or immunization

Tabella 1. Glomerulopatie nell'uomo (Kodner, 2009)

FISIOPATOLOGIA

Proteinuria

Una aumentata permeabilità glomerulare, in particolare alle albumine ma anche ad altre proteine plasmatiche, è il processo patologico essenziale affinché si sviluppi la sindrome nefrosica dal momento che lesioni tubulari da sole non risultano in grave albuminuria. (Hull e Goldsmith, 2008; de Seigneux e Martin, 2009). Nel glomerulo la lesione può essere presente a livello di endotelio, di podociti, di membrana basale o interessare queste strutture contemporaneamente (de Seigneux e Martin, 2009).

In condizioni fisiologiche il glomerulo rappresenta un filtro selettivo al passaggio di proteine dal comparto vascolare a quello tubulare. Il processo di filtrazione avviene a tre livelli: l'endotelio, la membrana basale e le cellule epiteliali viscerali, dette podociti. L'endotelio glomerulare è costituito da numerose fenestrature che impediscono il passaggio di molecole di grandi dimensioni, ogni fenestratura ha un diametro di 70-100 nanometri. La membrana basale glomerulare è costituita da collagene (principalmente tipo IV), laminina, proteoglicani polianionici e molte altre glicoproteine. La porosità e la carica anionica della membrana basale determinano le caratteristiche di permeabilità. I podociti sono dotati di prolungamenti interdigitali che aderiscono alla membrana basale, questi prolungamenti, detti pedicelli sono separati tra loro da spazi di 20-30 nanometri. La "barriera glomerulare" permette il passaggio di acqua e di piccoli soluti ed è capace di discriminare tra le diverse molecole proteiche a seconda della loro dimensione e della loro carica (Alpers C.E., 2010) (Figura 1).

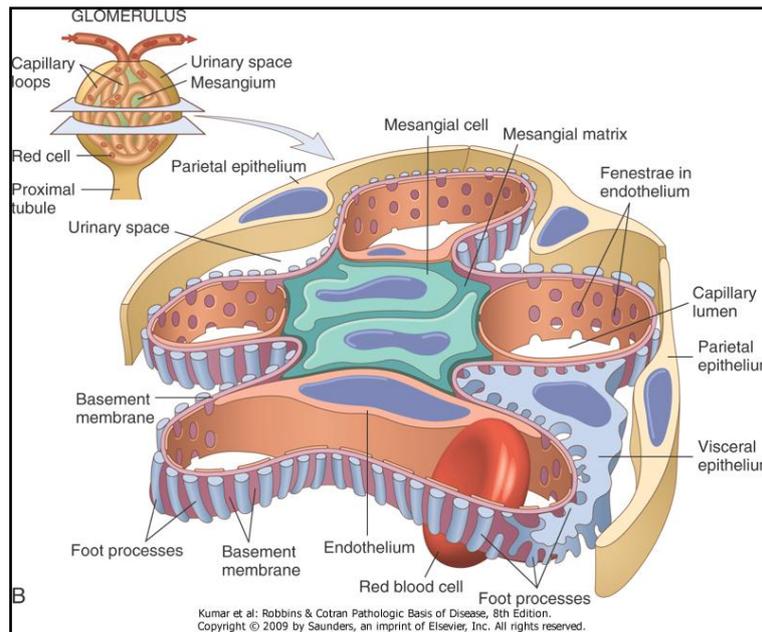


Figura 1. Rappresentazione schematica del glomerulo (Alpers C.E., 2010)

Ipoalbuminemia

L'ipoalbuminemia si sviluppa quando la perdita urinaria di albumina è maggiore della capacità di sintesi da parte del fegato. L'ipoalbuminemia non è causata solamente dalla perdita renale e la quantità di albumina urinaria non si correla con le albumine sieriche. Molti pazienti mantengono livelli normali di albumine sieriche nonostante gravi proteinurie, ed è riconosciuto che tali pazienti sono a rischio minore di sviluppo di complicazioni presenti nella sindrome nefrosica (Charlesworth et al., 2008).

I fattori che contribuiscono all'ipoalbuminemia sono:

1. La perdita urinaria di albumine;
2. Ipercatabolismo;
3. Diminuzione della sintesi da parte del fegato;
4. Ridistribuzione delle albumine.

Edema

L'edema è la più comune manifestazione della sindrome nefrosica. Negli stadi avanzati della malattia, soprattutto al mattino, si manifesta nella regione periorbitale e nelle mani, nel corso della giornata si localizza a livello di genitali, gambe e piedi. Possono essere presenti anche ascite, effusioni pleuriche e pericardiche non sintomatiche (Appel, 2006).

La fisiopatologia della formazione dell'edema in corso di sindrome nefrosica è ancora oggi argomento molto dibattuto e oggetto di studio.

Esistono due principali teorie relative alla fisiopatologia dell'edema, l'ipotesi "underfill" che oggi è quasi completamente accantonata e la cosiddetta "overfill".

La prima ipotesi prevede che la ritenzione di sodio nella sindrome nefrosica sia secondaria ad una diminuzione della pressione arteriosa, da qui il termine "underfill". Secondo questa teoria l'ipoalbuminemia provoca una riduzione della pressione oncotica che causa uno squilibrio tra le forze di Starling e lo spostamento dei fluidi dai vasi all'interstizio, con conseguente ipovolemia e formazione di edemi. Il ridotto volume plasmatico stimola il sistema renina-angiotensina-aldosterone, il sistema nervoso simpatico, aumenta il rilascio dell'ormone antidiuretico e inibisce il rilascio del peptide natriuretico che causano ritenzione di sodio e di acqua nel comparto vascolare, contribuendo al peggioramento dell'edema (Appel, 2006; Rondon-Berrios, 2011) (Figura 2).

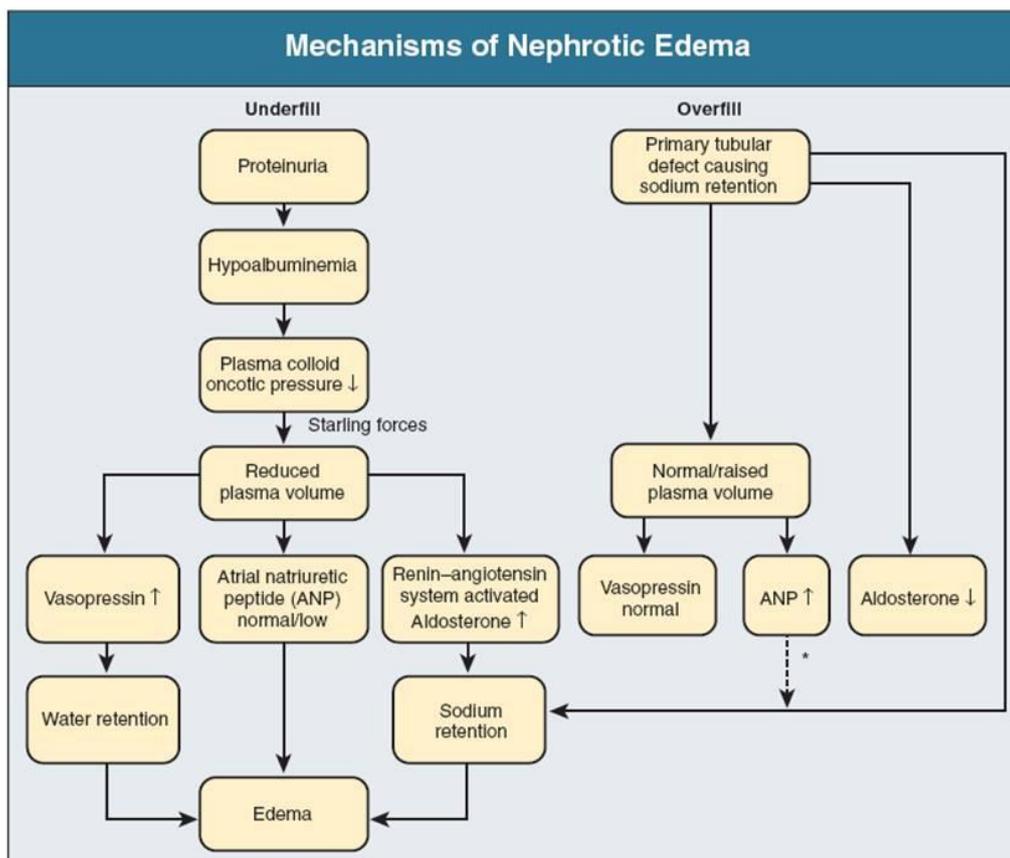


Figura 2. Meccanismi di formazione dell'edema in corso di sindrome nefrosica. Teoria "Underfill" e "Overfill" (Fechally e Johnson, 2003)

Esistono diverse argomentazioni contro questa teoria, in quanto sono stati condotti diversi studi su ratti e pazienti ana/ipoalbuminemici che non sviluppavano edema o ritenzione di sodio o ancora su ratti adrenalectomizzati e quindi privi di aldosterone in cui era comunque presente ritenzione di sodio e ascite (Rondon-Berrios, 2011). Inoltre gli ACE-inibitori, che riducono la produzione di aldosterone e quindi la ritenzione di sodio, non riescono a normalizzare le concentrazioni di sodio nei pazienti nefrosici (Schrier e Fassett, 1998).

Inoltre, questo meccanismo potrebbe spiegare in parte l'accumulo di fluidi nei bambini con sindrome nefrosica, in quanto essi hanno un ridotto volume plasmatico e sono ipotesici, ma negli adulti il meccanismo appare più complesso in quanto i pazienti presentano spesso un normale/aumentato volume plasmatico che si associa all'accumulo di fluidi a livello interstiziale (Kodner, 2009).

La teoria alternativa postula che la ritenzione di sodio sia un fenomeno primariamente renale, che compare con la proteinuria, indipendente dall'ipoalbuminemia, indotta da una alterazione nell'escrezione di sodio, da qui il nome "overflow" (Figura 2).

Coinvolti nella ritenzione di sodio sembra ci siano i canali del sodio, chiamati ENaC, che si trovano a livello di tubulo collettore. Gli ENaC, nei pazienti proteinurici, vengono attivati da serinproteasi. Svenningsen e coll. (2009) hanno dimostrato che il plasminogeno presente nelle urine di ratto con sindrome nefrosica è la serinproteasi responsabile dell'attivazione degli ENaC.

Il plasminogeno, presente nelle urine a causa dell'alterata filtrazione glomerulare, viene convertito a plasmina dall'azione di urokinasi normalmente presente a livello di tubulo collettore. La plasmina attiva i canali del sodio, con la successiva comparsa di edema causata da una aumentata pressione idrostatica associata ad ipoalbuminemia (Figura 3).

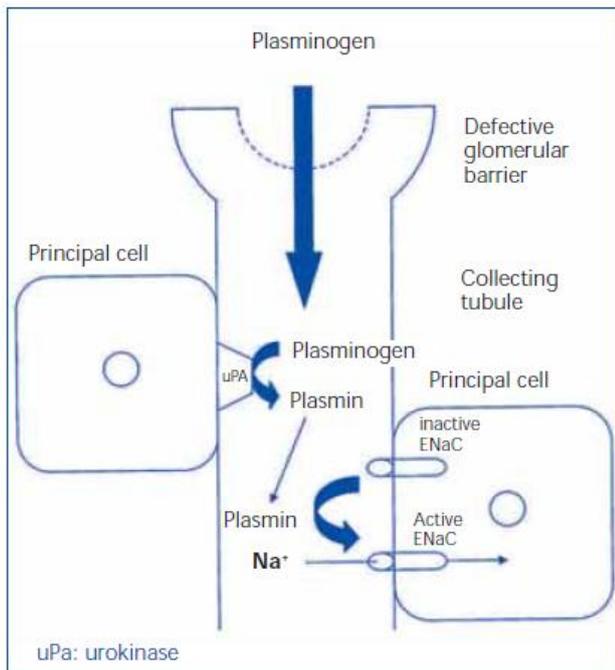


Figura 3. Teoria “Overfill”. La plasmina nel tubulo collettore attiva gli ENaC (Rondon-Berrios, 2011)

I reni di pazienti proteinurici, inoltre, non rispondono normalmente all’azione del peptide natriuretico e quindi non riescono ad eliminare il sale in eccesso (Appel, 2006).

A queste teorie principali se ne affiancano altre, come ad esempio la teoria dell’ “infiammazione tubulo-interstiziale” che ipotizza una aumentata produzione di angiotensina II e quindi di aldosterone causata da un infiltrato leucocitario che è stato diagnosticato in reni di pazienti adulti nefrosici, ma non nei bambini (Rodriguez-Iturbe et al., 2002).

La teoria della “aumentata permeabilità vascolare” suggerisce che l’accumulo di fluidi sia legato ad un aumento della permeabilità endoteliale legata alla presenza di fattori di permeabilità circolanti (autoanticorpi o citochine) e ad un alterazione a carico del sistema immunitario, piuttosto che ad una alterazione delle forze di Starling. Si è visto che esiste una associazione tra sindrome nefrosica e fenomeni allergici, quali reazione avverse al cibo, a punture di insetti e a vaccinazioni. La risposta a farmaci immunosoppressivi avvalorava l’ipotesi del coinvolgimento del sistema immunitario nella patogenesi della sindrome nefrosica di natura idiopatica (van den Berg e Weening, 2004).

Iperlipidemia

La sindrome nefrosica può causare una grave dislipidemia con aumenti marcati di colesterolo, trigliceridi, lipoproteine a bassa densità (LDL), lipoproteina a, e alterazioni delle lipoproteine ad elevata densità (HDL).

La dislipidemia rappresenta un fattore di rischio per le malattie cardiovascolari, contribuisce alla progressione della malattia renale e all'aumento della mortalità nei pazienti con sindrome nefrosica (de Seigneux e Martin, 2009).

La patogenesi non è ancora del tutto chiara, ma due meccanismi contribuirebbero alla dislipidemia: una iperproduzione da un lato ed un diminuito catabolismo dall'altro di lipoproteine (Figura 4).

Una diminuita pressione oncotica stimolerebbe il fegato a produrre lipoproteine che legano il colesterolo, oppure, un'altra teoria ipotizza la perdita attraverso le urine di un non identificato fattore regolatore che, una volta perso, non inibisce più il fegato nel suo ruolo di produttore di lipoproteine (Appel, 2006).

E' probabile che con le urine vengano perse anche proteine deputate al catabolismo dei lipidi (Orth e Ritz, 1998).

Nonostante l'iperlipidemia, si riscontrano spesso valori di HDL normali o bassi, in particolare quelli delle HDL-2 che hanno un ruolo protettivo per l'aterosclerosi, probabilmente a causa della loro perdita attraverso le urine (Appel, 2006).

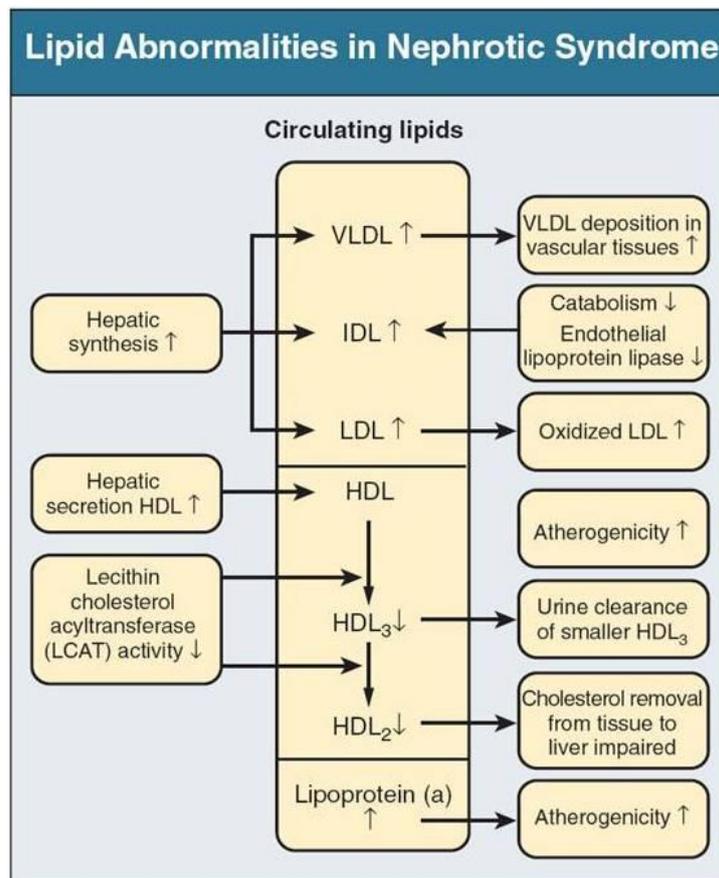


Figura 4. Alterazioni del metabolismo lipidico in corso di sindrome nefrosica (Feehally e Johnson, 2003)

Tromboembolismo

La sindrome nefrosica è un importante fattore di rischio per il tromboembolismo, sia arterioso che venoso, soprattutto nei pazienti giovani e nelle fasi iniziali di tale sindrome. Il rischio può arrivare anche al 40% in alcune forme, come ad esempio nella nefropatia membranosa, anche se non è ancora chiaro il perché questo si verifichi. Molti pazienti, nonostante la presenza di trombi, spesso sono asintomatici ritardando così la diagnosi e facendo in modo che spesso tali eventi rimangano solo un sospetto (de Seigneux e Martin, 2009).

I pazienti considerati più ad alto rischio sono quelli con concentrazioni di albumina sierica minore di 2.0 g/dl, ipovolemici, costretti all'immobilità e che presentano una nefropatia membranosa (Charlesworth et al., 2008)

Le complicazioni tromboemboliche sono, in ordine di frequenza, la trombosi venosa profonda, l'embolismo polmonare e la trombosi della vena renale (RVT). Fenomeni arteriosi sono piuttosto rari (Kayali et al., 2008).

La fisiopatologia non è ancora stata chiarita del tutto ma quello che si verifica è un'alterazione dell'equilibrio tra fattori pro e anticoagulanti.

Lo sviluppo di uno stato di ipercoagulabilità è legato in parte alla perdita attraverso le urine di fattori antitrombotici dal basso peso molecolare (Charlesworth et al., 2008).

L'attivazione e l'aggregazione piastrinica, l'aumento di alcuni fattori della coagulazione (in particolare il fattore VIII) e del fibrinogeno, la diminuzione di proteine anticoagulanti come l'antitrombina (AT III), la proteina C e la proteina S, l'ipoalbuminemia, e la riduzione dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1) con una conseguente alterata fibrinolisi, associati all'immobilizzazione, all'utilizzo di diuretici, sono alcune delle cause che provocano uno stato di ipercoagulabilità in questi pazienti (Singhal e Brimble, 2006; Hull e Goldsmith, 2008) (Figura 5).

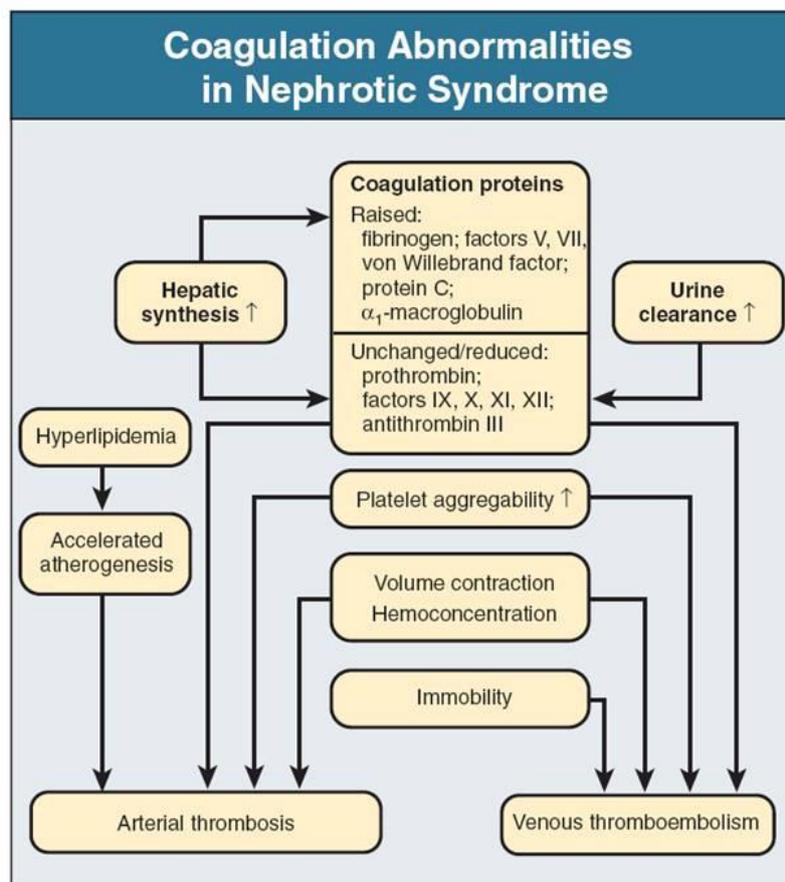


Figura 5. Alterazioni emostatiche in corso di sindrome nefrosica (Feehally e Johnson, 2003)

L'associazione tra anomalie a carico dell'asse coagulativo e la comparsa di fenomeni trombo embolici non è del tutto chiarita, quindi non sono ben noti i parametri che meglio possano indicare al clinico quali siano i pazienti più a rischio e quale sia il momento ideale per cominciare una profilassi anticoagulante (Charlesworth et al., 2008).

Ad oggi, valori di albumine minori di 2.0 g/dl, una proteinuria maggiore di 10 g/24 h, elevati livelli di fibrinogeno, livelli di attività di AT III minori del 75% e ipovolemia sono tutti fattori associati ad un aumentato rischio tromboembolico in questi pazienti. E' incerto se gli antiaggreganti piastrinici diano benefici nella prevenzione dei trombi in corso di sindrome nefrosica (Orth e Ritz, 1998; Charlesworth et al., 2008; de Seigneux e Martin, 2009).

Infezioni

Le infezioni sono state riportate in più del 20% dei pazienti adulti con sindrome nefrosica. La maggiore suscettibilità alle infezioni è causata da una ridotta concentrazione di immunoglobuline G (IgG), ridotta attività del complemento e dei linfociti T, l'utilizzo di farmaci immunosoppressivi (Charlesworth et al., 2008; Hull e Goldsmith, 2008; de Seigneux e Martin, 2009).

Nei bambini sono frequenti soprattutto patogeni dotati di capsula come ad esempio gli pneumococchi che causano polmonite, peritonite, dermoipodermite, negli adulti sono presenti soprattutto bastoncini gram negativi come gli *E. coli* che possono causare sepsi.

Non c'è evidenza che una copertura antibiotica profilattica sia efficace, è invece raccomandato il vaccino antipneumococco perché si è visto che i bambini rispondono normalmente alla vaccinazione con la produzione di anticorpi anche se i livelli si abbassano rapidamente nell'arco di 6 mesi (Charlesworth et al., 2008, Kodner 2009).

Insufficienza renale acuta

E' una rara complicazione spontanea della sindrome nefrosica. Le persone anziane, i bambini ed i pazienti con edemi e gravi proteinurie sono a rischio maggiore. Le cause possono essere una eccessiva diuresi, nefrite interstiziale correlata all'uso di diuretici e di antiinfiammatori non steroidei, sepsi, trombosi renale, ipotensione (Hull e Goldsmith, 2008; Kodner, 2009).

Anemia

In corso di sindrome nefrosica l'anemia, legata a malattia renale cronica a causa di una riduzione della produzione di eritropoietina, potrebbe essere aggravata dalla perdita urinaria di eritropoietina, transferrina e ferro. L'associazione tra anemia e sindrome nefrosica in assenza di insufficienza renale è ancora oggi oggetto di discussione (de Seigneux e Martin, 2009).

CAPITOLO II

LA SINDROME NEFROSICA E LE PATOLOGIE GLOMERULARI NEL CANE

DEFINIZIONE ED EPIDEMIOLOGIA

La sindrome nefrosica (SN) è ben documentata nei cani e rappresenta una complicazione non molto frequente delle glomerulopatie proteino-disperdenti in questa specie. La reale prevalenza di questa sindrome è ancora sconosciuta, studi retrospettivi di cani con patologie glomerulari riportano che il 5,8-37,8% di pazienti avevano una sindrome nefrosica al momento della presentazione in clinica (DiBartola et al., 1980; Jaenke e Allen, 1986; Center et al., 1987; Cook e Cowgill, 1996). La frequenza di patologie glomerulari in cani con e senza evidenza di malattia renale è alta e va dal 43 al 90% e si può manifestare in cani di tutte le età ma è più comune in cani adulti e anziani (Vaden e Grauer, 2011).

La sindrome nefrosica si verifica in soggetti più giovani di quelli che manifestano una glomerulopatia non nefrosica (6,2 vs 8,4 anni) (Klosterman et al., 2011).

Come nell'uomo, la sindrome nefrosica nel cane è caratterizzata dalla concomitante presenza di proteinuria, ipoalbuminemia, iperlipidemia e accumulo extravascolare di fluidi. Ad oggi non è stato ancora chiarito se le ultime due componenti che si riscontrano in questa sindrome siano una conseguenza di una massiva perdita di albumine e di una diminuzione della pressione oncotica o se, piuttosto, siano manifestazioni distinte di uno o più processi patologici non ancora identificati (Pressler, 2011).

Si è visto sia in Medicina Umana, che in Veterinaria come la concentrazione sierica di albumine sia correlata con la sindrome nefrosica, ma non ne sia la sola causa: i sintomi e le alterazioni clinicopatologiche che accompagnano questa sindrome non sono spiegati dalla sola ipoalbuminemia. Alcuni pazienti umani con valori di albumine > di 2.5 g/dl manifestano una sindrome nefrosica, mentre altri, pur marcatamente ipoalbuminemici, non presentano edemi.

Un aumento del catabolismo delle albumine, una diminuzione della loro sintesi da parte del fegato, una loro redistribuzione contribuiscono all'ipoalbuminemia in corso di glomerulopatia (Charlesworth et al., 2008). In maniera simile accade negli animali, in cui una sindrome nefrosica si può sviluppare in concomitanza ad una grave ipoalbuminemia, ma una riduzione della proteinuria non comporta una riduzione dell'accumulo di fluidi (Klostermann et al., 2011).

La SN è caratterizzata da una proteinuria persistente e definita "glomerulare" ovvero con valori di UPC ≥ 2 (Lees et al., 2005).

La presenza di una SN non dovrebbe far aumentare il sospetto clinico di un particolare tipo istologico (Pressler, 2011).

Diversi studi hanno riportato che le maggiori perdite di albumine si verificano in corso di nefropatia membranosa, amiloidosi e minimal change disease (MCD) e quindi, verosimilmente, tali patologie, maggiormente di altre, potrebbero causare una sindrome nefrosica (Center et al., 1987; Cook e Cowgill, 1996; Biewenga, 1986; Jaenke e Allen, 1986), ma in un recente studio condotto da Klosterman e coll. (2011) non è stata riportata alcuna associazione tra il tipo istologico di glomerulopatia e la SN, a differenza di quanto accade in medicina umana.

Ad oggi, le relazioni tra la comparsa di sindrome nefrosica, il segnalamento, il tipo di malattia glomerulare, la gravità della proteinuria, l'ipoalbuminemia e lo sviluppo di complicazioni sono poco conosciute nella specie canina (Klosterman et al., 2011).

Le proteine filtrate in eccesso dal glomerulo nelle urine possono creare un danno tubulointerstiziale in quanto si accumulano nel lume e, dopo endocitosi, nelle cellule epiteliali del tubulo prossimale.

Durante il riassorbimento di queste proteine possono essere liberati dei lipidi a basso peso molecolare che hanno proprietà chemotattiche e proinfiammatorie e che contribuiscono al danno tubulointerstiziale. Anche le componenti del complemento filtrate possono contribuire a tale danno.

Infine, le proteine, a seguito del riassorbimento di acqua nelle porzioni distali del nefrone, possono portare alla formazione di cilindri che ostruiscono il nefrone.

I danni a livello glomerulare associati ai danni tubulari rendono l'intero nefrone non funzionante e la progressione della malattia si traduce in una diminuzione della filtrazione glomerulare con conseguente iperazotemia e insufficienza renale (Jacob et al., 2005).

Studi nell'uomo e in animali di laboratorio hanno dimostrato come la proteinuria possa determinare danno glomerulare e tubulointerstiziale e comportare la progressiva perdita di nefroni funzionanti (Grauer, 2011).

EZIOLOGIA

I cani con un rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria ≥ 2 (proteinuria glomerulare) presentano una glomerulopatia, ma è necessaria una biopsia renale per determinare l'esatto processo patologico alla base della patologia (Tabella 1).

Da un punto di vista istologico, le forme più comuni di malattia glomerulare nel cane sono la glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN), la nefropatia membranosa (MN) e l'amiloidosi.

In un recente studio condotto da Klosterman e coll. (2011) su 35 cani che presentavano una sindrome nefrosica, nel 31% era stata diagnosticata una nefropatia membranosa, nel 26% l'amiloidosi, nel 23% una glomerulonefrite membranoproliferativa.

Tabella 1 Glomerulopatie nel cane

- Amilodosi
- Glomerulosclerosi focale segmentale
- Glomerulonefrite
 - Membranoproliferativa (MPGN)
 - Tipo I mesangiocapillare (comune)
 - Tipo II malattia da deposito denso (rara)
 - Proliferativa (mesangiale ed endocapillare)
 - Nefropatia da IgA
- Glomerulosclerosi
- Nefrite ereditaria
- Nefrite da Lupus Eritematosus Sistemico
- Nefropatia membranosa (MN)
- Minimal Change Glomerulopathy

Vaden e Grauer, 2011

Le glomerulopatie possono suddividersi in familiari, descritte in diverse razze (Tabella 2), e acquisite.

Tabella 2 Glomerulopatie familiari del cane

- Beagles: amiloidosi, glomerulonefrite membranoproliferativa
- Bovaro del bernese: glomerulo nefrite mesangioproliferativa
- Bull terrier: nefrite ereditaria
- Cocker spaniel: nefrite ereditaria
- Dalmata: nefrite ereditaria
- Dobermann pinscher: glomerulo sclerosi, atrofia cistica glomerulare
- English foxhound: amiloidosi
- Rottweiler: glomerulopatia atrofica
- Samoiedo: nefrite ereditaria (rara)
- Shar Pei: amiloidosi

Vaden e Grauer, 2011

Le glomerulopatie acquisite sono molto spesso malattie immunomediate causate o dalla formazione di immunocomplessi in “situ” quando gli anticorpi si legano ad antigeni glomerulari o ad antigeni solubili localizzati sulla superficie subendoteliale, subepiteliale o mesangiale, oppure causate da immunocomplessi circolanti che vengono intrappolati a livello mesangiale o subepiteliale (Es. MN, MPGN e glomerulonefrite proliferativa). Altre cause di glomerulopatie possono essere fattori sistemici che danneggiano il glomerulo (es. amiloidosi, glomerulosclerosi focale segmentale, minimal change disease) o malattie primarie sistemiche quali neoplasie, infezioni, o processi non infettivi, le cosiddette **NIN** (Tabella 3) (Vaden e Grauer, 2011).

Tabella 3 Malattie riportate in associazione con le glomerulopatie nel cane

- Malattie sistemiche
 - Neoplasie
 - Leucemia (G)
 - Linfosarcoma (A, G)
 - Mastocitosi (G)
 - Istiocitosi sistemica (G)
 - Altre neoplasie (A, G, MN)
 - Infezioni
 - Borreliosi (MPGN)
 - Leishmaniosi (A, MPGN, MN, P-E e M)
 - Babesiosi (MPGN)
 - Ehrlichiosi (G)
 - Endocardite (G)
 - Pielonefrite (A)
 - Piometra (A, G)
 - Piodermite (A, G)
 - Altre infezioni batteriche croniche (A, G)
 - Adenovirus canino tipo 1 (P-M)
 - Dirofilariosi (A, MPGN, MN)
 - Infiammatorio non infettivo
 - Dermatite cronica (A, G)
 - Malattia infiammatoria intestinale (IBD)
 - Pancreatite (A, G)
 - Poliartrite (A, G)
 - Lupus Eritematoso Sistemico (A, MPGN, MN, P-E e M)
 - Altre malattie immunomediate (G)
 - Altre cause
 - Corticosteroidi (G)
 - Trimethoprim-sulfamidici (G)
 - Infusione cronica di insulina (A)
 - Idiopatica (A,G, MPGN, MN, MCD, P-E o M)

A, amiloidosi; G, glomerulonefrite; MPGN, glomerulonefrite membranoproliferativa; MN nefropatia membranosa; MCD minimal change disease; P, proliferative (E, endocapillare e M, mesangiale) Vaden e Grauer, 2011

Un processo NIN può non essere evidente alla prima presentazione, perché non manifesto o perché già risolto. Nello studio di Center e coll. (1987) l'88% di cani inclusi nello studio presentava malattie croniche oltre alla glomerulopatia: eccesso di glucocorticoidi (34%), infiammazioni cutanee croniche (27%), neoplasie (17%), poliartrite (12%), lupus eritematosus sistemico (7%).

In uno studio condotto da Cook e Cowgill (1996) in cani che presentavano glomerulopatie proteino-disperdenti, in un 48,2% (66/106) non è stato possibile evidenziare alcuna causa sottostante, mentre nel 51,8% (71/106) dei casi sono state riscontrate malattie concomitanti: tra le più frequenti i processi neoplastici (19,7%), seguiti da infezioni (11,7%), poliartrite (5,1%), epatite (4,4%) ipocortisolismo (2,2%).

In cani affetti da amiloidosi, nel 37% è stato identificato un processo infiammatorio sottostante e nel 20% una neoplasia (DiBartola et al., 1989)

Glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN)

È la forma più comune di glomerulonefrite nel cane in quanto colpisce il 20-60% dei soggetti affetti da una glomerulopatia (Koeman et al., 1987; MacDougall et al., 1986). I cani che presentano questo tipo istologico hanno un'età media media 10,5 anni e una distribuzione uguale tra maschi e femmine (Vilafranca et al., 1994)

Una forma familiare di MPGN, spesso fatale, accompagnata da necrosi tubulare e infiammazione interstiziale è stata identificata nel bovino del Bernese. In passato si credeva che tale forma fosse legata ad una sieropositività nei confronti di *Borrelia burgdorferi* (Gerber et al., 2009).

Esistono tre tipi di MPGN, il tipo I è provocato da processi infettivi ed è caratterizzato da accumulo di immunocomplessi sulla superficie subendoteliale della membrana basale glomerulare, nel tipo III i depositi si localizzano o nel mesangio o a livello sub epiteliale.

Il tipo II è definito come "malattia da depositi densi" ed è caratterizzato da depositi intramembranosi di natura sconosciuta, è molto raro nel cane e non è associata a processi infettivi (Vaden e Brown, 2009; Vaden, 2010). L'accumulo di immunocomplessi o dei depositi densi porta all'attivazione e alla proliferazione del mesangio e alla chemiotassi dei leucociti.

La forma più frequente nel cane è la MPGN tipo I, forma nella quale i depositi sono facilmente raggiungibili dalle cellule infiammatorie circolanti e dalle piastrine che causano una grave alterazione a carico dei capillari.

La MPGN è caratterizzata dall'ispessimento della parete dei capillari e dalla proliferazione delle cellule mesangiali (Vaden e Brown, 2009). La diagnosi è basata sulla microscopia ottica ed elettronica, gli immunocomplessi sono costituiti primariamente da IgG.

.La MPGN può essere di origine sconosciuta o secondaria a malattie NIN, l'infiltrato a volte è caratterizzato da monociti o da neutrofili, questo pattern è causato da infezioni transitorie che spesso si risolvono prima che compaiano i segni clinici di una glomerulonefrite (Vaden e Brown, 2009).

Nel cane mancano dati riguardanti la prognosi, il trattamento della MPGN è rivolto alla causa sottostante (infettiva, infiammatoria o neoplastica) e, poiché l'infiltrazione delle piastrine sembrerebbe essere coinvolta nella patogenesi, possono essere utilizzati farmaci antiplastrinici, come ad esempio l'aspirina (Vaden e Brown, 2009; Vaden e Grauer, 2011).

Nefropatia membranosa (MN) o glomerulonefrite membranosa (MGN)

E' la seconda malattia glomerulare più comune, si verifica nel 10-45% dei cani con glomerulonefrite, con un'età media di 8 anni (1-14 anni), è più frequente nei maschi (rapporto maschi:femmine, 1,75:1) e causa una grave proteinuria, quindi molti degli animali affetti presentano una sindrome nefrosica completa o parziale (Lewis, 1976; Muller-Peddinghaus e Trautwein, 1977; Jaenke e Allen, 1986; Vilafranca et al., 1994; Cook e Cowgill, 1996).

Non sembra esserci una predisposizione di razza anche se in uno studio condotto da Jaenke e Allen (1986) è stata riscontrata una maggiore frequenza in Dobermann Pinchers, alcuni dei quali molto giovani, facendo presupporre una origine congenito-familiare.

E' causata dal deposito di immunocomplessi, per lo più contenenti IgG e la componente C3 del complemento, sulla superficie sub epiteliale.

Gli immunocomplessi si depositano lontano dai capillari, dal lato urinario della membrana basale, l'attivazione del complemento e la risposta delle citochine è ridotta, il che provoca un'assenza di infiammazione nella nefropatia membranosa. Gli immunocomplessi inducono un danno complemento-mediato ai podociti, i quali producono membrana basale con la formazione di proiezioni evidenti intorno ai depositi. La cellularità è normale ma i capillari appaiono rigidi e ispessiti, casi avanzati presentano un ispessimento irregolare, una deformazione delle pareti dei capillari e a volte un ispessimento del mesangio.

In Medicina Umana può essere secondaria ad altre malattie concomitanti o primaria, quest'ultimo caso è il più frequente. L'esatta patogenesi non è chiara ma si pensa che la forma primaria sia causata da immunocomplessi che originano "in situ", quando anticorpi reagiscono

con antigeni fissati ai podociti, in questo caso alla base ci sarebbe un meccanismo autoimmune, mentre la forma secondaria è causata verosimilmente da complessi circolanti.

La malattia si divide in quattro stadi che si correlano con l'evoluzione temporale della malattia e con la presentazione clinica: 1) stadio I, deposizione di immunocomplessi con minimo ispessimento della membrana basale; 2) stadio II, comparsa dei cosiddetti "spikes" o proiezioni; 3) stadio III, le proiezioni circondano gli immunodepositi; 4) stadio IV, la membrana basale è marcatamente ispessita e nello stadio avanzato, a volte definito come stadio V, c'è un ispessimento variabile della membrana con una apparente risoluzione dei depositi.

In alcuni casi è difficile riconoscere gli stadi in quanto, negli animali, possono essere presenti contemporaneamente (Vaden, 2010), stadi più avanzati della patologia sono comunque stati correlati con una più grave iperazotemia, mentre stadi intermedi con la presenza di una sindrome nefrosica (Jaenke e Allen, 1986).

La nefropatia membranosa è una patologia lentamente progressiva, quindi molti animali riescono a condurre una vita normale.

La terapia immunosoppressiva è raccomandata negli animali con proteinuria persistente, in modo particolare se non sono azotemici e se sono affetti da una forma idiopatica (Vaden e Brown, 2009).

Glomerulonefrite proliferativa (mesangioproliferativa)

Colpisce una percentuale di cani con glomerulonefrite che va dal 2 al 16% (Koeman et al., 1987; Vilafranca et al., 1994; MacDougall, 1986; Cook e Cowgill, 1996). L'età media dei cani affetti è di 7-9 anni (Vaden e Brown, 2009).

Questa glomerulonefrite è una malattia immunomediata ed è caratterizzata da iperplasia delle cellule mesangiali, definita come 4 o più cellule per area mesangiale, spesso accompagnata da un aumento anche della matrice mesangiale (Vaden e Grauer, 2011).

Questo pattern di malattia è di solito associata a infezioni di durata limitata che si risolvono spesso prima che compaiano i segni clinici di una glomerulopatia, infezioni persistenti causano soprattutto MPGN e MN (Vaden, 2010).

Alla microscopia elettronica gli immunocomplessi sono presenti nel mesangio ma anche a livello di membrana basale, l'immunofluorescenza rivela depositi costituiti da IgG, IgM o C3. In alcuni casi è stata dimostrata una moderata presenza di IgA, suggerendo una possibile nefropatia da IgA che si verifica raramente nei cani (Vaden e Grauer, 2011).

Uno studio condotto su cani clinicamente sani con lesioni glomerulari ha rivelato nel 75% dei soggetti immunocomplessi contenenti IgA (Biewenga et al., 1982), ancora in un altro studio di cani con e senza nefropatia, 47/100 presentavano depositi di IgA e in 6 le IgA erano le sole immunoglobuline presenti (Miyachi et al., 1992).

Cani con epatopatie ed enteropatie avevano la più alta incidenza di depositi IgA a causa verosimilmente di una aumentata produzione, associata all'enteropatia, e ad una diminuita clearance in associazione all'epatopatia, patogenesi, questa, proposta in Medicina Umana (Miyachi et al., 1992).

La prognosi non è stata valutata nei cani, il trattamento è diretto alla patologia sottostante e alle complicazioni secondarie (Vaden; 2010).

Amiloidosi

L'amiloidosi è caratterizzata dalla deposizione extracellulare di fibrille formate dalla polimerizzazione di una proteina con una conformazione a β -foglietti che rende le fibrille insolubili e resistenti alla proteolisi. La proteina coinvolta è la amiloide (AA) che è formata dalla polimerizzazione della porzione aminoterminale della seroamiloide A (SAA), una proteina di fase acuta che aumenta di 100-1000 volte dopo un danno tissutale. Un'infezione cronica e prolungata, malattie infiammatorie non infettive e neoplasie costituiscono le cause sottostanti dell'amiloidosi *secondaria o reattiva*. Questa forma è quella più comune, colpisce soprattutto gli animali anziani e le femmine. Le razze più colpite sono i Beagles, i Collie e i Walker round (DiBartola et al., 1989). Esiste una forma familiare nei Beagles e negli English Foxhound (Mason e Day, 1996).

Gli animali affetti presentano una massiva proteinuria, per lo più non selettiva e spesso sono affetti da sindrome nefrosica.

Oltre a colpire i reni, l'amiloidosi può coinvolgere il fegato, la milza, l'apparato gastrointestinale, anche se i sintomi a carico di questi organi e apparati non sono molto frequenti.

L'amiloide si deposita primariamente a livello glomerulare ad eccezione che negli Shar-pei, che presentano una forma familiare di amiloidosi reattiva che è caratterizzata da una maggiore deposizione midollare di amiloide. Nello studio condotto da DiBartola e coll. (1990) su 14 Shar-pei, tutti i cani avevano depositi midollari mentre solo il 64 % presentava depositi glomerulari. La presenza di depositi di amiloide a livello midollare ha comportato che solo il 25-43% dei cani affetti presentasse proteinuria, infatti, la presentazione principale è stata

quella di una insufficienza renale (vomito, anoressia, poliuria, polidipsia, letargia, perdita di peso e disidratazione), dal momento che un maggiore coinvolgimento della midollare causa ischemia, fibrosi cronica interstiziale, perdita di nefroni.

La malattia negli Shar-pei è stata comparata alla febbre Mediterranea nell'uomo che è caratterizzata da febbre di origine sconosciuta, amiloidosi renale, pleurite, peritonite e sinovite (Pras, 1998).

L'amiloide si deposita nel mesangio e a livello subendoteliale, quindi al microscopio ottico, con la colorazione in Ematossilina-Eosina, si presenta sotto forma di materiale acellulare eosinofilo che espande il mesangio e la parete dei capillari glomerulari. Possono essere presenti depositi peritubulari e perivascolari nella midollare (Foto 1).

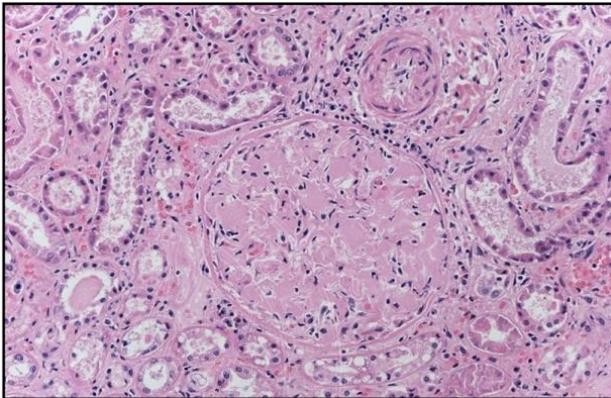


Foto 1. Amiloidosi Renale. Ematossilina-Eosina, cane. (www.portaledidatticovet.unibo.it)

La colorazione Rosso Congo e la visualizzazione delle sezioni con microscopio a luce polarizzata permettono di riconoscere l'amiloide come deposito birifrangente di colore "verde mela" (Vaden e Grauer, 2011) (Foto 2)

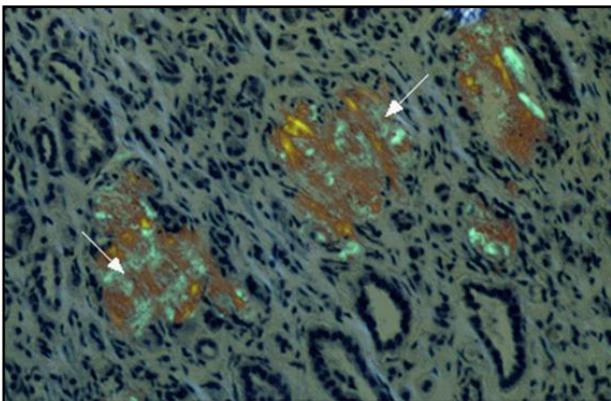


Foto 2. Amiloidosi renale. Colorazione Rosso Congo, uomo. Le frecce indicano i depositi birifrangenti di amiloide di colore "verde mela" (www.unckidneycenter.org)

Il trattamento terapeutico d'elezione dell'amiloidosi ad oggi è costituito dalla colchicina. Questo farmaco altera il meccanismo di rilascio di SAA dagli epatociti e quindi funziona prevalentemente nella fase di pre-deposizione; la colchicina è in grado di ridurre la proteinuria, ma non c'è evidenza di efficacia quando compare insufficienza renale.

L'altro farmaco è il dimetilsolfossido (DMSO) che ha mostrato benefici in un numero limitato di cani con amiloidosi renale (Pressler e Vaden, 2003). Non si conosce l'esatto meccanismo: non solubilizza le fibrille di amiloide ma, durante la fase di deposizione, riduce le concentrazioni di SAA, il suo effetto antiinfiammatorio può portare ad una diminuzione della proteinuria e ad un miglioramento della funzionalità renale (Vaden e Brown, 2009).

La prognosi per questa patologia è di solito infausta.

Glomerulosclerosi

La glomerulosclerosi spesso si sviluppa come lesione finale in risposta ad un danno glomerulare o a una diminuzione della massa renale funzionante (Vaden e Brown, 2009), infatti quando il numero di nefroni diminuisce, quelli rimanenti vanno incontro ad ipertrofia e ad un aumento della loro funzionalità che, da un lato migliora la velocità di filtrazione glomerulare (GFR), ma dall'altro, causa un danno al glomerulo con successiva glomerulosclerosi e diminuzione della funzionalità renale (Vaden e Brown, 2009).

La sclerosi può essere focale o generalizzata, primaria o secondaria ad altre patologie come ad esempio ad una malattia renale cronica (CKD), o all'ipertensione e la percentuale di glomeruli affetti aumenta all'aumentare dell'età (Vaden, 2010).

La glomerulo sclerosi è caratterizzata da iperplasia delle cellule del mesangio e da altre alterazioni come ialinosi e aderenza delle porzioni sclerotiche alla capsula di Bowman (Vaden e Brown, 2009).

La **glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS)** è una malattia propria del glomerulo che è poco comune nel cane ma molto frequente nell'uomo. Probabilmente in Medicina Veterinaria è sotto diagnosticata in quanto può essere confusa con la MPGN.

In uno studio su cani con glomerulopatie, la FSGS è stata diagnosticata nel 10% di cani con un'età media di 8,5 anni (Vilafranca et al., 1994)

La FSGS si diagnostica quando un paziente proteinurico ha una glomerulosclerosi segmentale in un glomerulo per il resto normale, l'immunofluorescenza di solito risulta negativa, anche se è possibile rinvenire immunoglobuline e C3 nelle aree sclerotiche (Vaden, 2010).

Nefrite ereditaria

Per nefrite ereditaria si intende un gruppo di malattie glomerulari ereditarie causate da una alterazione del collagene di tipo IV della membrana basale (Lees et al., 1998). Nell' English Cocker Spaniel è stata riportata una forma autosomica recessiva, nel Dalmata e nel Bull terrier una forma autosomica dominante (Lees et al., 1998; Hood et al., 2002; Hood et al., 1995; Lees et al., 1999).

E' caratterizzata da proteinuria, ematuria renale e una progressiva glomerulopatia, nell'uomo sono stati descritti problemi oculari e all'udito ma sono infrequenti nel cane.

La diagnosi richiede la microscopia elettronica ed è possibile vedere la frammentazione della membrana basale con, spesso, depositi elettron-densi intramembranosi (Valden e Grauer, 2011)

Minimal change disease (MCD)

La minimal change disease è una causa comune di sindrome nefrosica nell'uomo, in modo particolare nei bambini (Bagga e Mantan, 2005).

Nel cane è descritta in maniera sporadica ed è probabilmente sottodiagnosticata in quanto è necessaria la microscopia elettronica per individuare le lesioni ultrastrutturali ai processi podocitari. E' stata descritta in un Collie femmina di 4 anni in uno studio condotto da Vilafranca e coll. (1993).

In Medicina Umana è solitamente idiopatica ed è causata da una aumentata permeabilità della membrana basale a causa di linfocine prodotte da cellule T che presentano un alterato funzionamento. Inizialmente si verifica una perdita di carica anionica nella parete capillare glomerulare con un conseguente collasso dei processi podocitari, la perdita di carica causa una proteinuria altamente selettiva, con perdita quasi esclusiva di albumine.

La prognosi nel cane è sconosciuta, è importante includerla nella lista delle diagnosi differenziali in quanto risponde per l'80-90% al trattamento con corticosteroidi (Vaden, 2010).

DIAGNOSI E ALTERAZIONI CLINICOPATOLOGICHE IN MEDICINA UMANA E VETERINARIA

La diagnosi di sindrome nefrosica richiede la concomitante presenza di proteinuria, ipoalbuminemia, iperlipidemia e accumulo extravascolare di fluidi, quindi è necessario considerare sia i segni clinici, sia quelli clinico patologici. (Figura 1 e 2)

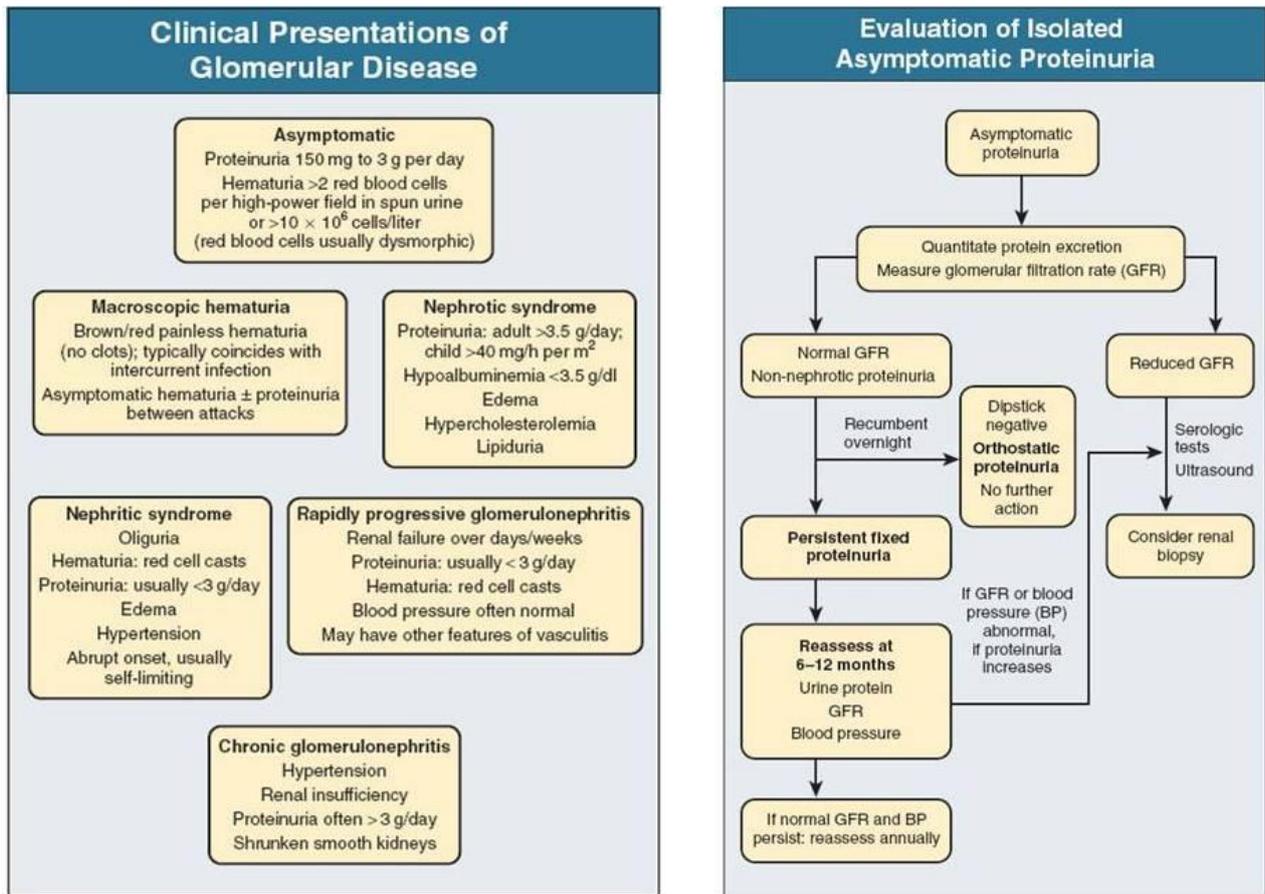


Figura 1 e 2. Presentazione clinica delle glomerulopatie nell'uomo e valutazione di pazienti con proteinuria asintomatica (Feehally e Johnson, 2003)

Nel cane oltre alla presenza di ascite, edemi sottocutanei, in particolare localizzati agli arti, alle porzioni ventrali del collo, del torace e dell'addome, meno comunemente i fluidi si possono accumulare a livello di pleure o pericardio e quindi, anche se raramente, l'animale può sviluppare dispnea e tamponamento cardiaco.

Il liquido è di solito un trasudato puro con un quantitativo di proteine < 2.5 g/dL e una conta cellulare minore di 1500 cellule/ μ L (Klosterman et al, 2011).

Possono essere presenti segni clinici riferibili ad insufficienza renale, come perdita di peso, disidratazione, vomito, anoressia, oppure dispnea e debolezza a causa di tromboembolismo polmonare.

Dal momento che la sindrome nefrosica è spesso secondaria ad altre patologie i sintomi principali possono essere legati a queste ultime (Relford e Lees, 1996).

La diagnosi è spesso rivolta all'identificazione di una causa sottostante e all'effettuazione di una biopsia renale, ma non ci sono linee guida riguardo al protocollo diagnostico da seguire nei pazienti umani con questa sindrome (Kodner, 2009).

Una valutazione iniziale richiede l'anamnesi, l'esame clinico e l'effettuazione di un profilo ematobiochimico. L'ecografia renale può essere utile nell'identificare trombosi venosa renale se è presente dolore al fianco, ematuria o insufficienza renale acuta (Kodner, 2009) (Tabella 4).

La biopsia renale, tranne che nei pazienti diabetici, è raccomandata in Medicina Umana per stabilire il tipo istologico di glomerulopatia, instaurare una terapia appropriata e formulare una prognosi. Non ci sono delle linee guida chiare su quando una biopsia è indicata e se è necessario che tutte le persone con sindrome nefrosica siano sottoposte a tale procedura (de Seigneux e Martin, 2009; Kodner, 2009).

<i>Diagnostic studies</i>	<i>Disorder suggested</i>
Baseline	
Patient history	Identify medication or toxin exposure; risk factors for HIV or viral hepatitis; and symptoms suggesting other causes of edema Obtain history of diabetes, systemic lupus erythematosus, or other systemic illness
Urine dipstick	Confirm proteinuria
Random urine protein/creatinine ratio	Quantify degree of proteinuria (ratio greater than 3 to 3.5)
Serum creatinine	Rule out acute renal failure, assess glomerular filtration rate
Serum albumin	Assess degree of hypoalbuminemia
Lipid panel	Assess degree of hyperlipidemia
Additional studies suggested by patient factors	
HIV screening test	Identify HIV
Hepatitis serology panel	Identify hepatitis B or C
Serum or urine protein electrophoresis	Suggests amyloidosis or multiple myeloma
Rapid plasma reagin	Identify syphilis
Antinuclear antibodies or complement (C3 and C4) levels	Identify systemic lupus erythematosus; complement levels may also be reduced in membranoproliferative disease

Tabella 4. Esempio di protocollo diagnostico in pazienti umani con sindrome nefrosica. (Kodner, 2009)

Proteinuria

In Medicina Umana una proteinuria nefrosica è definita come un rapporto proteine urinarie-creatinina urinaria (UPC) maggiore di 3.0-3.5 e valori maggiori di questi sono associati ad un aumentato rischio di formazione di edemi (Appel, 2006; Hull e Goldsmith, 2008).

In Medicina Veterinaria, ad oggi, non è stato possibile stabilire un “range nefrosico” di proteinuria, in quanto sia cani con glomerulopatie non nefrosiche, sia quelli con sindrome nefrosica presentano valori elevati di UPC.

L’UPC è stato correlato con la sopravvivenza, la comparsa di crisi uremica e l’ipertensione.

Cani con $UPC \geq 1.0$ sono 3 volte più a rischio di quelli con $UPC \leq 1.0$ di sviluppare crisi uremica e di andare incontro a morte. Il rischio di un outcome infausto aumenta di 1,5 volte per aumenti di un’unità di UPC, (Jacob et al., 2005), ed è stata riscontrata una debole, ma significativa correlazione tra aumenti della proteinuria e l’ipertensione (Wehner et al., 2008).

Nello studio di Klosterman e coll. (2011) 67/78 cani con sindrome nefrosica presentavano una mediana di UPC di 15.2 (1.7-38.4) con valori maggiori di 3.5 nel 95% dei casi (64/67), valore quest’ultimo che è stato riscontrato nel 76% (102/135) dei cani senza sindrome nefrosica (range di 1.0-27.0), sempre nello stesso studio.

Risultati simili sono stati documentati anche in passato in cani con amiloidosi che presentavano valori di UPC significativamente più alti che in quelli con glomerulonefrite (UPC 20.4 ± 12.2 vs 11.1 ± 10.2) (Cook e Cowgill, 1996).

Valori di UPC di 8.7, 11.5, 24.7 sono stati diagnosticati in cani con sindrome nefrosica (Vasilopoulos et al., 2005; Clements et al., 1995; Ritt et al., 1997).

Peso Specifico

Il peso specifico (urine specific gravity – USG), nonostante sia presente iperazotemia, può presentarsi adeguato a causa di un alterato equilibrio glomerulotubulare caratterizzato da una mantenuta capacità di concentrare le urine da parte del tubulo, a dispetto di un danno glomerulare avanzato che riduce la capacità di filtrazione. Questo reperto è stato riscontrato in diversi case report di cani con sindrome nefrosica che presentavano valori compresi tra 1009 e 1052 (Green e Kabel, 1982; Grauer et al., 1992; Clements et al., 1995; Ritt et al., 1997; Vasilopoulos et al., 2005)

In un recente studio condotto da Klosterman e coll. (2011) l’USG rinvenuto era maggiore di 1.012 nell’80% di cani con sindrome nefrosica (1.002-1.074), analogamente a quanto

riscontrato in altri lavori precedenti come quello condotto da Cook e Cowgill (1996) in cui il peso specifico era di 1.022 ± 0.011 al momento della presentazione in clinica, con il 16,8% dei cani isostenurici, e quello di Center e coll. (1987), in cui l'USG era ≥ 1.035 nel 37% di cani.

Sedimento

Il sedimento urinario può presentare cilindri granulosi (21,2%, 51%) e ialini (8,8%) (Cook e Cowgill, 1996; Center et al., 1987). Possono essere presenti anche cilindri cellulari, cerei e contenenti lipidi, non è stata riscontrata associazione tra i tipi di cilindri e le alterazioni biochimiche o la gravità della proteinuria (Center et al., 1987).

A nostra conoscenza nessuno studio ha valutato l'albuminuria nei pazienti con sindrome nefrosica.

Ipoalbuminemia

La concentrazione di albumine nei pazienti umani è generalmente minore di 2.5 g/dl (Bagga e Mantan, 2005; Appel, 2006; Hull e Goldsmith, 2008; Kodner, 2009).

Nel più grande studio pubblicato in Medicina Veterinaria in cani con sindrome nefrosica la concentrazione mediana di albumina è stata di 1.6 g/dl e comunque minore di < 2.5 g/dl nel 92% dei casi (Klosterman et al., 2011).

Nello studio di Center e coll. (1987) in cani con glomerulopatie, il 67% dei pazienti si presentava ipoalbuminemico, con una proteinuria selettiva, senza differenze tra i diversi tipi istologici (glomerulonefrite membranosa, membranoproliferativa, mesangioproliferativa), con una correlazione negativa significativa tra ipoalbuminemia e UPC.

Una concentrazione di albumine < 2.5 g/dl è stato un reperto presente nel 71% dei casi (97/137) con concentrazioni di albumine significativamente più basse nei cani con amiloidosi (1.4 ± 0.7 g/dl), rispetto a quelli con glomerulonefrite (2.1 ± 0.7). Il 55% dei casi con amiloidosi era profondamente ipoalbuminemico (albumine < 1.5 g/dl) comparato con solo il 15,3% di casi con glomerulonefrite (Cook e Cowgill, 1996).

L'elevata perdita di proteine raramente è sufficiente a causare una ipoglobulinemia, ma anche l'iperglobulinemia è rara (DiBartola et al., 1980; Jaenke e Allen, 1986; Center et al., 1987; Cook e Cowgill 1996).

Iperlipidemia

In Medicina Umana il colesterolo in circa la metà dei pazienti con sindrome nefrosica è maggiore di 300 mg/dl (Kodner, 2009), similmente a quanto accade in Veterinaria in cui il 76% di cani ha mostrato un valore mediano di 353 mg/dl (Klosterman et al., 2011)

La media dei valori di colesterolo si è mostrata comparabile tra i cani non nefrosici che erano affetti da amiloidosi e da glomerulonefrite (350±91 mg/dl amiloidosi; 312±137 mg/dl GN), senza una correlazione significativa tra colesterolo e albumine in uno studio (Cook e Cowgill, 1996), mentre, in un altro (Center et al., 1987), il 76% dei soggetti presentava ipercolesterolemia (colesterolo totale \geq 240 mg/dl) e, tra questi, il 67% presentava concomitante ipoalbuminemia, anche se non sono stati studiati cani con sindrome nefrosica.

Non si sa se, come accade in Medicina Umana, anche nel cane, oltre all'aumento del colesterolo ci sia un aumento delle concentrazioni degli altri lipidi (Klosterman et al., 2011).

Accumulo extravascolare di fluidi

L'accumulo di fluidi in cani con sindrome nefrosica è ipotizzato essere una conseguenza di una grave perdita proteica, insieme ad una aumentata pressione idrostatica e ad una aumentata permeabilità vascolare, ma non si sa se nei cani si verificano alterazioni del volume plasmatico o del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), come accade in Medicina Umana (Klosterman e Pressler, 2011).

I fluidi si localizzano più frequentemente a livello di cavità peritoneale (ascite 74%), causano edemi sottocutanei, in particolare localizzati agli arti, alle porzioni ventrali del collo, del torace e dell'addome (62%), meno comunemente si accumulano a livello di pleure (21%) (Klosterman et al., 2011).

In studi passati gli edemi non sono stati un riscontro molto frequente, molti cani, pur presentando grave proteinuria, ipoalbuminemia, e ipercolesterolemia non hanno sviluppato questo sintomo. In uno studio condotto da Cook e Cowgill (1996) ascite o edemi periferici erano presenti nel 5,8% dei casi e con una frequenza più elevata in cani con amiloidosi (12,9% -4/31) che in quelli con glomerulonefrite (3,7% - 4/106).

In un altro studio (Center et al., 1987) solo 5/41 cani presentavano edema agli arti e 2/41 avevano ascite e ognuno di questi era sia ipoalbuminemico sia ipercolesterolemico.

COMPLICAZIONI

In Medicina Umana, la sindrome nefrosica aumenta il rischio di complicazioni nei pazienti che presentano malattie glomerulari, quali complicazioni tromboemboliche come la trombosi venosa profonda, l'embolismo polmonare, la trombosi della vena renale e altre complicazioni quali l'ipernatremia, l'ipertensione l'iperlipidemia, l'aterosclerosi e una più rapida progressione verso l'insufficienza renale (Orth e Ritz, 1998; Mahmoodi et al., 2008; de Seigneux e Martin, 2009).

La perdita di proteine, di nutrienti essenziali, di cofattori rende gli uomini più suscettibili ad infezioni secondarie e a carenze metaboliche (Orth e Ritz, 1998).

Il verificarsi e la frequenza di alcune di queste complicazioni non sono ancora state studiate in Medicina Veterinaria.

Fenomeni tromboembolici

I pazienti umani proteinurici sono a rischio di fenomeni tromboembolici a causa di uno stato di ipercoagulabilità dovuto a diversi fattori, in particolare l'ipovolemia, che comporta una stasi vascolare, l'aumentata aggregabilità piastrinica, la carenza di antitrombina (AT III), l'ipoalbuminemia, l'ipercolesterolemia, l'iperfibrinogenemia e l'incremento dei D-dimeri (Zaffanello et al., 2009).

In un lavoro retrospettivo, il rischio di trombosi venosa profonda (DTV) in pazienti con sindrome nefrosica si è visto essere 1,7 volte maggiore rispetto a quello in pazienti senza sindrome nefrosica con una incidenza annuale di 1,5%. La nefropatia membranosa e valori di albumine tra 2.0 e 2.5 g/dl aumentavano il rischio di DTV (Kayali et al., 2008).

In un altro studio, pazienti con sindrome nefrosica hanno mostrato un rischio di trombosi venosa (VTE) (incidenza annuale, 1,02%) e arteriosa (ATE) (incidenza annuale, 1,48%) otto volte maggiore rispetto alla popolazione generale, con questi rischi maggiori nei primi 6 mesi (Mahmoodi et al., 2008). La proteinuria e le albumine sono state correlate con la VTE ma non con l'ATE, e il solo valore predittivo di VTE è risultato essere il rapporto proteinuria/albumine (Mahmoodi et al., 2008).

In Medicina Veterinaria la Letteratura riguardante l'argomento è molto limitata e non è nota la correlazione tra SN e gravità della proteinuria, ipoalbuminemia e lo sviluppo di tromboembolismo, inoltre non ci sono molti dati riguardo alla prevalenza di eventi trombo

embolici, ma alcuni studi (Center et al., 1987; Cook e Cowgill, 1996; Slauson e Gribble, 1971) dimostrano come in più del 25,7% dei cani con glomerulopatie e nel 38,5% dei cani con amiloidosi erano presenti trombi all'esame necroscopico.

Eventi tromboembolici sono stati identificati nel 14% di cani affetti da amiloidosi (DiBartola et al., 1989).

Alcuni case report, inoltre, descrivono la formazione di trombi a livello di milza, fegato, vene mesenteriche, polmoni, arterie e vene renali e surrenaliche in cani con patologie glomerulari (Green e Kabel, 1982; Carter e Van Heerden, 1994; Clements et al., 1995; Ritt et al., 1997).

In particolare, nei cani con glomerulopatie è stata riportata una diminuita attività dell'AT III (Cook e Cowgill, 1996), un aumento dell'aggregabilità piastrinica (Green et al., 1985) e una alterazione dell'intero asse coagulativo (Abdullah, 1988; Ritt et al. 1997; Green e Kabel, 1982; Cook e Cowgill 1996).

E' stato riscontrato anche l'aumento dei fattori V, VII, VIII, X, del fibrinogeno e della proteina C, e la diminuzione dell'attivatore del plasminogeno e dei livelli di plasminogeno (Green e Kabel, 1982; Abdullah, 1988).

Il rilascio di tromboplastina tissutale dal glomerulo danneggiato potrebbe attivare la via estrinseca della coagulazione, favorendo la formazione di trombi (Abdullah, 1988).

Uno dei parametri maggiormente studiati è rappresentato dall'antitrombina, in quanto è una importante proteina anticoagulante che viene persa con le urine a causa del peso molecolare simile a quello dell'albumina, e che viene spesso citata come causa di tromboembolismo, anche se è difficile attribuire la comparsa di trombosi solamente alla sua carenza (Abdullah, 1988).

Alcuni cani con sindrome nefrosica e concomitante presenza di trombi hanno mostrato valori di attività dell'AT III inferiori al 50% (Green e Kabel, 1982; Ritt et al., 1997), valore considerato ad elevato rischio di trombosi nei pazienti canini (Green, 1988).

Nello studio condotto da Cook e Cowgill (1996) l'attività dell'AT III era $58 \pm 25\%$ in 32 animali testati, ed è stata trovata una correlazione positiva tra albumina e AT III, con AT III sempre bassa se le albumine erano meno di 1,8 g/dl. Dai dati, seppur limitati, di questo studio la bassa attività dell'AT III è un utile indicatore di tendenza alla trombosi: la stretta correlazione con l'albumina è in grado di predire il rischio di tromboembolismo in cani con concentrazioni di albumina < di 2,0 g/dl.

Valori più elevati (AT III < 80% nel 59 % dei cani con NS e nel 71% dei cani con NNGD) sono stati riscontrati nel recente lavoro di Klosterman e coll. (2011), nel quale non è stata trovata correlazione significativa tra AT III e albumina.

Iperazotemia

La sindrome nefrosica in Medicina Umana è associata ad un più rapido declino della funzionalità renale e alla comparsa di insufficienza renale, anche se questa relazione non è del tutto chiara (Hull e Goldsmith, 2008; de Seigneux e Martin, 2009).

Fattori di rischio includono l'ipovolemia, la sepsi, la presenza di trombi e un aumentato rischio di necrosi tubulare a causa di un ridotto legame con le proteine di farmaci potenzialmente nefrotossici.

In Medicina Veterinaria questa associazione non è stata determinata, sia perché mancano degli studi prospettici, sia perché spesso cani con glomerulopatie (52%, Klosterman et al., 2011; 54,7% Cook e Cowgill, 1996; 54% Center et al., 1986) o con sindrome nefrosica (68% Klosterman et al., 2011) sono già azotemici al momento della diagnosi, a testimonianza dell'elevata frequenza di iperazotemia nei cani con malattie glomerulari.

Nello studio condotto da Cook e Cowgill (1996) nei cani con amilodiosi l'iperazotemia era più frequente che in quelli con glomerulonefrite (74,2% vs 48,6%) e una percentuale maggiore di cani con amiloidosi aveva una grave iperazotemia (42,9% vs 22,4%) (creatinina > di 5 mg/dl o BUN > di 100 mg/dl).

Ipertensione

L'ipertensione nei pazienti nefrosici in Medicina Umana è attribuita all'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, alla ritenzione di sodio e alla conseguente ipernatremia e alla progressione della glomerulopatia (Orth e Ritz, 1998; de Seigneux e Martin, 2009).

I cani con sindrome nefrosica sono comunemente ipertesi, con una pressione sistolica media di 177 ± 35 mmHg, che non differisce molto (differenza non significativa) dalla pressione rilevata nei pazienti non nefrosici 167 ± 33 mmHg (Klosterman et al., 2011).

In uno studio di cani con glomerulopatie il 55,8% dei soggetti (29/52) sono risultati ipertesi (sistolica > 160 mmHg, diastolica > 95 mmHg) con una pressione sistolica di 200 ± 30 mmHg e una diastolica di 116 ± 20 mmHg. Il 61,1% di cani con glomerulonefrite e il 43,8% di cani con amiloidosi presentava ipertensione (Cook e Cowgill, 1996).

Anemia

L'associazione tra anemia e sindrome nefrosica in assenza di insufficienza renale è ancora oggi oggetto di discussione (de Seigneux e Martin, 2009).

In Medicina Veterinaria a nostra conoscenza non ci sono studi a riguardo.

Cook e Cowgill (1996), studiando le alterazioni clinicopatologiche in cani con glomerulopatie, hanno rinvenuto una percentuale del 51,1 % di soggetti che presentava una anemia non rigenerativa con una media di ematocrito (HCT) di $27 \pm 6.6\%$. Non hanno trovato nessuna correlazione tra numero di globuli rossi (RBC), la creatinina e le concentrazioni di urea.

In uno studio condotto da Center e coll. (1987) su cani con glomerulonefrite il 44% dei cani presentava un'anemia non rigenerativa, e il 46% non era iperazotemico, tuttavia, anche in questo lavoro, non è stata messa in correlazione l'anemia con la comparsa di iperazotemia e di insufficienza renale.

Mortalità e outcome

La prognosi in cani con sindrome nefrosica non è ben nota: in un recente studio condotto da Klosterman e coll. (2011), la presenza di SN in cani non iperazotemici è associata ad una sopravvivenza mediana più breve (12,5 giorni) rispetto ai cani non iperazotemici con una malattia glomerulare non nefrosica (104,5 giorni). La presenza o l'assenza di iperazotemia (creatinina > di 1.5 mg/dl) influenza la prognosi in entrambi i gruppi, ma in maniera significativa solo negli animali non iperazotemici. La sopravvivenza mediana in assenza di iperazotemia è maggiore in entrambi i gruppi, ma i cani con malattia nefrosica hanno comunque una sopravvivenza minore (51 giorni vs 605 giorni, cani non azotemici).

Da questi dati appare come il rallentamento della progressione della malattia glomerulare e il ritardo della comparsa di iperazotemia, siano eventi critici al fine di migliorare la sopravvivenza nei cani con glomerulopatie, abbiano essi una sindrome nefrosica o no.

Analogamente, il riscontro di iperazotemia ha comportato tempi di sopravvivenza più brevi (≤ 3 mesi) in uno studio di Center e coll. (1987) in cui il 93% di cani con glomerulopatie proteino-disperdenti sopravviveva da un minimo di 15 giorni fino a 60 mesi dal momento della diagnosi.

Diversamente si è verificato in un lavoro di Cook e Cowgill (1996) in cui non è stata trovata nessuna correlazione tra il tempo di sopravvivenza (sopravvivenza mediana 28 giorni) e i

parametri biochimici alla presentazione, la diagnosi o la terapia. In questo lavoro, le cause principali di morte sono state insufficienza renale (72,2%) e tromboembolismo (22,2%) (Cook e Cowgill, 1996).

CAPITOLO III PARTE SPERIMENTALE

OBIETTIVI

L'obiettivo del presente studio è stato quello di descrivere, valutare e caratterizzare le alterazioni cliniche e clinicopatologiche che si verificano nei pazienti proteinurici attraverso un'indagine retrospettiva delle cartelle cliniche di cani condotti a visita presso l'Ospedale Didattico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Alma Mater Studiorum - dell'Università di Bologna. I dati sono stati riportati e analizzati tramite statistica descrittiva e in particolare sono stati considerati il segnalamento e i parametri che si alterano in corso di nefropatie proteino-disperdenti per analizzarne la frequenza rilevata nella nostra realtà clinica e confrontarla con i dati riportati in Letteratura.

Un ulteriore obiettivo è stato quello di analizzare come vengono influenzati i parametri clinicopatologici che caratterizzano la sindrome nefrosica all'aggravarsi della proteinuria e come il peso specifico urinario, il sedimento urinario e l'ipoalbuminemia possano incidere sulla proteinuria e su altre variabili.

MATERIALI E METODI

Criteri di inclusione e selezione dei casi

Lo studio clinico proposto è stato condotto in modo retrospettivo su una coorte di pazienti condotti a visita presso il Dipartimento Clinico Veterinario poi Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna nel periodo compreso tra Gennaio 2002 e Settembre 2011.

I casi sono stati selezionati tramite il software gestionale in uso (Fenice 3.42) considerando come criterio di inclusione pazienti aventi un rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC) maggiore di 2 ed almeno un'analisi urinaria.

Ulteriori dati raccolti sui soggetti selezionati sono stati estratti attraverso il software e l'analisi delle cartelle cliniche e includevano: la razza, il sesso, l'età, i risultati dell'esame emocromocitometrico, dell'esame biochimico, del profilo coagulativo, della misurazione di proteine di fase acuta (CRP) e i dati clinici, dove presenti, quali la pressione sistolica e diastolica indiretta, la presenza di edemi o di fenomeni trombotici.

Le altre alterazioni clinico-patologiche sono state definite utilizzando gli intervalli di riferimento forniti dal laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie. Tali risultati sono frutto di validazione interna e sono coerenti con quelli presenti in Letteratura.

Le variabili clinico-patologiche considerate sono state maggiori rispetto ai casi clinici in quanto di uno stesso paziente sono stati considerati in alcuni casi due o più campioni tra loro distanti nel tempo.

Successivamente i pazienti sono stati suddivisi in quattro gruppi per effettuare delle comparazioni e valutare eventuali differenze statisticamente significative tra gruppi, al fine di inquadrare con maggiore precisione lo stato clinico del paziente, evidenziando quali sono le principali alterazioni clinicopatologiche che si verificano a seguito di determinati valori *cut-off* clinico-patologici.

- **I° Gruppo:** suddivisione in base ai valori di UPC (<3.5 o ≥ 3.5). Il valore di 3.5 è stato scelto in quanto rappresenta il limite inferiore del range di proteinuria nefrosica in Medicina Umana. Sono state effettuate comparazioni per i seguenti parametri: creatinina, urea, albumina sierica, colesterolo, proteina C-reattiva, sodio, cloro, potassio, calcio, fosforo, TIBC, ferro totale, ematocrito, età e pressione sistolica;
- **II° Gruppo:** suddivisione in base ai valori di albumina sierica (< 2.5 g/dl o ≥ 2.5 g/dl). Il valore di 2.5 g/dl è stato scelto in quanto nei pazienti umani con sindrome nefrosica la concentrazione di albumine si presenta generalmente minore di 2.5 g/dl e questo *cut-off* è stato utilizzato come limite inferiore in diversi studi su pazienti con glomerulopatie in Medicina Veterinaria. La comparazione è stata effettuata con creatinina, urea, proteine totali, ematocrito, colesterolo, ferro totale, TIBC, piastrine ed età;
- **III° Gruppo:** suddivisione in base al peso specifico (<1030 o ≥ 1030). Il valore scelto rappresenta la capacità del rene di concentrare adeguatamente le urine, al di sotto di 1030 si ha la perdita di funzionalità di due terzi o più dei nefroni funzionanti. La

comparazione è stata effettuata per i seguenti parametri: creatinina, urea, UPC e rapporto albumine urinarie/creatinina urinaria (UAC);

- **IV° Gruppo:** suddivisione in base al sedimento (“attivo” o “spento”). Il sedimento è stato considerato attivo quando all’esame chimico-fisico delle urine erano presenti contemporaneamente almeno “1+” di emazie, “1+” di leucociti, “1+” di batteri. La comparazione è stata effettuata per i seguenti parametri: creatinina, urea, UPC e UAC.

Metodica di prelievo, processazione e stoccaggio dei campioni

I prelievi di sangue sono stati eseguiti attraverso un sistema a vuoto Sarstedt e quando possibile sono state raccolte:

- un’aliquota di sangue in K₃-EDTA;
- una o più aliquote di sangue senza anticoagulante, con gel separatore, per ottenere il siero;
- un’aliquota di sangue con Na-citrato.

I prelievi di urina sono stati eseguiti mediante cistocentesi, minzione spontanea o cateterismo vescicale.

Il sangue raccolto in K₃-EDTA con provette S-Monovette® Sarstedt è stato processato entro un’ora dal prelievo per l’esecuzione dell’esame emocromocitometrico.

Tale esame è stato ottenuto utilizzando i contaglobuli automatici Hematology Self Cell Counter modello Baker System 9120+ AX, Abbott CELLDYN 3500 R e Siemens ADVIA® 2120. Prima delle determinazioni analitiche, i campioni in K₃-EDTA sono stati sottoposti ad agitazione tramite Vortex (Reamix 2789).

I parametri valutati sono stati: eritrociti (RBC/mm³), valore ematocrito, (Hct%), emoglobina totale (Hgb g%), volume corpuscolare medio (MCV fl), contenuto medio di emoglobina (MCH pg), concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC g%), ampiezza della distribuzione eritrocitaria (RDW), leucociti totali (WBC/mm³), piastrine (PLT/mm³), volume piastrinico medio (MPV), conta reticolocitaria assoluta e percentuale, indice di produzione reticolocitaria. Gli strisci di sangue eseguiti a fresco e colorati con May-GrünWald-Giemsa (Merk®) o MGG-Quick Stain (Bio-Optica) sono stati esaminati al microscopio al fine di valutare la morfologia eritrocitaria, la morfologia e la formula differenziale leucocitaria, la stima e la morfologia piastrinica nonché l’eventuale presenza di aggregati.

Il sangue raccolto in provette da siero (S-Monovette® Sarstedt con “gel clotting activator”) è stato immediatamente posto in termoblocco (THERMOBLOC, FALC) a 37°C e lasciato per 30 minuti. La separazione del siero è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a $3000 \times g$.

Il siero è stato utilizzato per l'esecuzione di un profilo biochimico comprendente ALT, AST, fosfatasi alcalina, creatinina, urea, fosforo, glucosio, bilirubina totale, acidi biliari, GGT, proteine totali, albumina, rapporto albumina/globuline, calcio, sodio, potassio, cloro, Ferro totale e per la determinazione delle Proteine di Fase Acuta (CRP, TIBC). Tutte le determinazioni sono il risultato di metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400.

Il sangue in Na-citrato raccolto con S-Monovette® Sarstedt (provette allestite con Na-citrato in soluzione 0,11 mol/l, rapporto Na-citrato/sangue di 1 + 9) è stato processato in laboratorio entro 2 ore dal prelievo. La separazione del plasma citrato è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a $3000 \times g$. Il surnatante è stato successivamente prelevato con pipette monouso, evitando lo strato eritrocitario sottostante, al fine di ottenere un campione di plasma povero di piastrine. Il plasma è stato utilizzato per la determinazione dell'Antitrombina III e dei D-Dimeri plasmatici attraverso metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400 precedentemente validate per il cane.

Il campione di urina è stato sottoposto alla valutazione rifrattometrica per il peso specifico urinario e all'esecuzione di un esame chimico-fisico mediante il lettore automatico DIRUI H-500 Urine Analyzer e il Dipstick DIRUI H10. Infine, ciascun campione è stato sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a $1000 \times g$. Il surnatante è stato successivamente separato dal sedimento; quest'ultimo è stato valutato a fresco al microscopio. Il sedimento è stato definito “attivo” quando era rilevabile la presenza di leucociti, emazie e batteri e confermato attraverso valutazione citologica di un preparato citocentrifugato.

In accordo con le indicazioni riportate per le misurazioni specifiche e data la stabilità di siero, plasma e surnatante urinario, ove possibile, queste matrici sono state aliquotate e stoccate a -20°C o -80°C fino all'esecuzione delle ulteriori determinazioni richieste per lo studio.

Tutte le misurazioni sono state eseguite presso il laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (SEPA VET) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.

Determinazioni specialistiche oggetto dello studio

La sperimentazione ha utilizzato un profilo sideremico comprendente Ferro totale, Transferrina espressa come *Total Iron Binding Capacity* (TIBC) e percentuale di saturazione della Transferrina (Sat%).

È stata misurata la Proteina C-Reattiva (CRP) quale *marker* sensibile e specifico di infiammazione in quanto Proteina di Fase Acuta (APP) maggiore nella specie canina.

Con le matrici di surnatante urinario invece, si è proceduto alla misurazione della Creatinina Urinaria, delle Proteine Totali Urinarie e dell'Albumina Urinaria. Sono stati successivamente calcolati i rapporti: Proteine Urinarie/Creatinina Urinaria (UPC) e Albumina Urinaria/Creatinina Urinaria (UAC).

Di seguito vengono riportate le principali metodiche analitiche dei parametri oggetto dello studio comprendendo anche Creatinina e Albumina sieriche.

Ferro totale

Il ferro totale del campione di siero è stato misurato attraverso la metodica colorimetrica al Ferene di Sentinel CH (Sentinel REF KAL002-Iron Ferene).

Principio del test

Il Ferro in presenza di un sistema tampone a pH 4,8 viene liberato dalla transferrina e ridotto quantitativamente allo stato ferroso. Il Fe⁺⁺ così ottenuto forma con il complessante specifico Ferene S un composto colorato stabile la cui intensità di colore è proporzionale alla quantità di ferro presente nel campione in esame. L'interferenza dovuta al rame è eliminata utilizzando condizioni particolari di reazione e un mascherante specifico.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagenti 1	Tampone acetato 1,4 mol/l pH 4,8; Guanidina idrocloruro >4,5 mol/l; Mascherante specifico per Cu	Conservazione 2-6°C
Reagente 2	Ferene S >20 mmol/l; Acido ascorbico >0,5 mol/l	
Calibratore	Calibratore specifico contenuto nel kit OE66300	Conservazione 2-8°C fino a 7 gg 15- 25° C a 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Multicontrollo Cat.-N° ODC003, ODC004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15- 25°C a 2 gg

Tab.1 Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione del Ferro

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo risulta lineare tra concentrazioni di ferro comprese tra 1 e 1000 µg/dl. La sensibilità analitica ovvero la concentrazione minima rilevabile diversa da zero è di 0,5 µg/dl.

Interferenze

Nessuna interferenza da ittero (bilirubina coniugata e non coniugata < 15 mg/dl), emolisi (emoglobina < 0,5 g/dl) e lipemia (trigliceridi < 1000 mg/dl).

Unsaturated Iron Binding Capacity (UIBC)

La UIBC è stata valutata mediante un test colorimetrico di tipo quantitativo (Olympus System Reagent – UIBC, OSR 61205).

Principio del test

La reazione alla base del test è che il Ferro del reagente R1 reagisca con il Nitroso-PSAP del reagente R2 per formare un complesso di colore verde. All'aggiunta del campione, una parte o tutti gli ioni Ferro del reagente R1, invece, si legano specificamente con la transferrina e pertanto non sono disponibili per la reazione colorata con il Nitroso-PSAP. La differenza delle

assorbanze misurate con o senza l'aggiunta di campione rappresenta il valore di UIBC del campione in esame.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

UIBC Reagente	Soluz. Tampone Tris 180 mmol/l Ferro 6,9 µmol/l Nitroso-PSAP 176 µmol/l Cloruro di idrossilammonio 36 mmol/l Tiourea 175 mmol/l	Conservazione 2-6°C
Calibratore	Multicalibratore OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Cat.N°.66300	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Multicontrollo Cat.-N° ODC003, ODC004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tab.2. Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'UIBC

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo risulta lineare tra concentrazioni di ferro comprese tra 55 e 450 µg/dl. La sensibilità analitica ovvero la concentrazione minima rilevabile diversa da zero è di 1,46 µmol/l.

Interferenze

Bilirubina: interferenza inferiore al 10% fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 5 g/l portano ad un'interferenza inferiore al 10%.

Lipidi: concentrazioni di lipidi (Intralipid®) aggiunti di 1000 mg/dl portano a una interferenza inferiore al 10%.

Transferrina

La transferrina sierica è stata misurata come *Total Iron Binding Capacity* (TIBC). La TIBC è calcolata sommando il Ferro totale alla UIBC:

$$\text{Ferro Totale} + \text{UIBC} = \text{TIBC}.$$

Saturazione percentuale della Transferrina (Sat%)

La saturazione percentuale della transferrina rappresenta la quota di transferrina che lega ferro. E' noto infatti che solo una parte del pool di transferrina circolante trasporta il ferro mentre la restante parte circola non saturata.

La Sat% è stata calcolata come segue:

$$\text{Fe} \times 100/\text{TIBC} = \text{Sat\%}$$

CRP

La concentrazione della CRP è stata valutata mediante una metodica immunoturbidimetrica (Olympus System Reagent C-REACTIVE PROTEIN OSR 6147), in uso in medicina umana e validata nel nostro laboratorio per il cane.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Soluzione tampone Tris (Idrossimetil) aminometano (pH 7,5) 80 mmol/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Sodio cloruro 125 mmol/l Polietilenglicole 6000 1,5 % w/v Anticorpo anti-CRP umana di capra Conservante (sodio azide)	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Multicalibratore	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	
Controllo	Controlli allestiti presso il nostro laboratorio	

Tab.3. Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la CRP

Principio del metodo

Il campione di siero viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione anti-siero R2. La CRP reagisce e forma aggregati insolubili con il siero anti-CRP, l'assorbanza di tali aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 0,01-9 mg/dl.

Interferenze

Bilirubina: nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano a una interferenza significativa del 10%.

Lipidi: concentrazioni di lipidi (Intralipid[®]) aggiunti di 1000 mg/dl portano a una interferenza significativa del 20%.

Albumina

L'albumina è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Albumin, OSR 6102). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo al verde di bromo-cresolo”.

Principio del test

Quando il verde di bromo cresolo reagisce con l'albumina, si forma un complesso colorato. L'assorbanza del complesso albumina-verde di bromo cresolo (di colore verde) viene misurata bicromaticamente (600-800nm) ed è proporzionale alla concentrazione di Albumina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Soluzione tampone succinato (pH 4,2) 100 mmol/l	Conservazione: 2-25° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Reagente R2	Verde di bromocresolo 0,2mmol/l Conservante	Conservazione: 2-25° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Cat.N°.66300	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Cat.-N° ODC0003, ODC0004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tab.4 Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'Albumina

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1,5 e 6,0 g/dl.

Interferenze

Bilirubina: interferenze inferiori al 10% fino a 40mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: interferenze inferiori al 10% fino a 4,5 g/l di emoglobina aggiunta.

Lipemia: interferenze inferiori al 10% fino a 8000 mg/dl di lipidi (Intralipid®) aggiunti.

Proteine totali urinarie (uTP)

Le proteine totali urinarie sono state misurate con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Urinary/CSF protein, OSR 6170). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo al rosso di pirogallolo”.

Principio del test

Il rosso di pirogallolo si combina con il molibdato per formare un complesso rosso con un'assorbanza massima a 470nm. Il test è basato sulla variazione nell'assorbimento che si verifica quando il complesso rosso di pirogallolo-molibdato lega gli aminogruppi basici delle

molecole proteiche dando origine a un complesso blu-porpora con un'assorbanza massima a 600nm. L'assorbanza di questo complesso è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Rosso di pirogallolo 47 µmol/l Molibdato di Na 320 µmol/l Acido succinico 50 mmol/l Benzoato di Na 3,5 mmol/l Ossalato di Na 1,0 mmol/l Metanolo 0,8% w/v	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Sieroalbumina umana 0,5 g/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controllo Sentinel diagnostics Dropper Level 1 e 2	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni

Tab.5 Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'uTP

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1 e 200 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile è di 0,7 mg/dl.

Interferenze

Interferenze inferiori al 10% per:

bilirubina 0,3mmol/l

glucosio 277mmol/l

acido urico 18 mmol/l

Rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC)

L'UPC è stato calcolato attraverso la formula seguente:

$$uPT(mg/dl)/uCrea(mg/dl) = UPC.$$

uAlb

L'albumina urinaria è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Microalbumin, OSR 6167). Tale metodica di tipo immunoturbidimetrico è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e nel nostro laboratorio. Il metodo è stato validato nel cane come riportato in letteratura (Gentilini et al., 2005)

Principio del test

Quando il campione viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, l'albumina reagisce in modo specifico con anticorpi anti albumina umana dando origine ad un composto di aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1 e R2	Soluz. Tampone Tris (pH 7,6) 71 mmol/l Anticorpi di capra anti albumina umana Conservante	Conservazione: 2-8° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni a 2-8°C
Calibratore	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	
Controllo	Controllo allestito presso il nostro laboratorio	

Tab.6 Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione dell'Albumina urinaria.

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1 e 30 mg/dl e ha una tolleranza al fenomeno prozona di 600 mg/dl.2

Interferenze

Glucosio: interferenza <5% fino a 3000mg/dl di glucosio aggiunto;

Creatinina: interferenza <5% fino a 300 mg/dl di creatinina aggiunta.

Rapporto creatinina urinaria/albumina urinaria (UAC)

L'UAC è stata calcolata attraverso la formula seguente:

$$uAlb(mg/dl)/uCrea(mg/dl) = UAC.$$

Creatinina

La creatinina (sierica e urinaria) è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Creatinine, OSR 6178). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo di Jaffé”.

Principio del test

La Creatinina forma un composto giallo-arancio con acido picrico in un mezzo alcalino. La variazione nell'assorbanza a 520-800 nm è proporzionale alla concentrazione di creatinina nel campione.

Creatinina + acido picrico = complesso di picrato e creatinina.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione della creatinina

Reagente R1 e R2	Iodossido di sodio 120 mmol/l Acido picrico 2,9 mmol/l Conservante	Stabili tra 2 e 8°C a confezione integra fino a data di scadenza; aperti per 14 gg
Calibratore	Olympus System Calibrator Cat. n° 66300	Stabile tra 2 e 8°C fino a 7 gg; tra 15 e 25°C per 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Cat. n° ODC0003 e ODC0004	Stabili tra 2 e 8°C fino a 7 gg; tra 15 e 25°C per 2 gg

Tab.7.Reagenti, controllo qualità e calibrazione della creatinina

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni di creatinina comprese tra 0,06 e 25 mg/dl. Il metodo applicato sulle urine è lineare tra 1 e 400 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile usando le impostazioni per il siero è di 0,027 mg/dl.

Interferenze

Ittero: interferenze inferiori al 10% fino a 40mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: interferenze inferiori al 3% fino a 5 g/l di emoglobina aggiunta.

Lipemia: interferenze inferiori al 10% fino a 600 mg/dl di lipidi (Intralipid[®]) aggiunti.

Proteine: interferenza inferiore al 6% tra 3 e 10 mg/dl di proteine aggiunte.

Fibrinogeno

Per la determinazione del Fibrinogeno plasmatico questa sperimentazione si è avvalsa di una metodica di tipo turbidimetrico (*FIBRINOGENO TURBIDIMETRICO*, MeDia diagnostics). La metodica è stata installata sull'analizzatore automatico *OLYMPUS AU400*.

Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazione:

Fibrinogeno Reagente 1	Solfato d'ammonio 0,42 mmol/l k ₃ EDTA 39,6 mmol/l Guanidina HCl 26,2 mmol/l PH 4,9	Conservazione: 2-6°C
Fibrinogeno Reagente 2	Solfato d'ammonio 1,57 mmol/l k ₃ EDTA 39,6 mmol/l Guanidina HCl 26,2 mmol/l PH 4,9	Conservazione: 2-6°C
Fibrinogeno Standard	Fibrinogeno umano liof. 2 g/l	Conservazione 2-6°C Stabilità: 7gg
Fibrinogeno Diluente	Citrato 15 µmol/l Eparina 800 U/l A. AminoCaproico 0,1 mmol/l Albumina bovina 40 g/l Tampone fosfato pH 7,4	Conservazione: 2-6°C Stabilità: 7gg
Fibrinogeno Controllo, livello basso	Fibrinogeno umano liof. 1,1 g/l	Conservazione: 2-6°C Stabilità: 7gg

Tab.8. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per la determinazione del Fibrinogeno.

Reagenti e Controllo di Qualità:

Reagente R1 Reattivo Trombina	Tampone TRIS/HCl 100 mmol/l Eparina (suina) 2 U/ml Aprotinina(bov.) 6,5 U/ml NaCl 270 mmol/l Trombina(bov.) 0,38 U/ml	Conservazione:2-8°C Stabilità:28 gg refrigerato sull'analizzatore
Reagente R2 Reattivo Starter (substrato cromogeno)	MeOCO-gli-pro-arg- pNA•AcOH 1,8 mmol/l	Conservazione:2-8°C Stabilità:28 gg refrigerato sull'analizzatore
PreciChrom I/II (controllo basso, controllo alto)	Plasma citrato umano liofilizzato a concentrazione nota di AT III (basso 41%, alto 84%)	Stabilità (ricostituito): <ul style="list-style-type: none"> • 8 ore a 25°C • 5 gg a +4°C • 28 gg a -20°C

Tab.9. Reagenti e Controlli di Qualità per la determinazione dell'AT III.

Calibrazione (a 2 punti):

Calibratore S1 (bianco)	NaCl 0,9%	
Calibratore S2: Precimat Chromogen	Plasma citrato umano liofilizzato a concentrazione nota di AT III (92%)	Stabilità (ricostituito): <ul style="list-style-type: none"> • 8 ore a 25°C • 5 gg a 2-8°C • 28 gg a -20°C

Tab.10 Calibrazione per la determinazione dell'AT III.

Principio del test:

ATIII + Eparina → (ATIII-Eparina)+Trombina_{in eccesso} →

→(ATIII-Eparina-Trombina)+Trombina_{residua} →

→ Trombina_{residua}+ substrato cromogeno → p-nitroanilina(cromogeno)

L'intensità della reazione colorimetrica, inversamente proporzionale all'attività antitrombinica, è valutata dall'analizzatore che la esprime in attività plasmatica percentuale.

Linearità:

La metodica è lineare tra 20 e 150% di attività di ATIII. Nel caso in cui l'attività del campione in esame superi il 150%, l'analizzatore diluisce il campione e ricalcola il valore.

Interferenze:

- Ittero (I): nessuna interferenza significativa fino ad un indice I di 29 (bilirubina coniugata e non coniugata 29 mg/dl circa);
- Emolisi (H): nessuna interferenza significativa fino ad un indice H di 1000 (emoglobina 1000 mg/dl circa);
- Lipemia (L) (Intralipid): nessuna interferenza significativa fino ad indice L di 1250 (trigliceridi 2500 mg/dl circa);
- Irudina (antitrombotico): concentrazioni di 1 mg/ml di irudina portano ad un valore di AT III falsamente elevato del 5% circa.

Altri dati:

- Temperatura 25°/30°/37°C
- Lunghezza d'onda 660 nm – 405 nm.

D-Dimeri

La determinazione dei **D-dimeri** è stata ottenuta utilizzando la nuova metodica *Tina-quant*[®] *D-Dimero* della Roche Diagnostics GmbH. Tale metodica utilizza un principio immunoturbidimetrico al lattice. L'applicazione al cane di metodiche a principio immunologico messe a punto per la medicina umana si basa sull'esistenza di una cross-reattività valutata in precedenti studi. Si deve ricordare che *in vivo*, una degradazione completa della Fibrina a dimeri D, avviene soltanto a seguito di lisoterapia (es.: t-PA mediata). Per questo motivo, gli anticorpi anti-D-dimero si legano ai cosiddetti **Oligomeri X** in cui, comunque, sono presenti i determinanti antigenici caratterizzati dalla presenza del legame covalente (Cross-linked Domain).

Reagenti e Controllo di Qualità:

Reagente R1 Tampone	Tampone TRIS/HCl 370 mmol/l NaCl 267 mmol/l PH 8,2	Conservazione : 2-8°C Stabilità : 28 gg refrigerato sull'analizzatore
Reagente R2 Sospensione di anti-D-dimero-latex	Particelle di latex rivestite di anticorpi monoclonali anti-D-dimero umano (topo) 0,15% Tampone TRIS/HCl 10 mmol/l	Conservazione : 2-8°C Stabilità : 28 gg refrigerato sull'analizzatore
D-DIMER Control I/II (controllo basso, controllo alto)	Siero umano liofilizzato a concentrazione nota di D-dimero (basso 0,88µg/dl, alto 4,19 µg/dl)	Conservazione 2-8°C Stabilità (ricostituito): <ul style="list-style-type: none"> • 1gg a 15-25°C • 14gg a 2-8°C

Tab. 11. Reagenti e Controllo di Qualità per la determinazione dei D-Dimeri.

Calibrazione (manuale, 6 diluizioni):

Zero Standard (f 1)	Matrice di siero umano	Conservazione: 2-8°C Stabilità: 1gg a 15-25°C
D-DIMER Calibrator (f 2)	Frammenti (umani) contenenti D-Dimeri in matrice di siero umano a concentrazione specifica per ogni lotto	Conservazione 2-8°C Stabilità: 1gg a 15-25°C

Tab. 12. Calibrazioni per la determinazione dei D-Dimeri.

Principio del test:

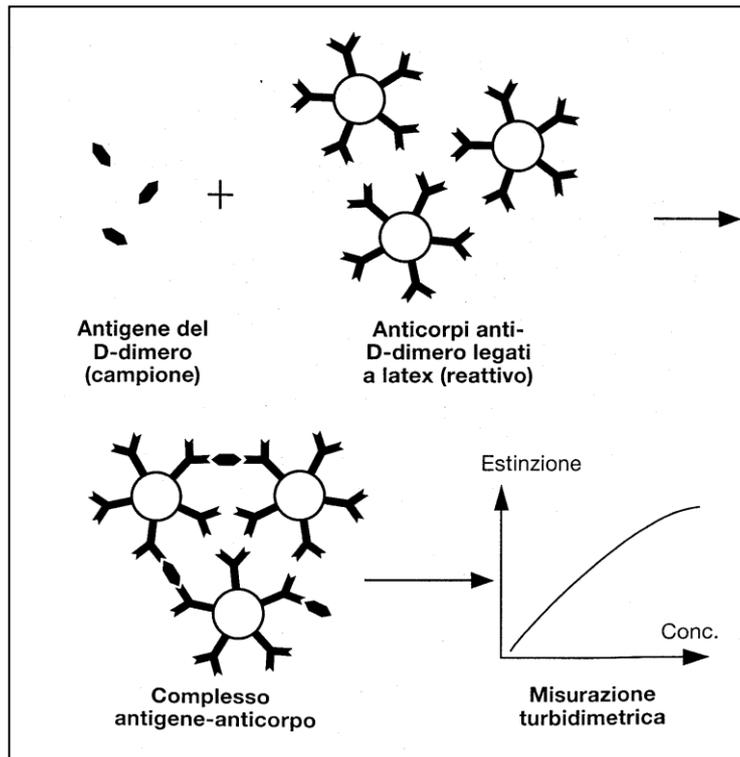


Figura 1. Principio del test immunoturbidimetrico al lattice per la determinazione dei D-Dimeri.

Linearità: la metodica è lineare tra 0,15 e 9,0 µg/ml. Concentrazioni superiori necessitano di diluizione (es.: 1+1) con NaCl 0,9%. *Interferenze:*

- Ittero (I): nessuna interferenza significativa fino ad un indice I di 20 (bilirubina coniugata e non coniugata 20 mg/dl circa);
- Emolisi (H): nessuna interferenza significativa fino ad un indice H di 500 (emoglobina 500 mg/dl circa);
- Lipemia (L) (Intralipid): nessuna interferenza significativa fino ad un indice L di 750 (trigliceridi 1500 mg/dl circa);
- nessuna interferenza da fattori reumatoidi < 100 UI/ml;
- nessuna interferenza da eparina < 1,5 UI/ml;
- nessuna interferenza da farmaci documentata (31 farmaci di frequente impiego);

- alti livelli di IgM (es.: mieloma) possono portare a risultati falsamente elevati;
- in corso di lisoterapia (t-PA mediata) elevate concentrazioni di frammenti D-D possono condurre a risultati diminuiti (effetto “prozone”).

Altri dati:

- sensibilità analitica: 0,04 µg/ml;
- temperatura: 37°C;
- lunghezza d’onda: 0-700 nm;

Analisi statistica

Per l’analisi statistica questa sperimentazione si è avvalsa del software per statistica medica MedCalc® 9.5.2.0. I dati sono stati espressi come statistica descrittiva.

I risultati dei diversi gruppi sono stati confrontati attraverso il *Kruskal-Wallis test* per dati non parametrici. Le variabili sono state correlate utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman per dati non parametrici. I risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $p < 0,05$.

I grafici “*box-and-whiskers*” inseriti rappresentano la mediana come linea centrale all’interno del box, i valori di massimo e minimo come linee estreme e suddividono la popolazione in quattro quartili.

RISULTATI

Dati clinici

Nel periodo di tempo considerato sono stati selezionati 338 pazienti. L’età mediana riscontrata è stata di 8,4 anni (range 3 mesi-17,4 anni) (Grafico 1) (Tabella 1), i cani erano per la maggior parte meticci (32,5%) (Grafico 2) e il sesso maschile è stato quello maggiormente rappresentato (58,8%) (Grafico 3).

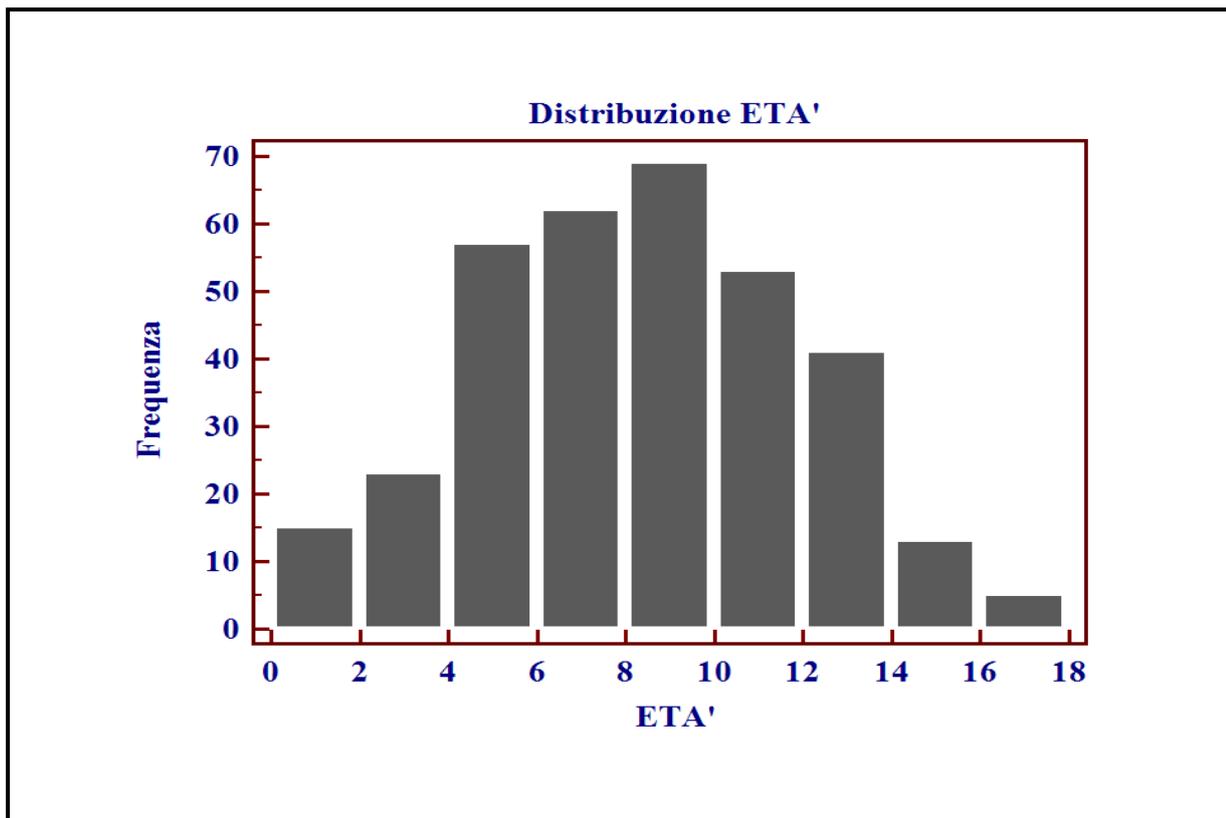


Grafico 1. Distribuzione dell'età nella popolazione di studio (n=338) espressa in anni

	N	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum
età	338	8,450	3,5248	8,426	0,256	17,350

Tabella 1. Statistiche dell'età della popolazione di studio (n=338)

Sono state identificate 57 differenti razze, le maggiormente rappresentate (razze con più di 5 individui presenti) sono state: il Setter Inglese (6,8%), il Boxer (6,5%), il Dobermann (3,5%), lo Yorkshire Terrier (3,2%), il Pastore Tedesco (2,7%), il Segugio Italiano (2,7%), il Barbone (2,4%), il Dalmata (2,4%), il Labrador (2,4%), il Jack Russell (1,8%), il Cocker Spaniel (1,5%), il Lagotto (1,5%), lo Shih-tzu (1,5%) e il Terranova (1,5%).

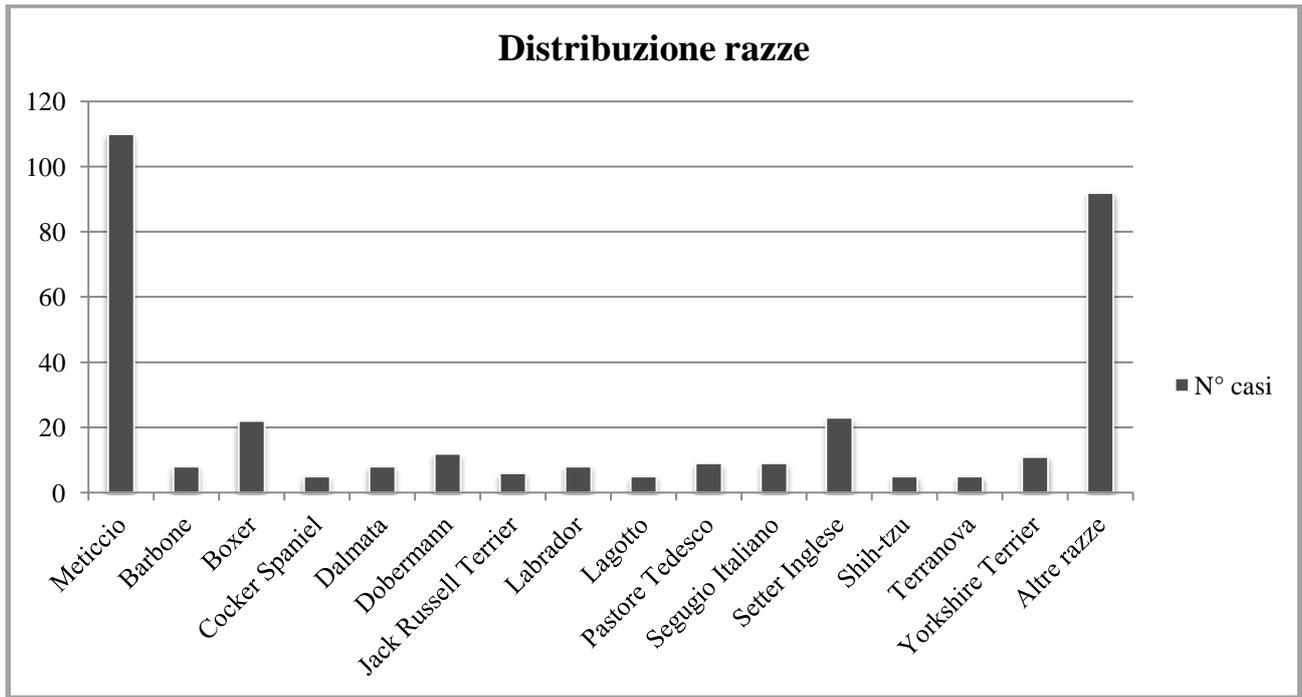


Grafico 2. Distribuzione delle razze nella popolazione di studio (n=338)

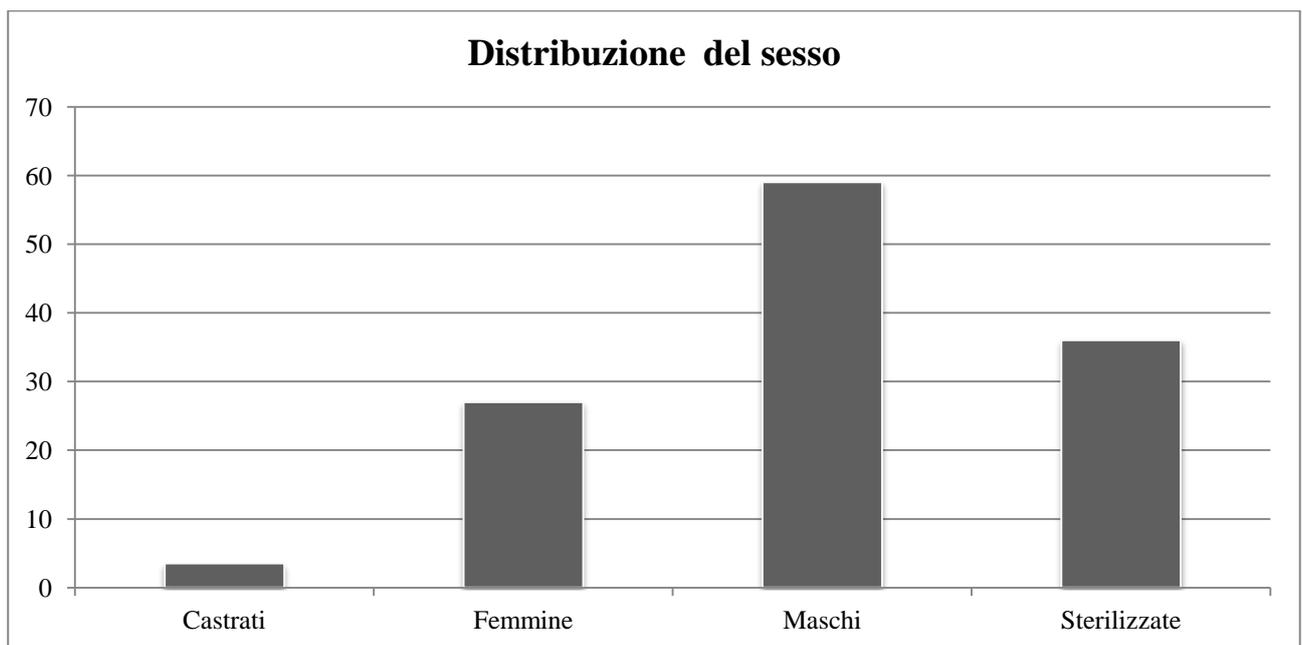


Grafico 3. Distribuzione del sesso nella popolazione di studio espresso in percentuale (n=338)

Nel 61% dei casi è stato possibile diagnosticare una patologia sistemica concomitante. I processi infettivi sono stati quelli maggiormente rappresentati con una percentuale del 27,5% (24,2% Leishmaniosi, 3,3% Leptosirosi), seguiti da processi infiammatori non infettivi (es. pancreatite) (10,6%), ipercortisolismo (9,5%), neoplasie (5,3%) e poliartrite (2,4%).

Il 4% dei pazienti presentava edemi periferici.

Le pressioni sistolica e diastolica (misurazione indiretta con metodo oscillometrico o ultrasonografico Doppler) sono state misurate rispettivamente nel 26,3% dei casi (N=89) e nel 12,4% dei casi (N=42) pazienti.

La mediana della pressione sistolica è stata 167 mmHg (min. 100- max.240 mmHg), quella della pressione diastolica 91,5 mmHg (min. 47-max. 146 mmHg). Nel Grafico 4 è rappresentata la distribuzione della pressione sistolica nella popolazione di studio.

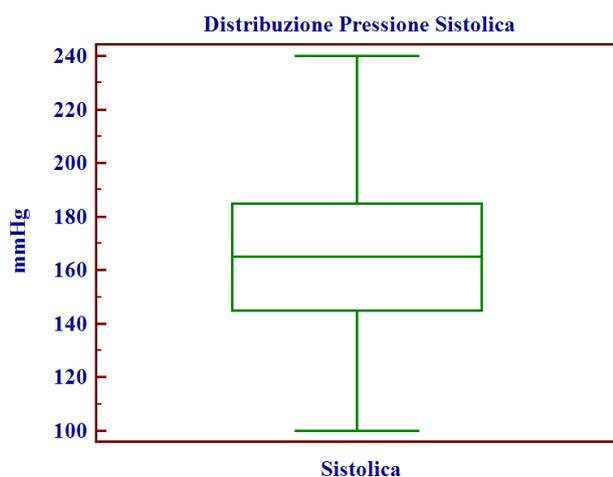


Grafico 4. Distribuzione della pressione sistolica nella popolazione di studio (n=89)

Alterazioni clinico patologiche

I risultati ottenuti sono illustrati nella Tabella 2 che mostra la distribuzione dei dati relativi ai pazienti di questo studio.

	N	Mean	SD	Median	Minimum	Maximum
Albumina	376	2,338	0,6597	2,355	0,740	4,290
Proteine Totali	376	6,530	1,7028	6,325	3,070	15,170
Creatinina	385	3,476	3,4365	1,850	0,470	22,070
Urea	372	166,847	165,0374	96,705	8,390	792,590
Colesterolo	306	327,239	134,1790	302,500	103,000	897,000
Trigliceridi	168	113,494	101,4907	78,000	28,000	771,000
Calcio	307	9,672	1,4245	9,690	4,700	13,590
Fosforo	314	8,977	6,4385	5,600	1,600	31,200
Sodio	372	145,965	5,2891	146,000	125,000	171,000
Potassio	370	4,754	0,7794	4,700	2,700	7,900
Cloro	181	108,448	9,4041	110,000	73,000	132,000
CRP	85	4,970	6,1430	3,220	0,0100	40,380
Ferro	159	96,836	59,9390	81,000	14,000	341,000
TIBC	158	276,456	104,1087	259,500	74,000	629,000
saturazione %	158	35,184	15,8584	34,500	0,000	85,000
Ematocrito	364	36,258	10,5870	36,250	12,300	69,000
Globuli Rossi	364	5335796,703	1572313,3708	5375000,000	1730000,000	12040000,000
Leucociti	364	15149,863	10051,7603	11625,000	2200,000	59100,000
Piastrine	364	327677,198	191681,4468	308500,000	1220,000	1182000,000
PT	145	7,551	5,2793	6,900	5,000	67,800
aPTT	145	15,260	14,4088	13,200	5,900	180,000
D-Dimeri	159	0,628	1,1732	0,260	0,0100	8,840
Fibrinogeno	124	5,304	1,8913	5,280	0,640	10,630
AT	160	79,513	23,9357	77,000	25,000	149,000
UPC	441	7,164	6,3247	4,900	2,000	40,100
UAC	309	3,488	3,5114	2,247	0,00468	25,391
uAlb	313	222,082	251,4170	146,440	0,140	2004,800
pH	431	6,227	0,9821	6,000	5,000	9,000
Peso Specifico	433	1020,048	11,6742	1018,000	1002,000	1064,000

Tabella 2 Alterazioni clinicopatologiche nei cani con UPC > di 2. Nella tabella sono indicati il numero dei campioni (N), la media, la mediana, la deviazione standard, i valori minimi e massimi misurati.

La nostra popolazione di pazienti proteinurici ha mostrato valori mediani di creatinina sierica, urea, fosforo, albumina urinaria, CRP e fibrinogeno al di sopra del limite superiore di riferimento, valori mediani di albumina sierica, ematocrito, antitrombina al disotto del limite inferiore di riferimento.

Le distribuzioni di alcuni parametri clinicopatologici sono riportate nei Grafici dal 5 al 13.

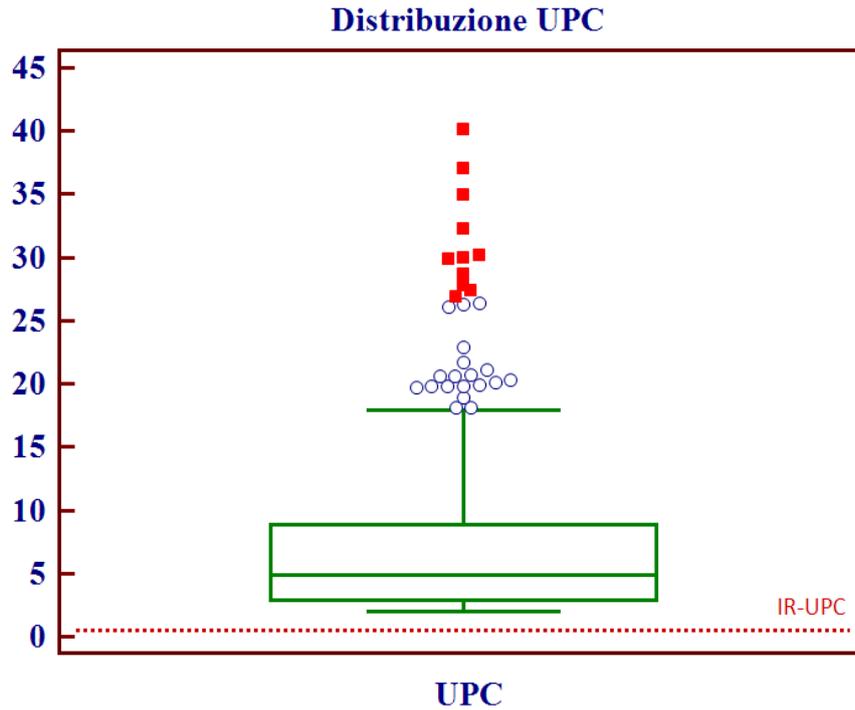


Grafico 5. Distribuzione del rapporto Proteine Urinarie:Creatinina Urinaria (UPC) nei pazienti proteinurici ($UPC > 2$). La linea dentro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell' intervallo di riferimento dell'UPC (0.0-0.4).

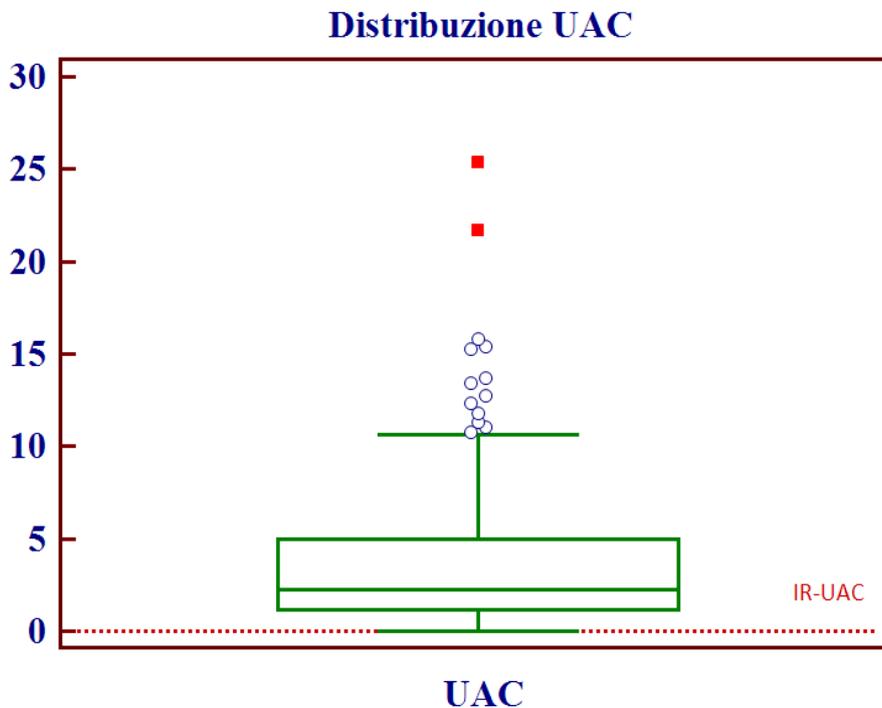


Grafico 6. Distribuzione del rapporto Albumina Urinaria:Creatinina Urinaria (UAC) nei pazienti proteinurici ($UPC > 2$). La linea dentro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell' intervallo di riferimento dell'UPC (0.0-0.03).

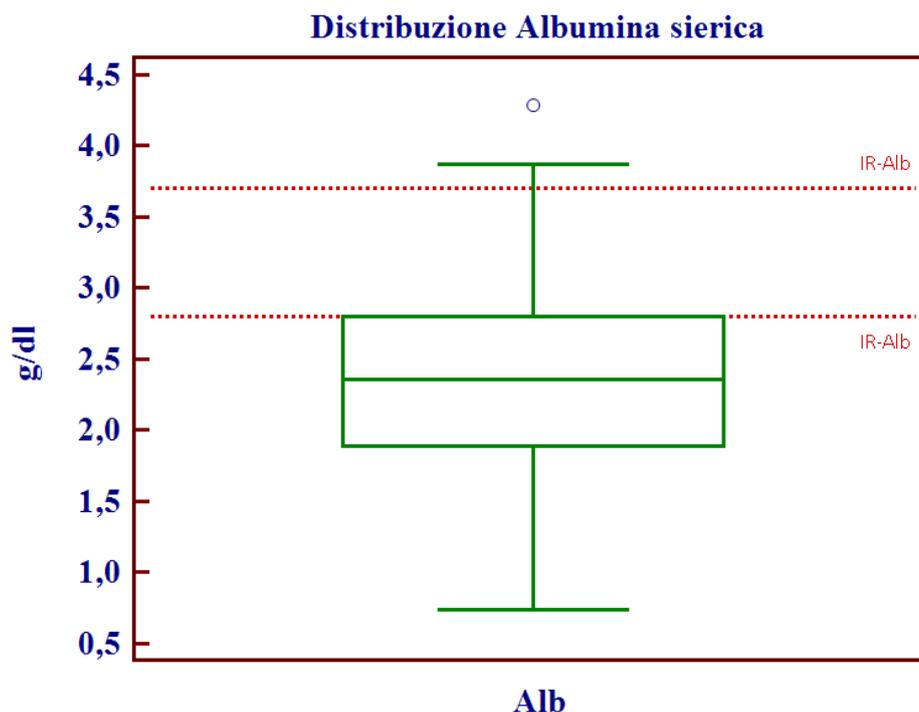


Grafico 7. Distribuzione della Albumina sierica nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea dentro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano i limiti superiore ed inferiore degli intervalli di riferimento della Albumina (2,80-3,70 g/dl).

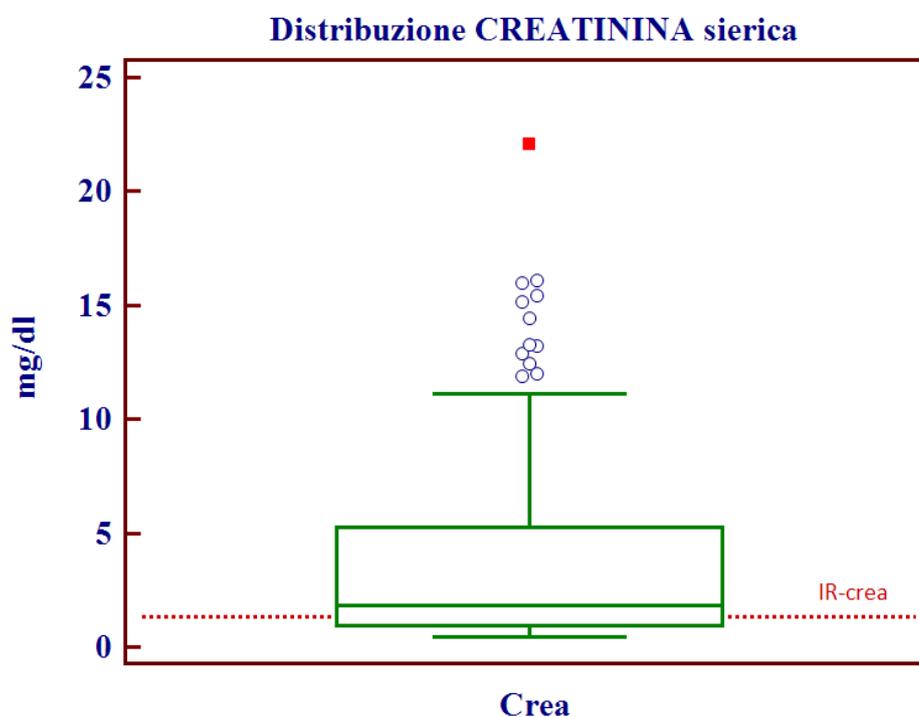


Grafico 8. Distribuzione della Creatinina sierica nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea dentro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento della Creatinina (1.35 mg/dl)

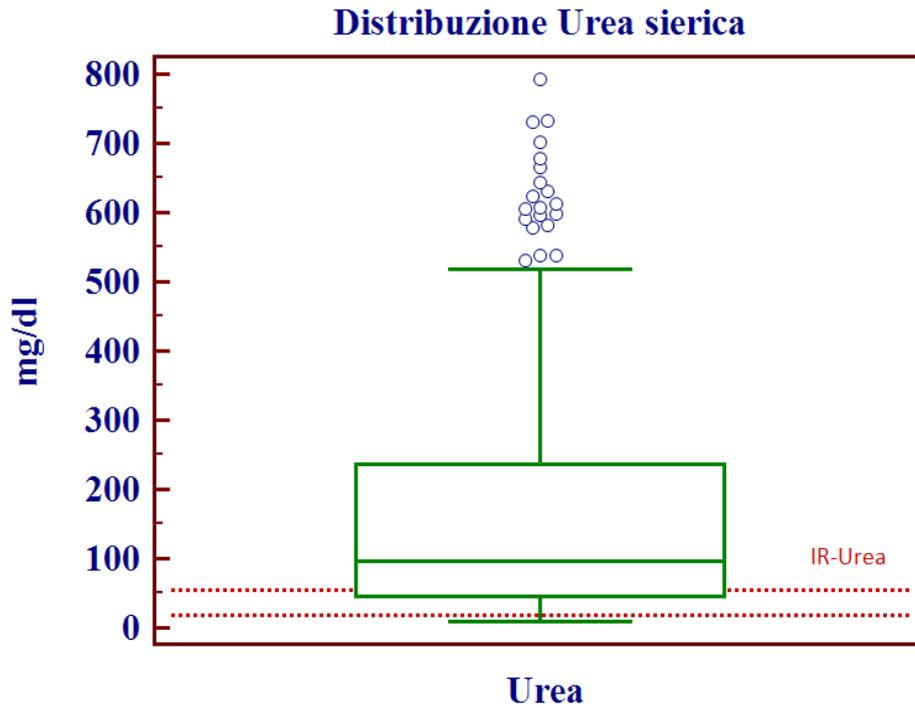


Grafico 9. Distribuzione dell'Urea nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano i limiti superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento dell'Urea (18-55 mg/dl)

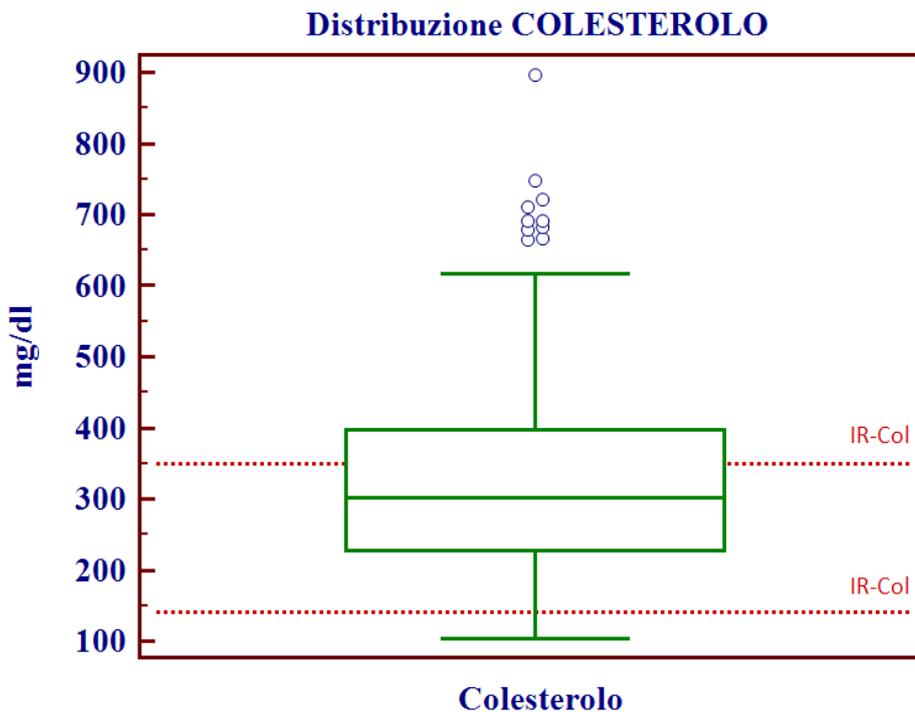


Grafico 10 Distribuzione della concentrazione sierica di Colesterolo nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano i limiti superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento del Colesterolo (140-350 mg/dl).

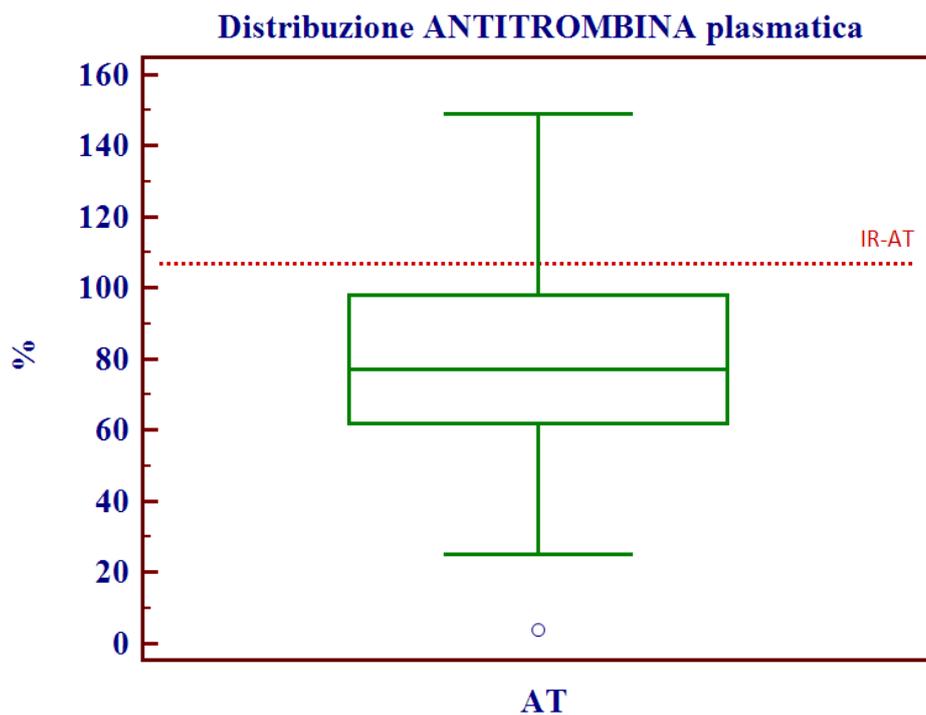


Grafico 11. Distribuzione dell'Antitrombina nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite inferiore dell'intervallo di riferimento (Antitrombina 105%).

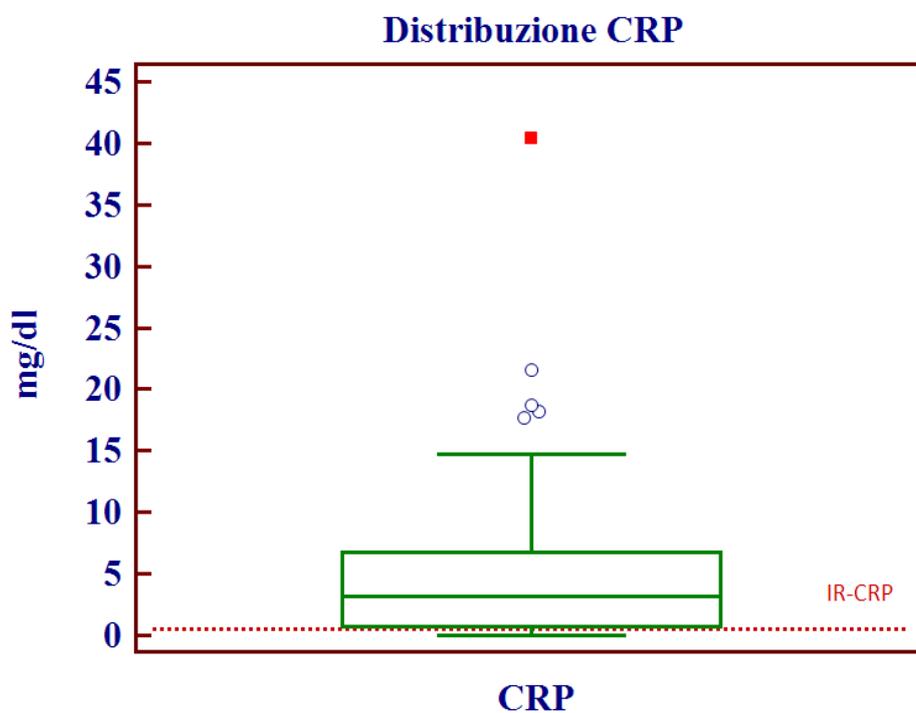


Grafico 12. Distribuzione della Proteina C reattiva nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento (CRP 0.5 mg/dl)

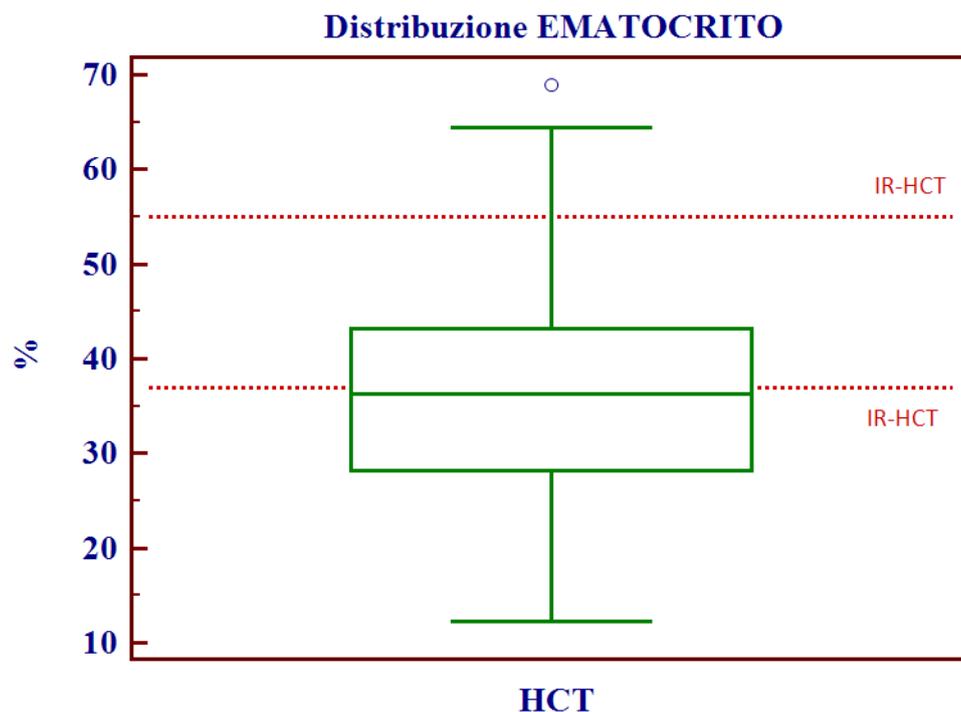


Grafico 13 Distribuzione dell'Ematocrito nei pazienti proteinurici (UPC>2). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano i limiti superiore ed inferiore dell'intervallo di riferimento dell'Ematocrito (37-55%).

I seguenti grafici mostrano le correlazioni più significative che sono state riscontrate (Grafico 14-32):

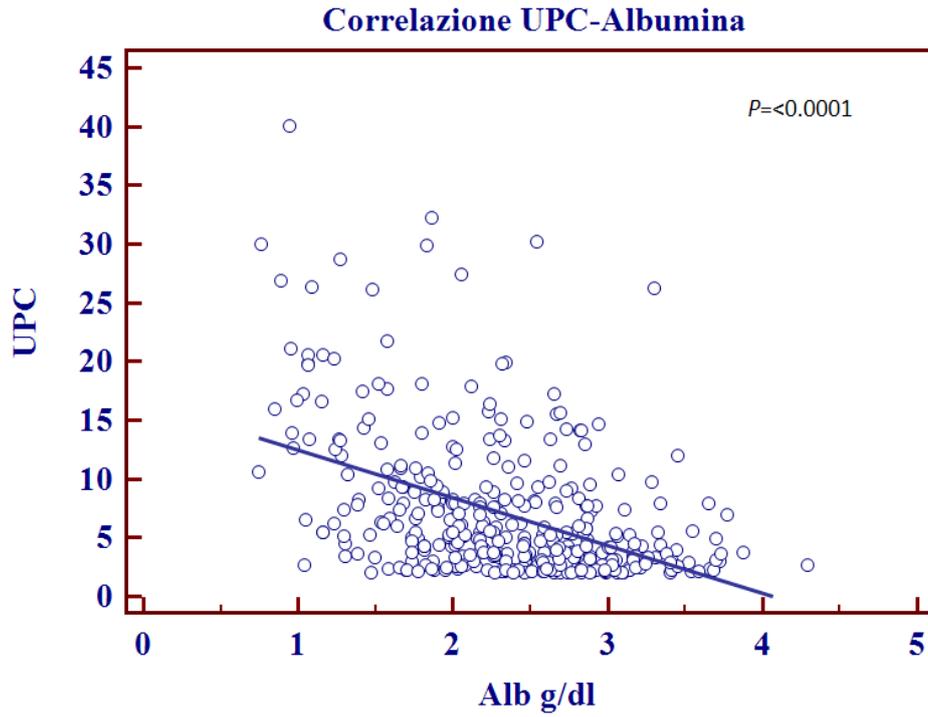


Grafico 14. Correlazione negativa tra l'UPC e l'albumina sierica nella popolazione di studio ($r = -0,43$).

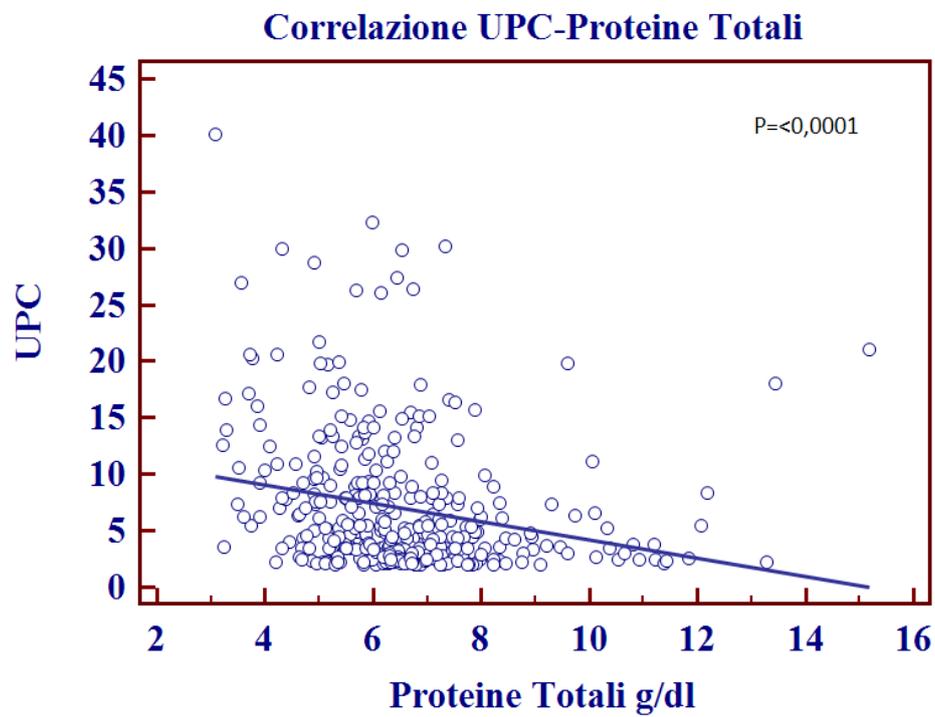


Grafico 15. Correlazione negativa tra UPC e Proteine Totali nella popolazione di studio ($r = -0,31$).

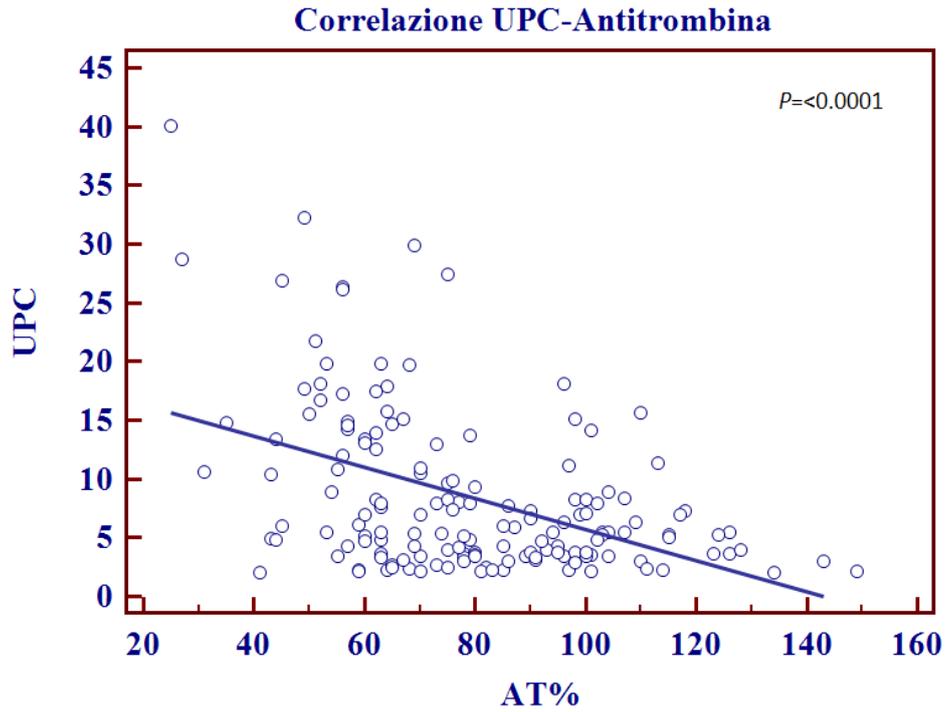


Grafico 16. Correlazione negativa tra UPC e Antitrombina nella popolazione di studio ($r = -0,39$).

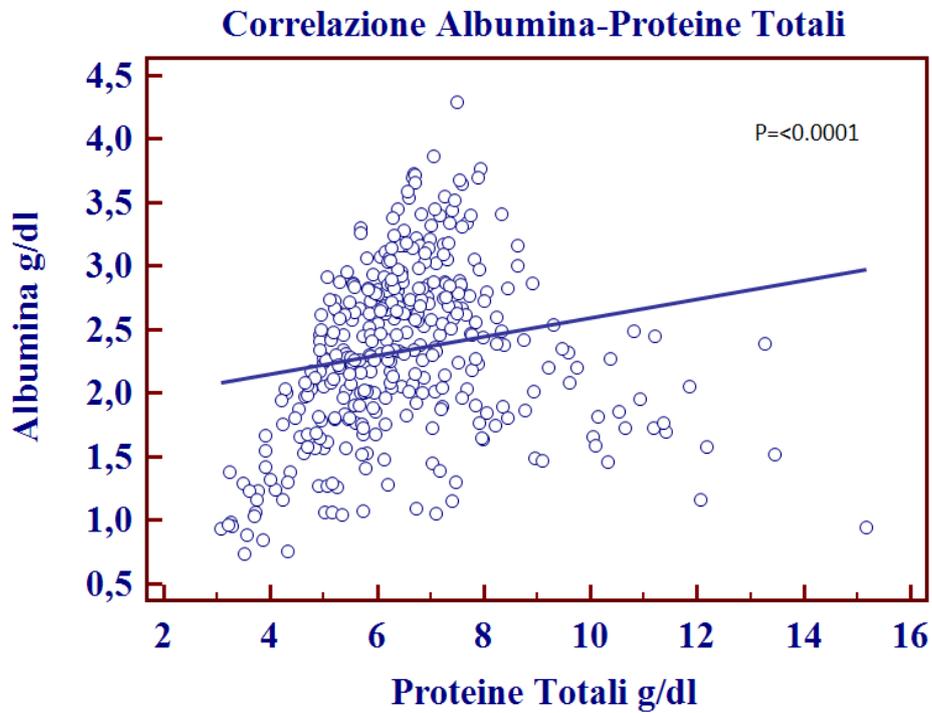


Grafico 17. Correlazione positiva tra Proteine Totali sieriche e Albumina sierica nella popolazione di studio ($r = 0,32$).

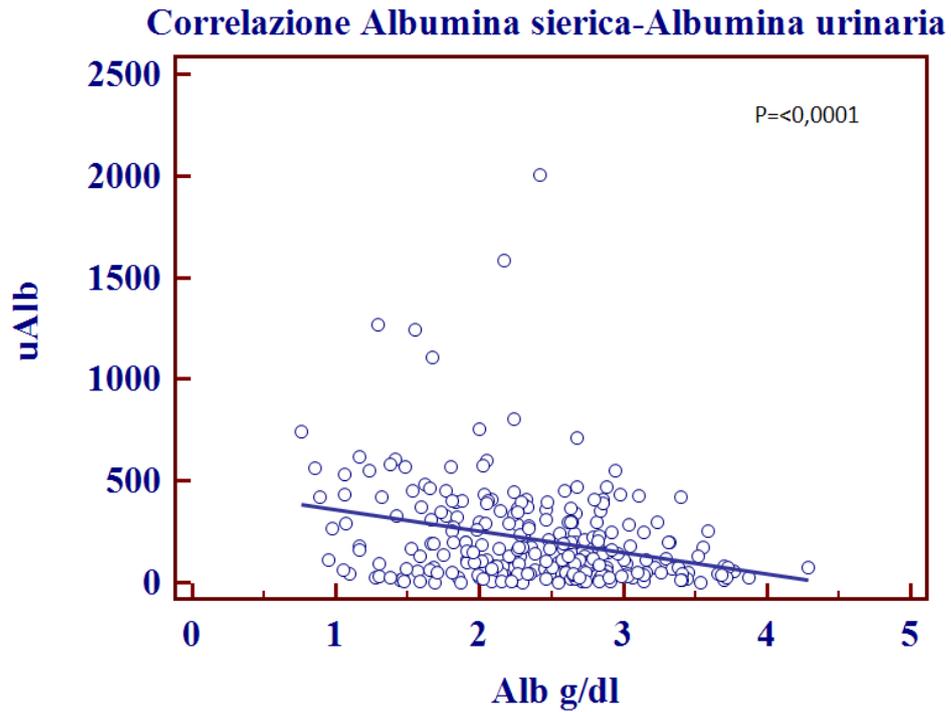


Grafico 18. Correlazione negativa tra Albumina Urinaria e Albumina sierica nella popolazione di studio ($r = -0,27$).

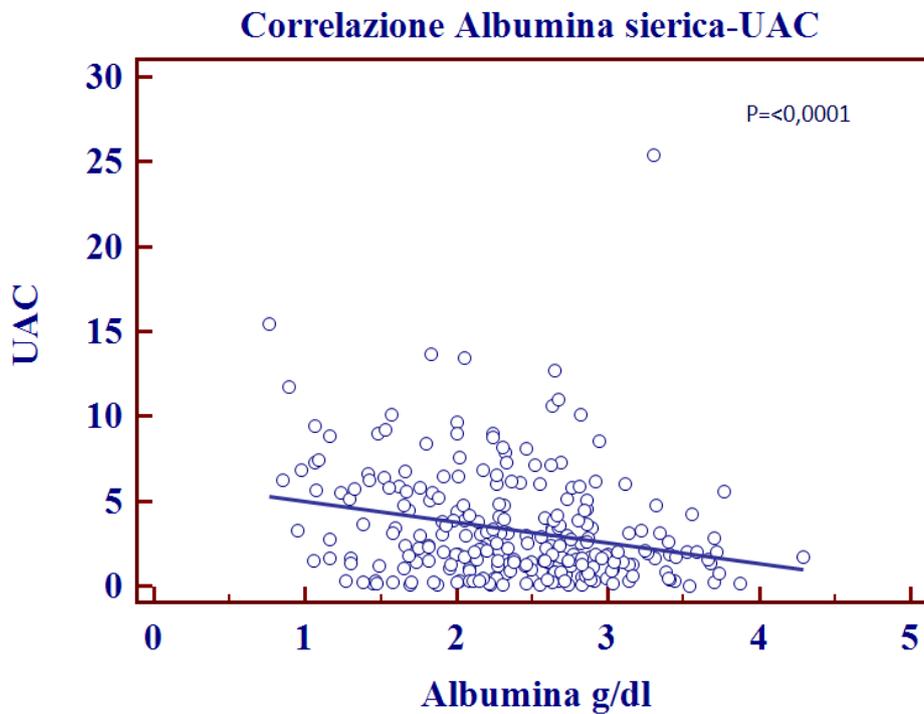


Grafico 19. Correlazione negativa tra Albumina sierica e UAC nella popolazione in esame ($r = -0,25$).

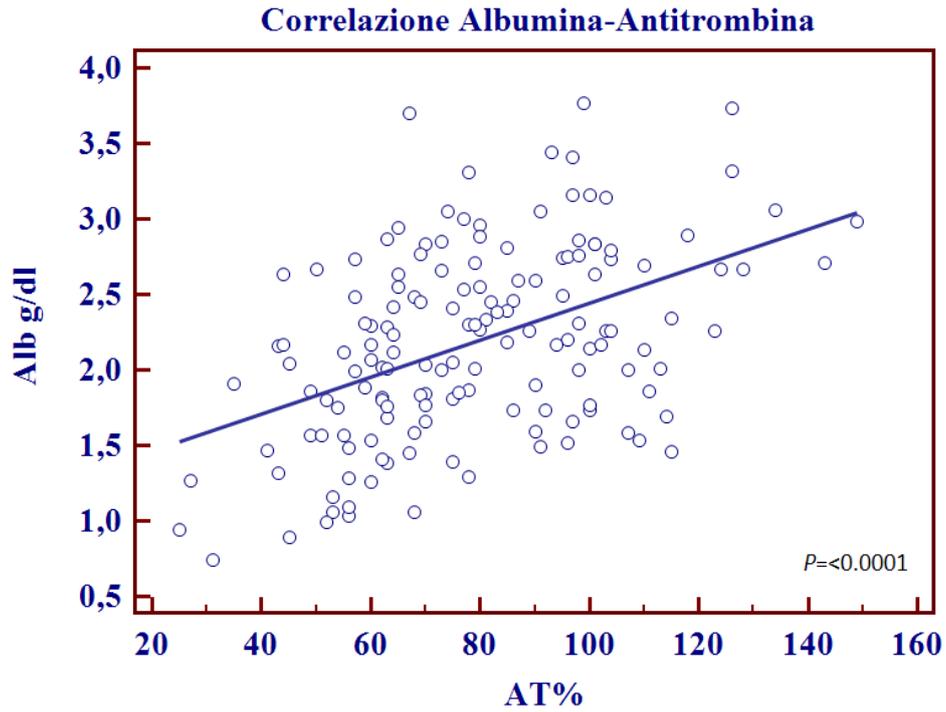


Grafico 20. Correlazione positiva tra Albumina Sierica e Antritrombina plasmatica nella popolazione di studio ($r = 0,44$).

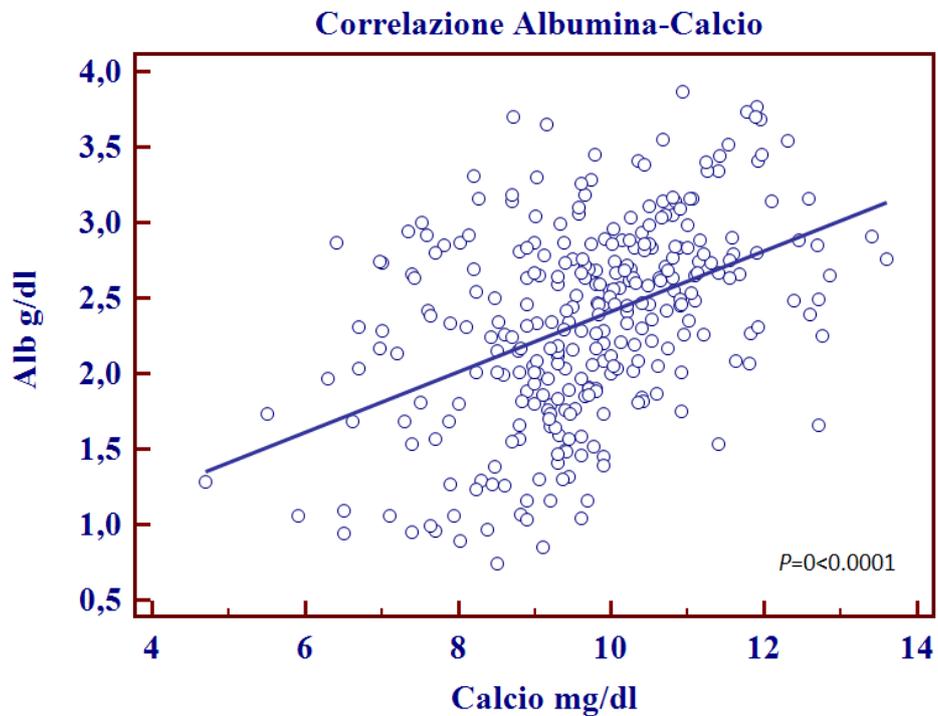


Grafico 21. Correlazione positiva tra Albumina sierica e Calcio nella popolazione di studio ($r = 0,43$).

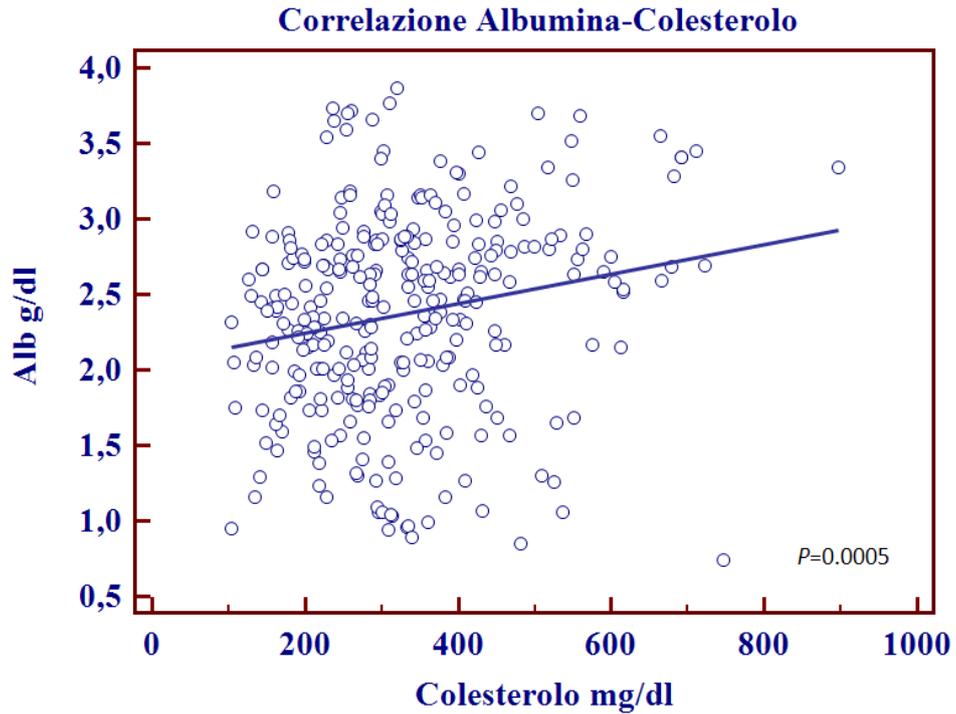


Grafico 22. Correlazione positiva tra Albumina sierica e Colesterolo nella popolazione di studio ($r = 0,20$).

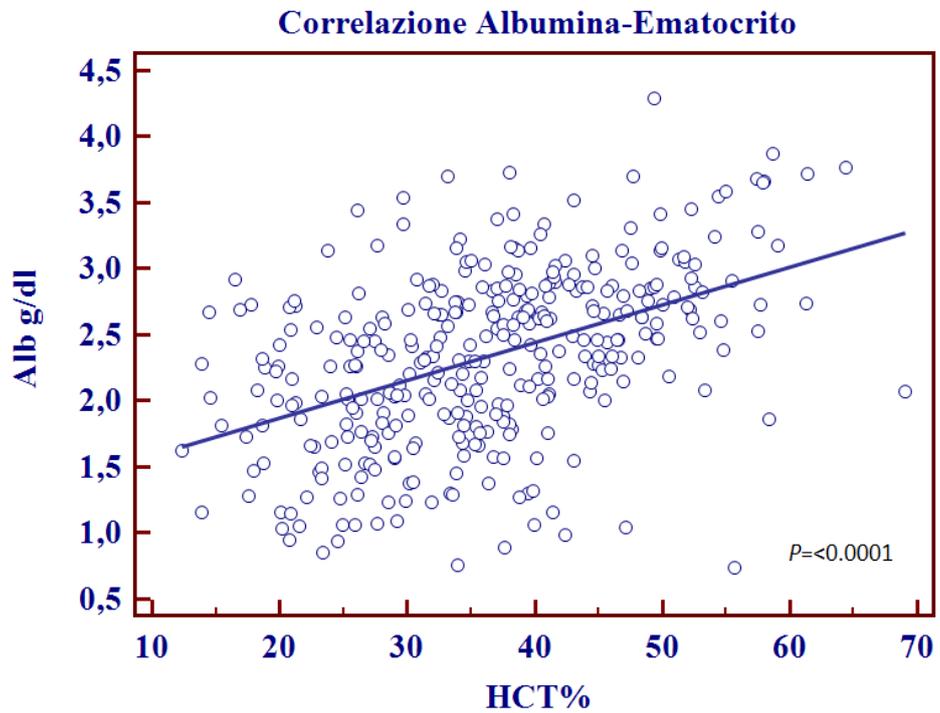


Grafico 23. Correlazione positiva tra Albumina sierica ed Ematocrito nella popolazione di studio ($r = 0,47$)

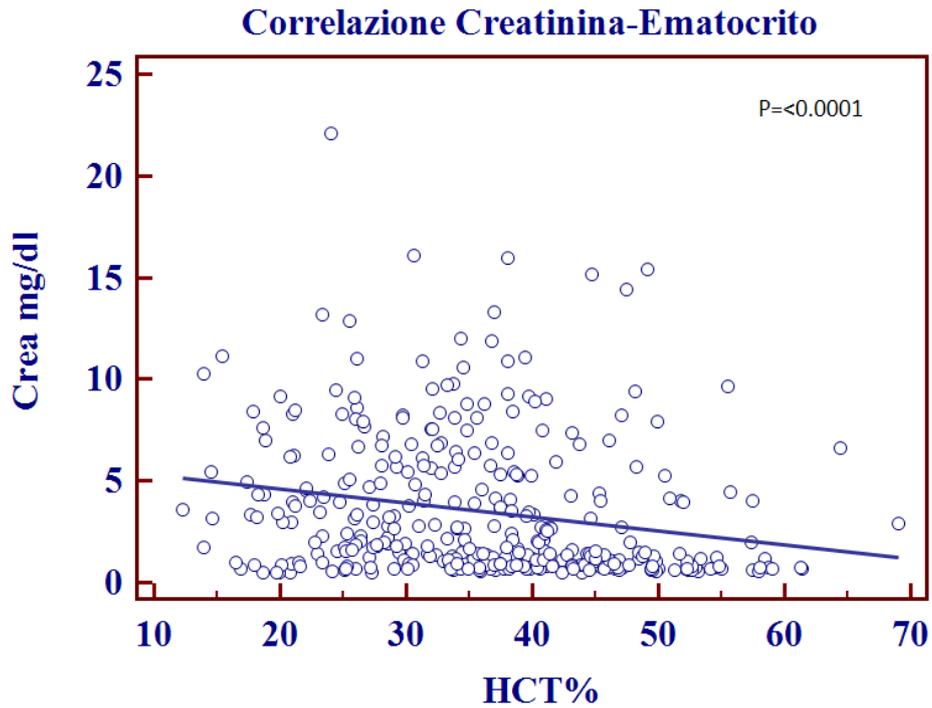


Grafico 24. Correlazione negativa tra Creatinina sierica ed Ematocrito nella popolazione di studio ($r = -0,29$).

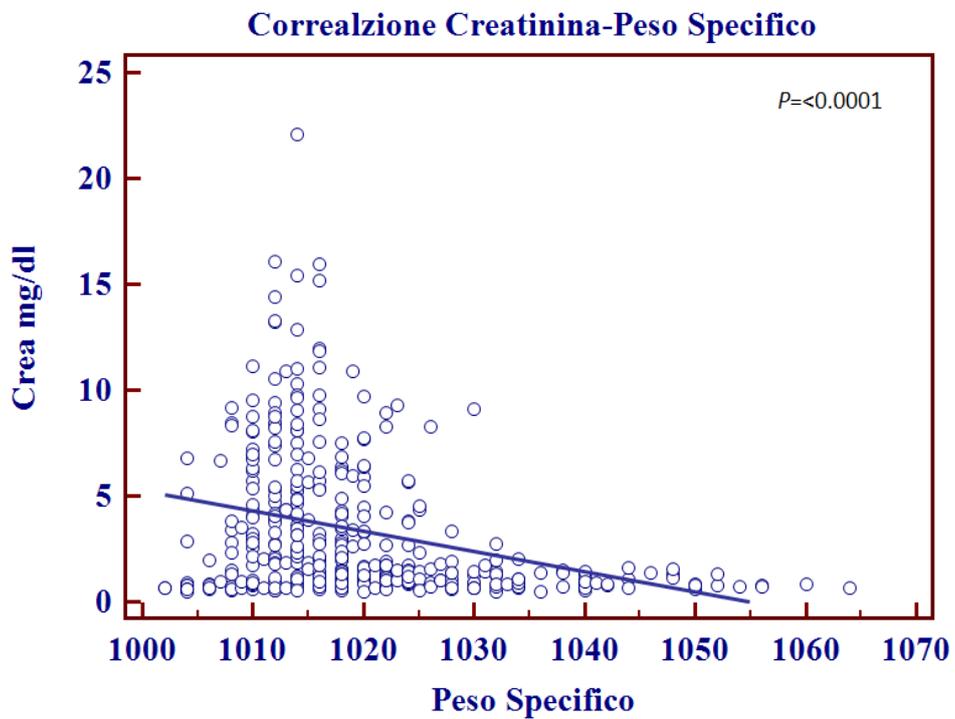


Grafico 25. Correlazione negativa tra Creatinina sierica e Peso Specifico urinario nella popolazione di studio ($r = -0,28$).

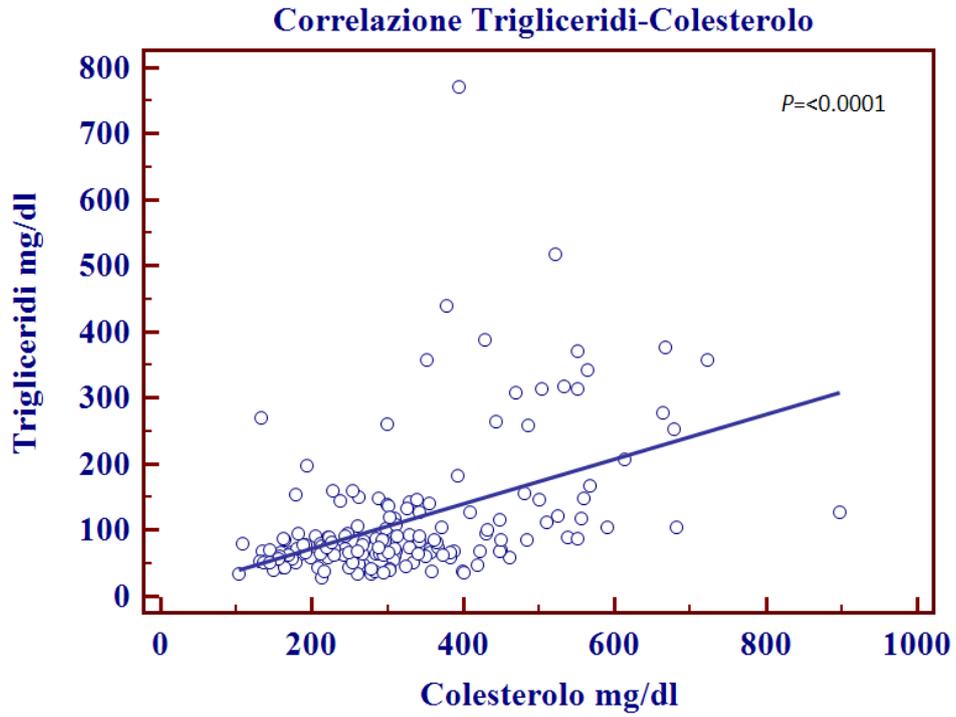


Grafico 26. Correlazione positiva tra Colesterolo e Trigliceridi nella popolazione di studio. ($r = 0,47$).

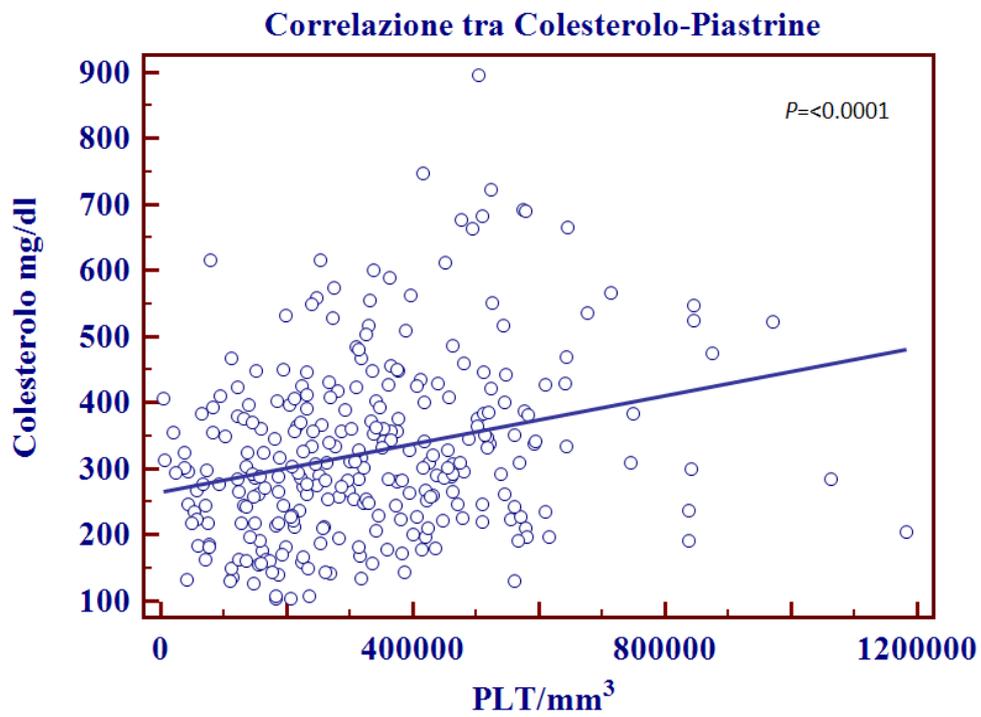


Grafico 27. Correlazione positiva tra Colesterolo e Piastrine nella popolazione di studio ($r = 0,27$).

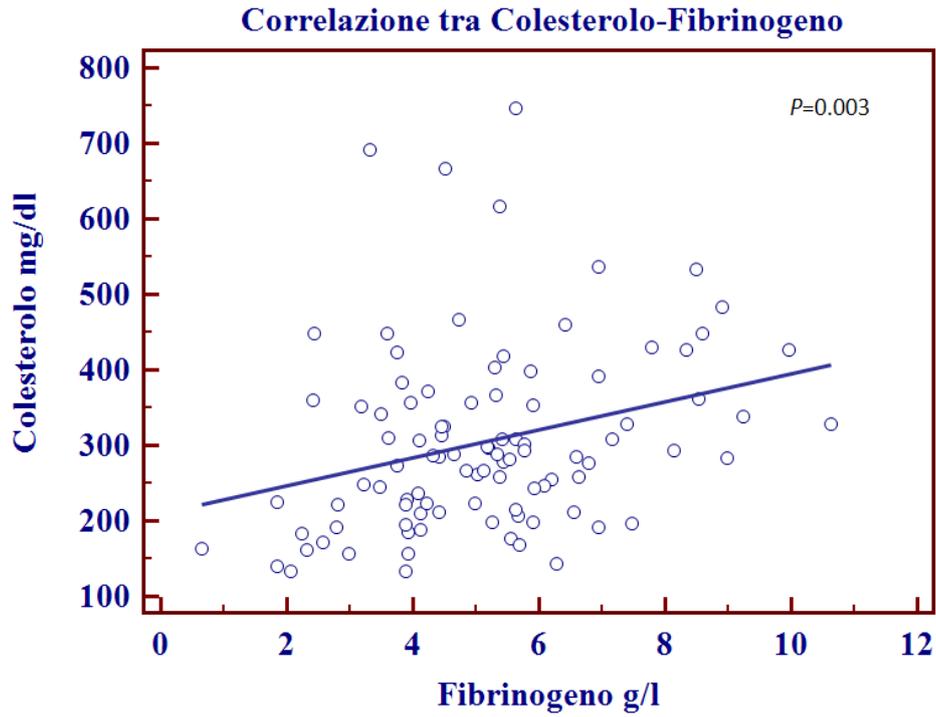


Grafico 28. Correlazione positiva tra Colesterolo e Fibrinogeno nella popolazione di studio ($r = 0,31$).

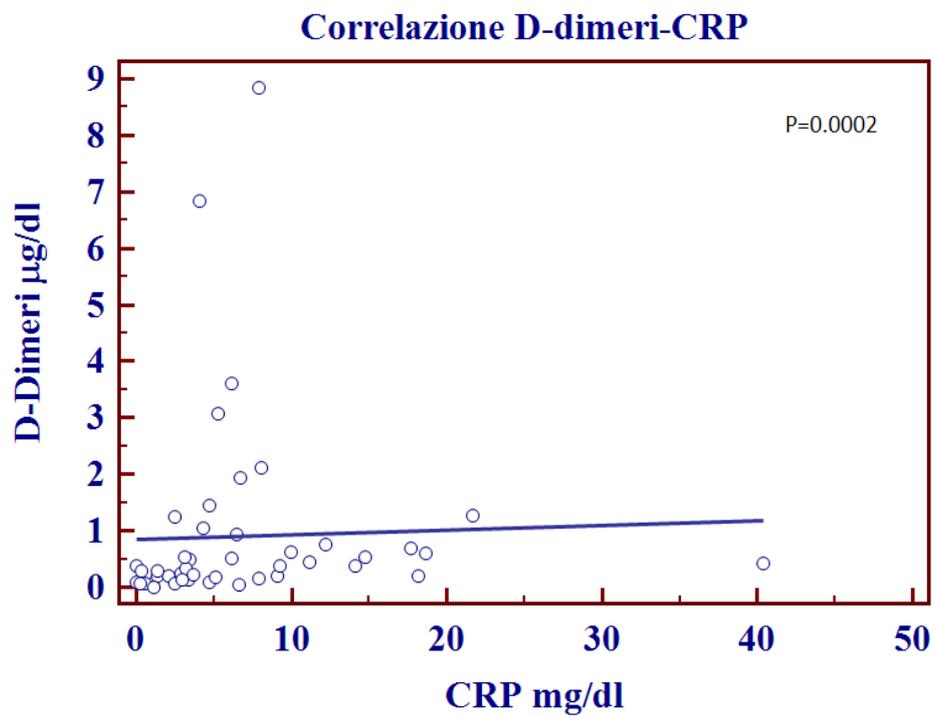


Grafico 29. Correlazione positiva tra D-dimeri e Proteina C reattiva nella popolazione di studio ($r = 0,50$).

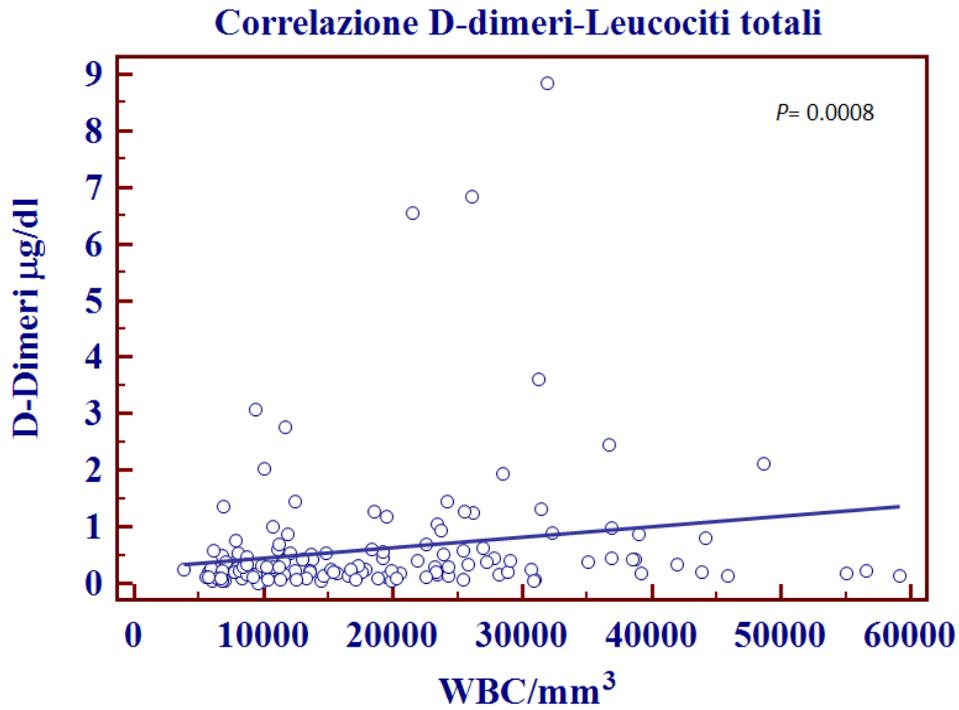


Grafico 30. Correlazione positiva tra D-dimeri e Leucociti Totali nella popolazione di studio ($r = 0,27$).

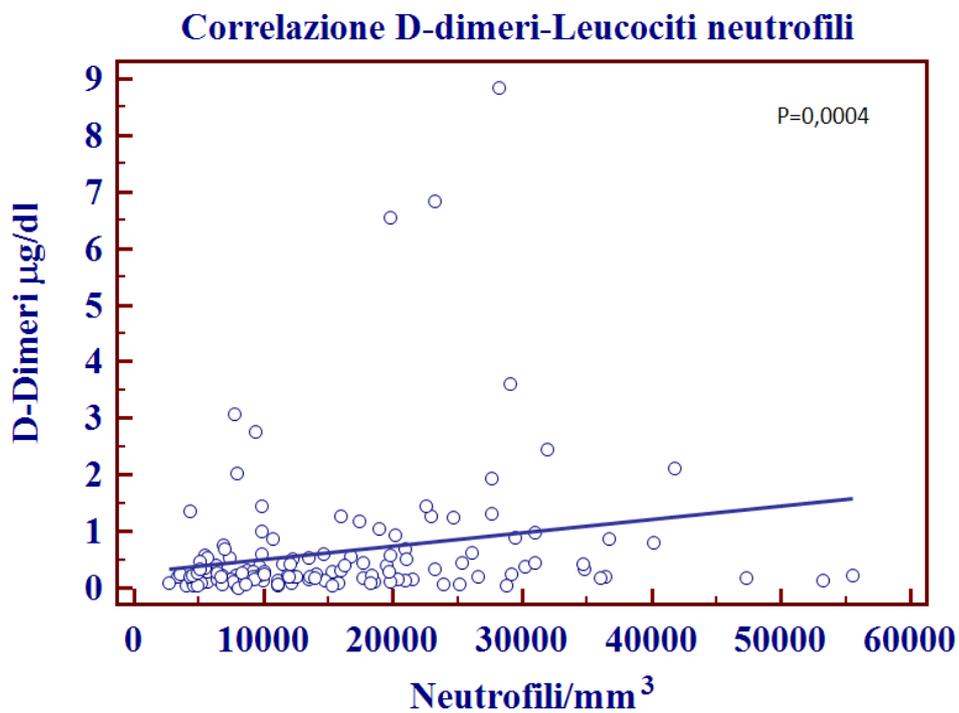


Grafico 31. Correlazione positiva tra D-dimeri e Leucociti neutrofil nella popolazione di studio ($r = 0,29$).

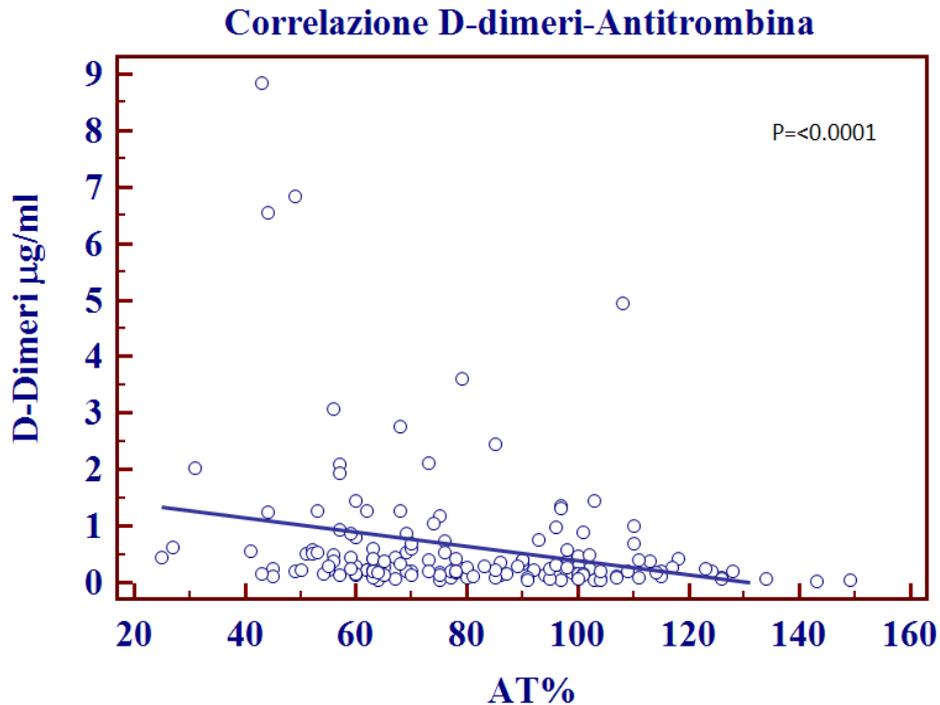


Grafico 32. Correlazione negativa tra D-dimeri e Antitrombina nella popolazione di studio ($r = -0,33$).

La suddivisione della nostra popolazione in pazienti con $UPC \geq 3.5$ e < 3.5 ha messo in evidenza alcune differenze significative: pazienti con $UPC \geq$ di 3.5 sono significativamente più giovani e presentano concentrazioni di albumine, di ematocrito, di calcio, TIBC significativamente minori rispetto a quelli che hanno proteinuria $<$ di 3.5, concentrazioni di CRP, di urea e di fosforo significativamente maggiori, come mostrato nei seguenti grafici (Grafici 33-42)

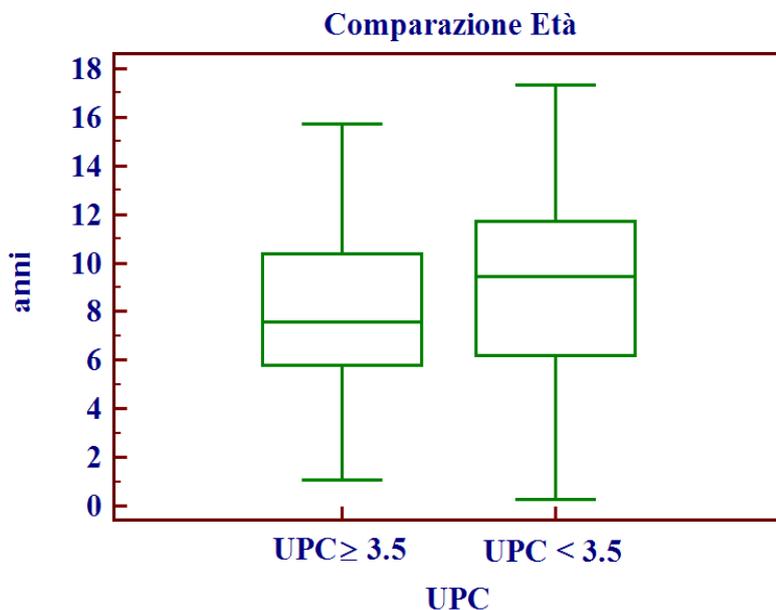


Grafico 33. Comparazione dell'età tra pazienti con $UPC \geq 3.5$ e $UPC < 3.5$ ($p=0,0006$). La linea entro i box indica i valori mediani.

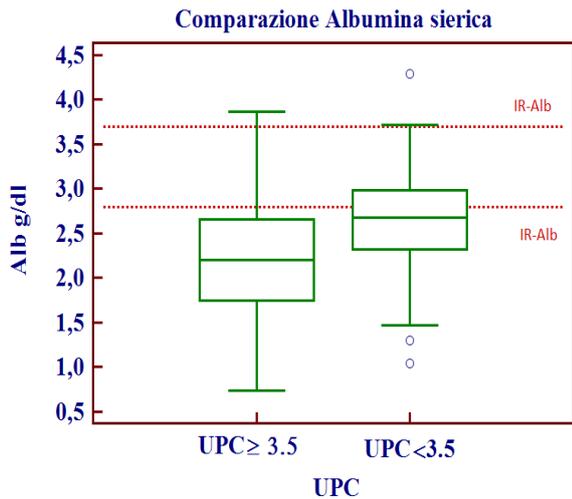


Grafico 34. Comparazione dell' Albumina sierica tra pazienti con UPC ≥ 3.5 e UPC < 3.5 ($p = < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento dell'Albumina sierica (2.80-3.70 g/dl).

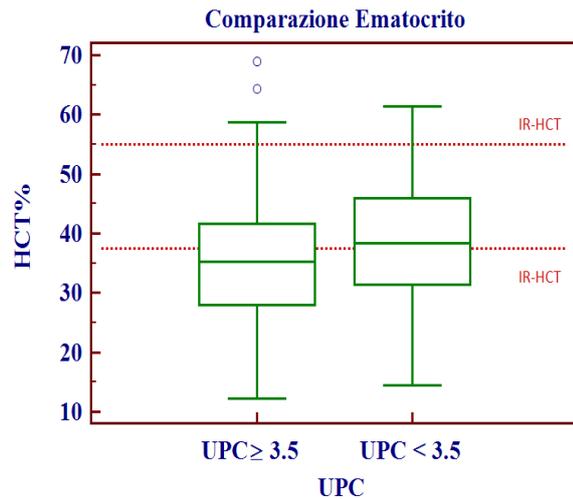


Grafico 35. Comparazione dell' Ematocrito tra pazienti con UPC ≥ 3.5 e UPC < 3.5 ($p = 0,0006$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento dell'Ematocrito (37-55%).

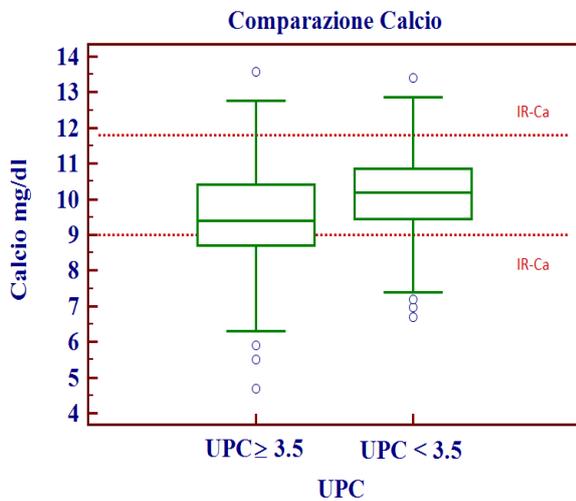


Grafico 36. Comparazione del Calcio tra pazienti con UPC ≥ 3.5 e UPC < 3.5 ($p = < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento del Calcio (9-11.8 mg/dl).

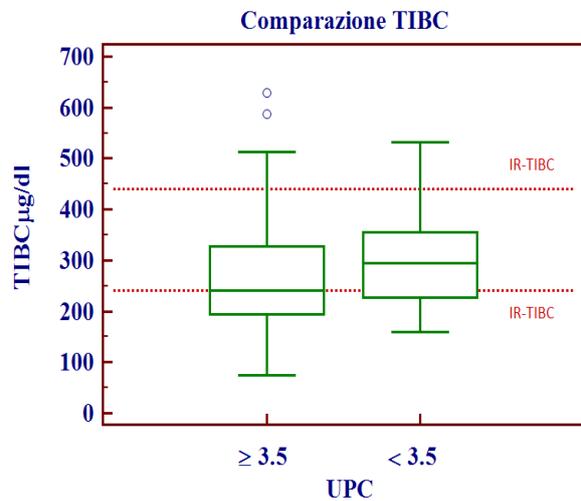


Grafico 37. Comparazione della TIBC tra pazienti con UPC ≥ 3.5 e UPC < 3.5 ($p = 0,01$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento della TIBC (240-440 $\mu\text{g/dl}$).

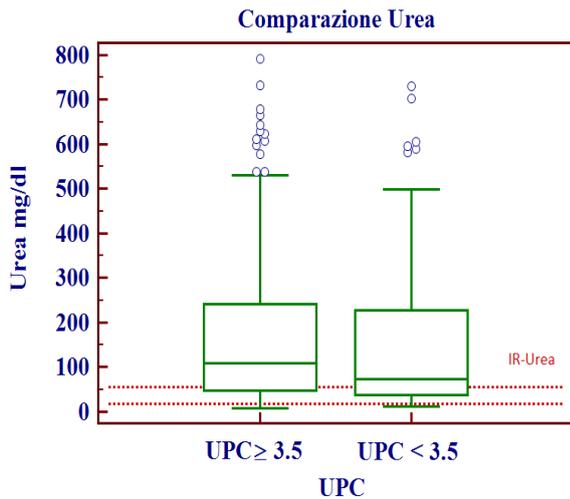


Grafico 38. Comparazione dell'Urea tra pazienti con $UPC \geq 3.5$ e $UPC < 3.5$ ($p=0,05$). La linea entro i box indica i valori mediани. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento dell'Urea (18-55 mg/dl).

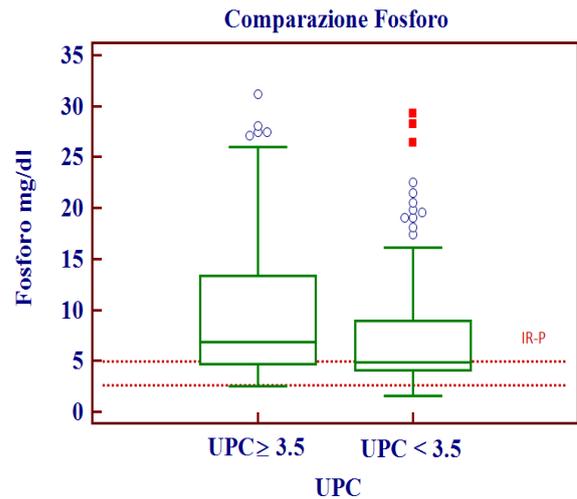


Grafico 39. Comparazione del Fosforo tra pazienti con $UPC \geq 3.5$ e $UPC < 3.5$ ($p=0,0002$). La linea entro i box indica i valori mediани. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento del fosforo (2.6-4.9 mg/dl).

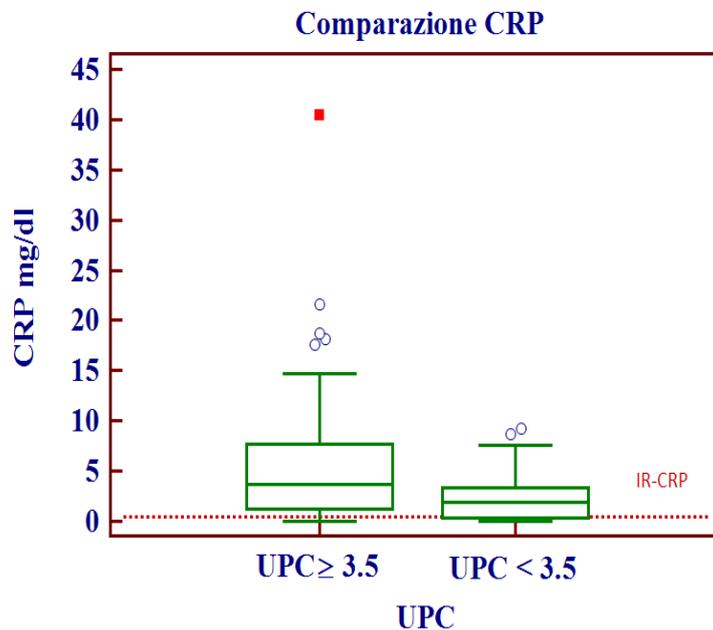


Grafico 40. Comparazione della Proteina C reattiva tra pazienti con $UPC \geq 3.5$ e $UPC < 3.5$ ($p=0,04$). La linea entro i box indica i valori mediани. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento della CRP (0-0.5 mg/dl).

Nessuna differenza tra i gruppi per quanto riguarda le concentrazioni di creatinina ($p=0,07$) colesterolo ($p=0,4$), trigliceridi ($p= 0,7$), sodio ($p= 0,6$), potassio ($p= 0,9$), cloro ($p= 0,6$), ferro totale ($p=0,8$) e pressione sistolica ($p= 0,6$).

Nei grafici 41 e 42 sono illustrate le differenze non significative tra i due gruppi del colesterolo e della creatinina sierica.

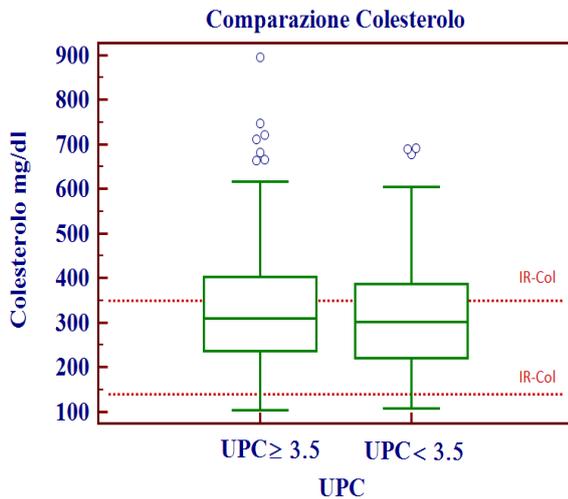


Grafico 41. Comparazione del colesterolo totale tra pazienti con UPC ≥ 3.5 e UPC < 3.5 ($p=0,4$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano l'intervallo di riferimento del colesterolo (140-350 mg/dl).

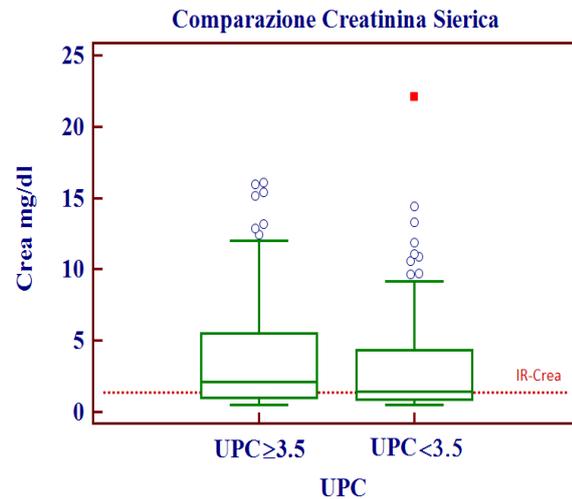


Grafico 42. Comparazione della creatinina sierica tra pazienti con UPC ≥ 3.5 e UPC < 3.5 ($p=0,07$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiate indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento della creatinina (0.65-1.35 mg/dl).

La suddivisione dei pazienti in base alla concentrazione di albumina (≥ 2.5 e < 2.5 g/dl) ha permesso di mettere in evidenza come cani maggiormente ipoalbuminemici abbiano un'età inferiore, siano maggiormente iperazotemici e abbiano valori inferiori di ematocrito, proteine totali, di colesterolo, Ferro, TIBC e di piastrine (Grafici 43-51).

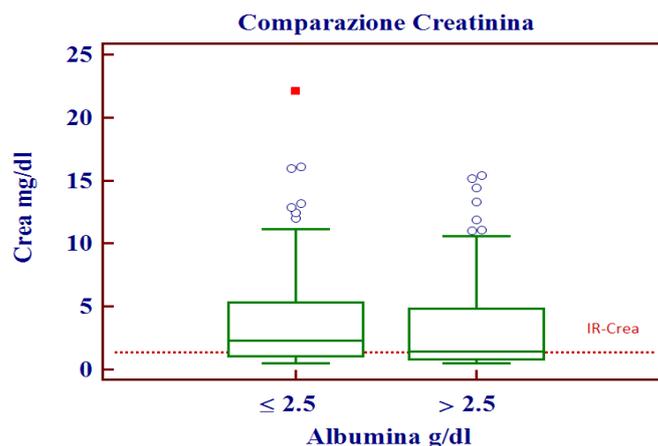


Grafico 43. Comparazione della creatinina sierica tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p=0,01$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento della creatinina (0.65-1.35 mg/dl)

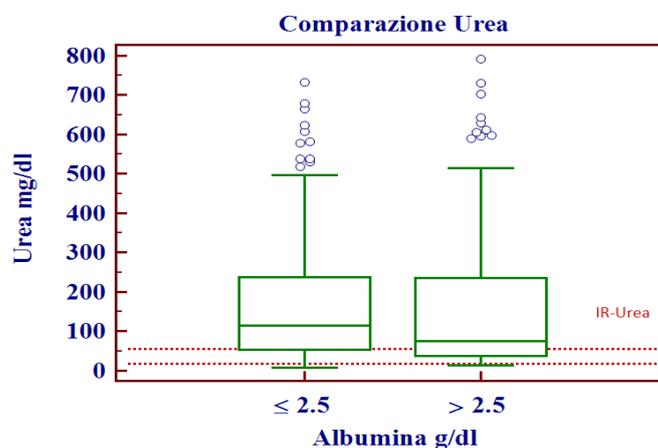


Grafico 44. Comparazione dell'Urea tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p=0,02$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento dell'Urea (18-55 mg/dl)

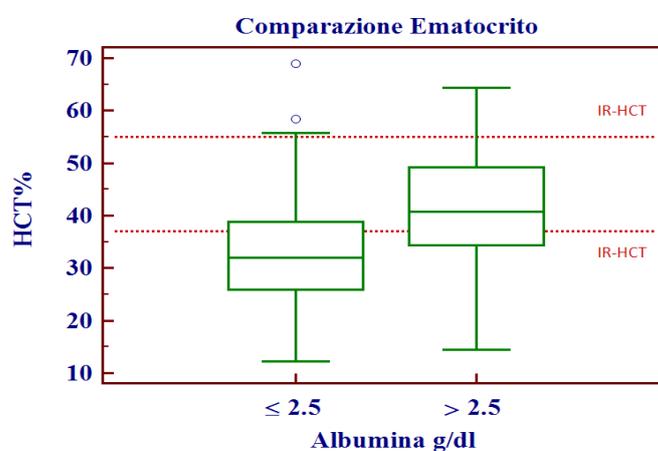


Grafico 45. Comparazione dell'Ematocrito tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p=<0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento dell'Ematocrito (37-55%)

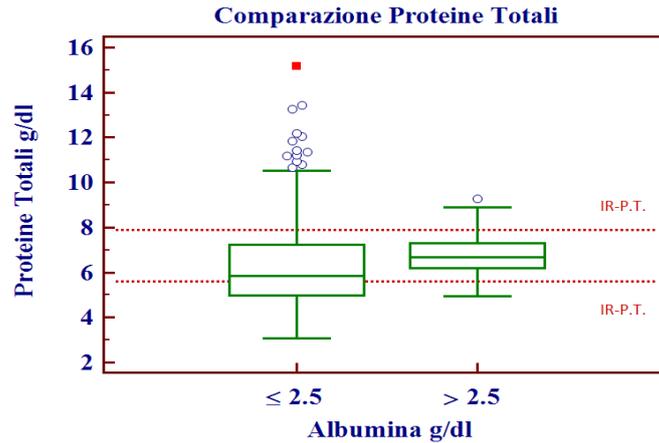


Grafico 46. Comparazione delle Proteine Totali tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento delle Proteine Totali (6.60-7.90 g/dl)

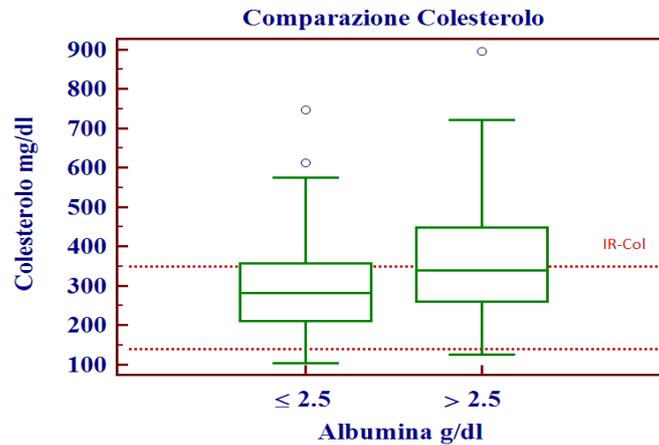


Grafico 47. Comparazione del Colesterolo tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento del colesterolo (140-350 mg/dl)

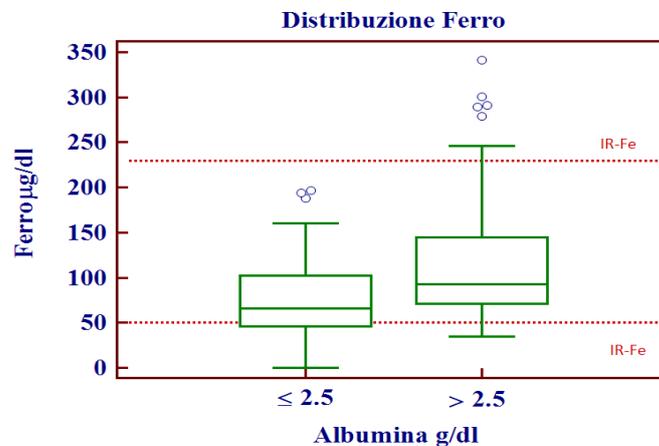


Grafico 48. Comparazione del Ferro totale tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento del Ferro totale (50-230µg/dl)

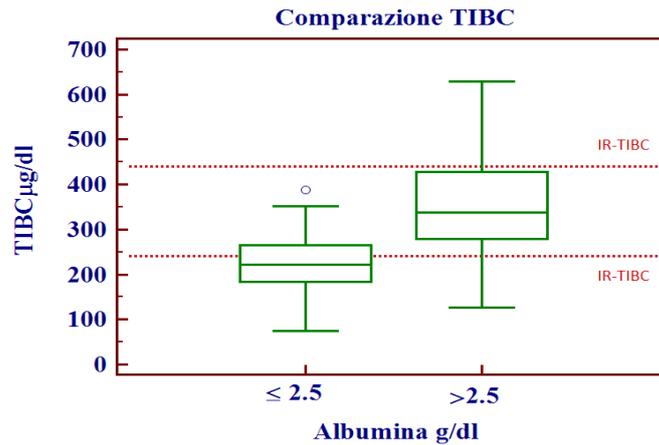


Grafico 49. Comparazione della TIBC tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento della TIBC (240-440 $\mu\text{g/dl}$)

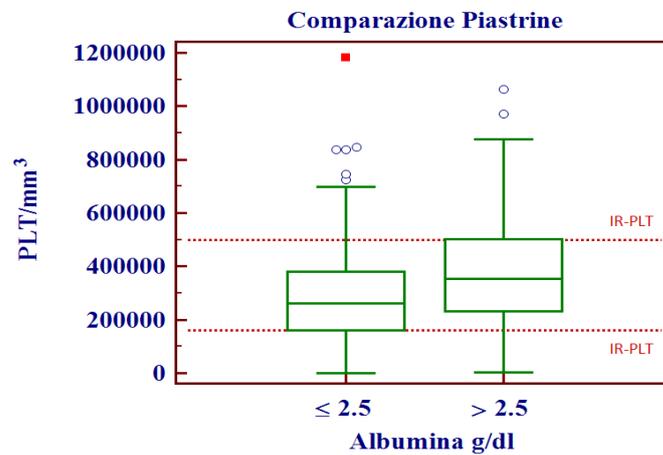


Grafico 50. Comparazione delle Piastrine tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p = 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate l'intervallo di riferimento delle piastrine (160000-500000 plt/mm^3)

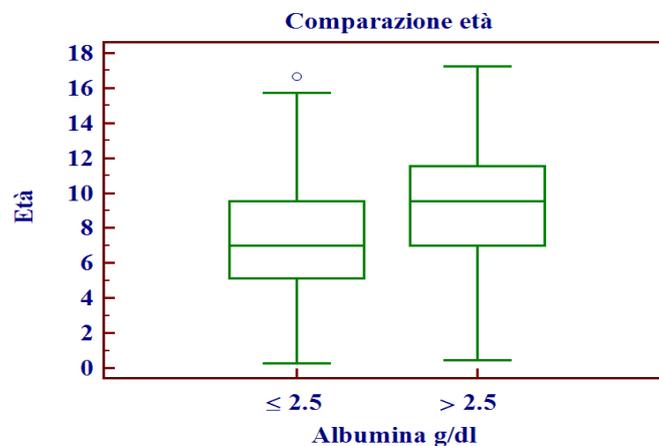


Grafico 51. Comparazione dell'età tra pazienti con albumina ≤ 2.5 e > 2.5 g/dl ($p < 0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani.

La suddivisione dei pazienti in base al peso specifico (<1030 o ≥1030) ha mostrato livelli di creatinina, urea e UPC maggiori negli animali con peso specifico < 1030 (Grafici 52-54)

Il rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC) si è mostrato elevato in entrambi i gruppi senza differenze significative (Grafico 55).

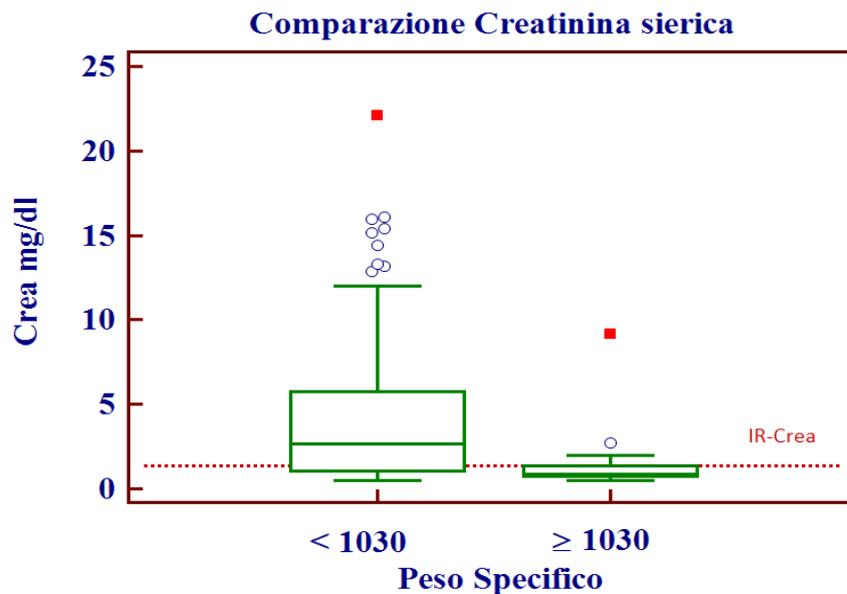


Grafico 52. Comparazione della Creatinina sierica tra pazienti con Peso Specifico <1030 o ≥1030 ($p<0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore della Creatinina sierica (1.35 mg/dl)

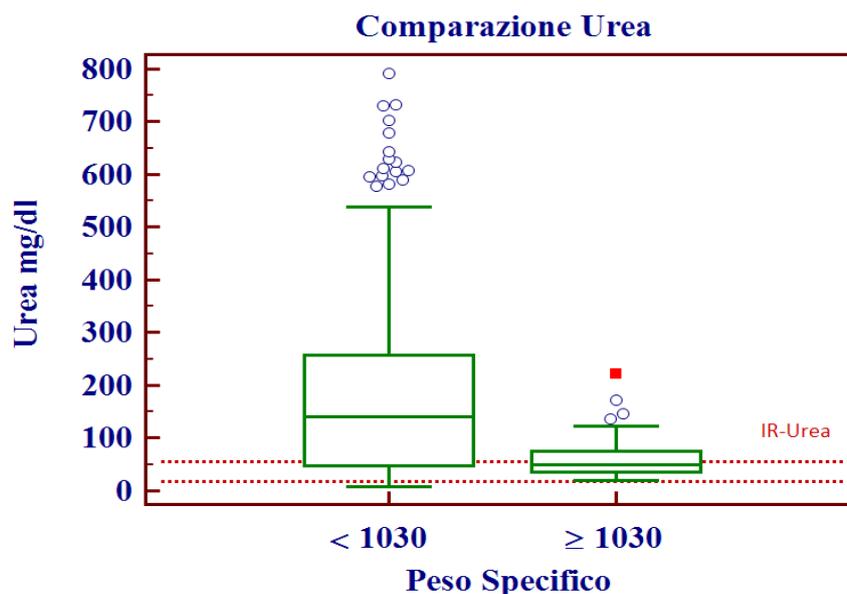


Grafico 53. Comparazione dell'Urea tra pazienti con Peso Specifico <1030 o ≥1030 ($p<0,0001$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica l'intervallo di riferimento dell'urea (18-55 mg/dl)

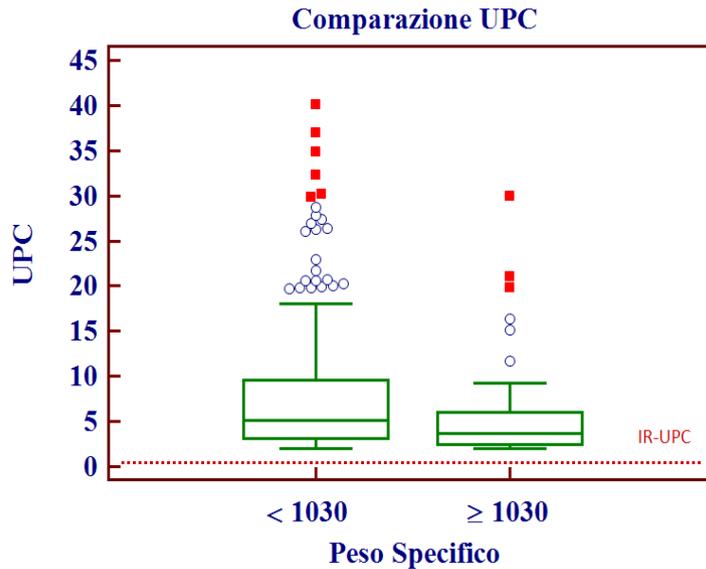


Grafico 54. Comparazione dell'UPC tra pazienti con Peso Specifico <1030 0 ≥1030 ($p=0,0002$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento dell'UPC (0-0.4)

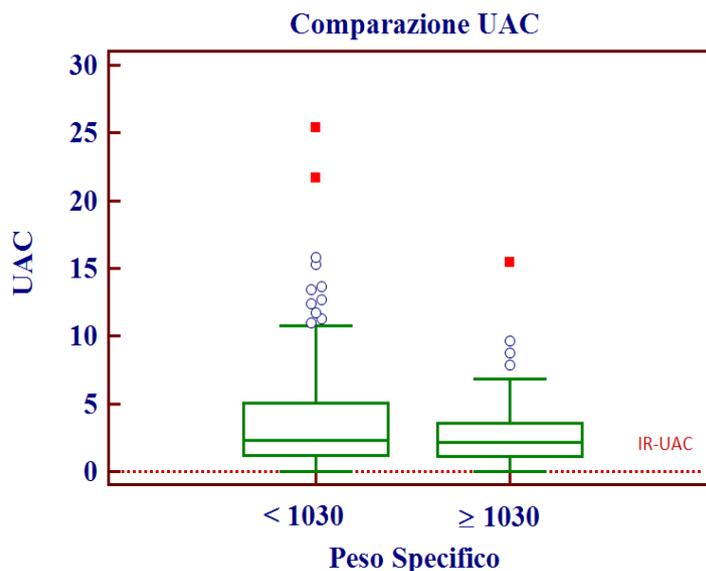


Grafico 55 Comparazione dell'UAC tra pazienti con Peso Specifico <1030 0 ≥1030 ($p=0,2$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento dell'UAC (0-0.03)

I pazienti con sedimento “attivo” presentano valori di creatinina e di urea significativamente maggiori rispetto a quelli che hanno un sedimento “spento” (Grafici 56 e 57), nessuna differenza tra questi gruppi riguardo l'UPC e l'UAC (Grafici 58-59).

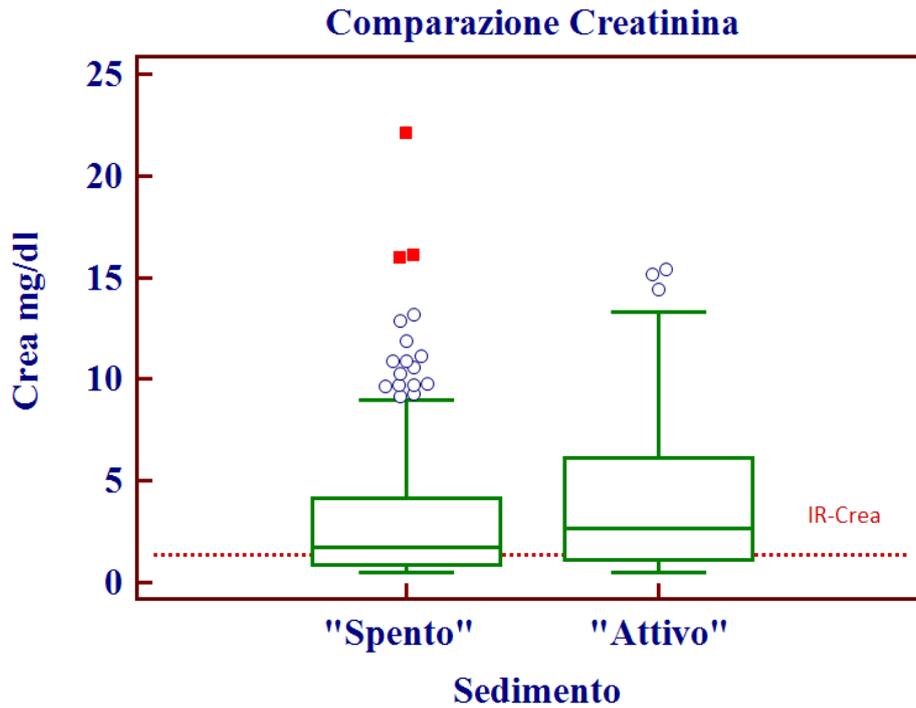


Grafico 56 Comparazione della Creatinina sierica tra pazienti con sedimento “Attivo” e sedimento “Spento” ($p=0,02$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell’intervallo di riferimento della Creatinina sierica (1.35 mg/dl)

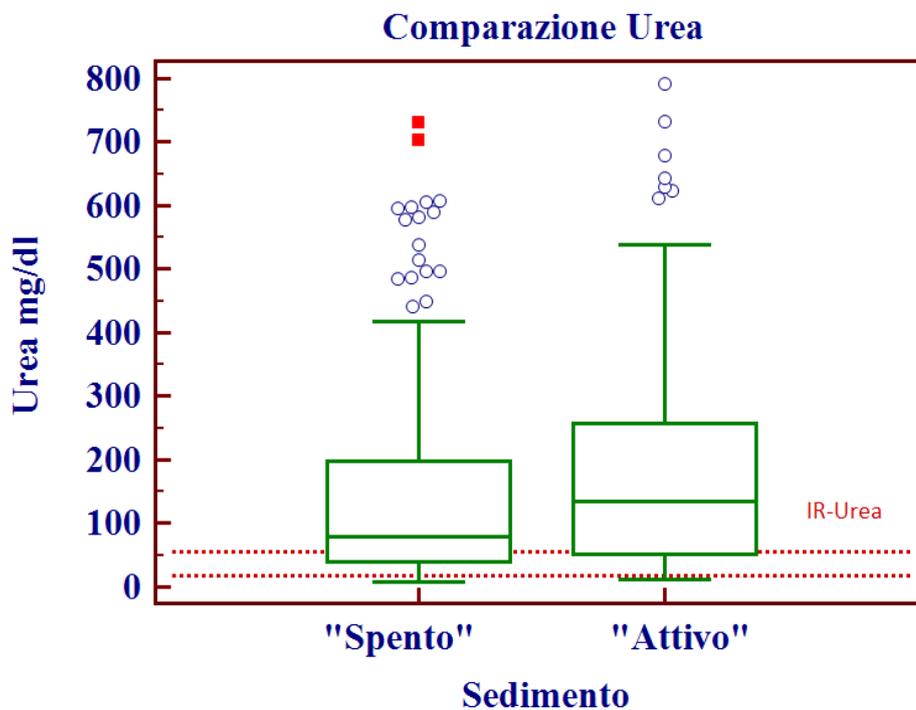


Grafico 57. Comparazione dell’Urea tra pazienti con sedimento “Attivo” e sedimento “Spento” ($p=0,006$). La linea entro i box indica i valori mediani. Le linee tratteggiate indicano gli intervalli di riferimento dell’ Urea (18-55 mg/dl)

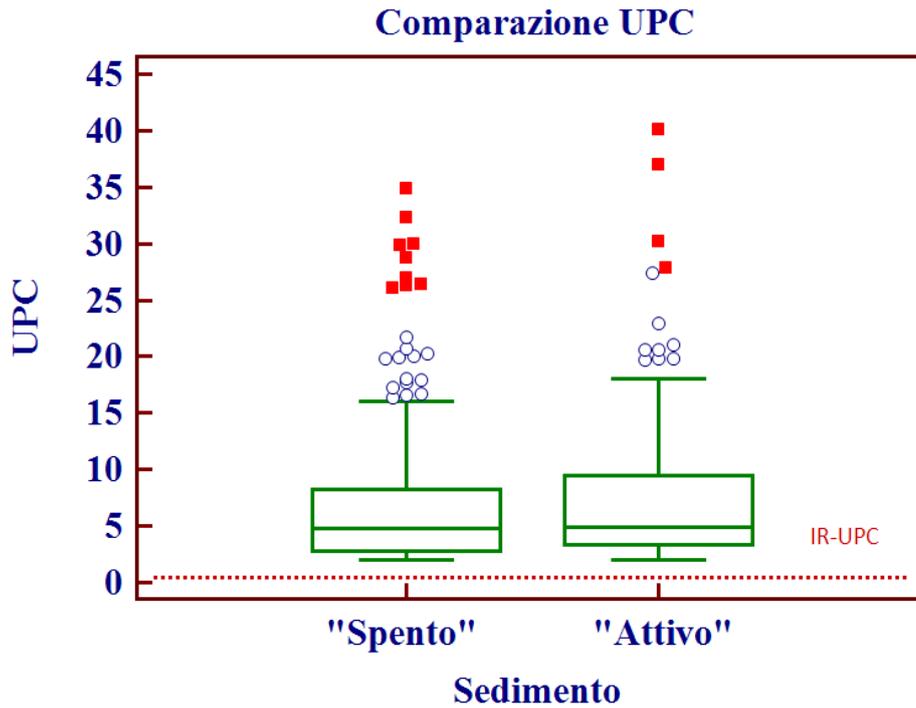


Grafico 58. Comparazione dell'UPC tra pazienti con sedimento "Attivo" e sedimento "Spento" ($p=0,2$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento dell'UPC (0-0.4)

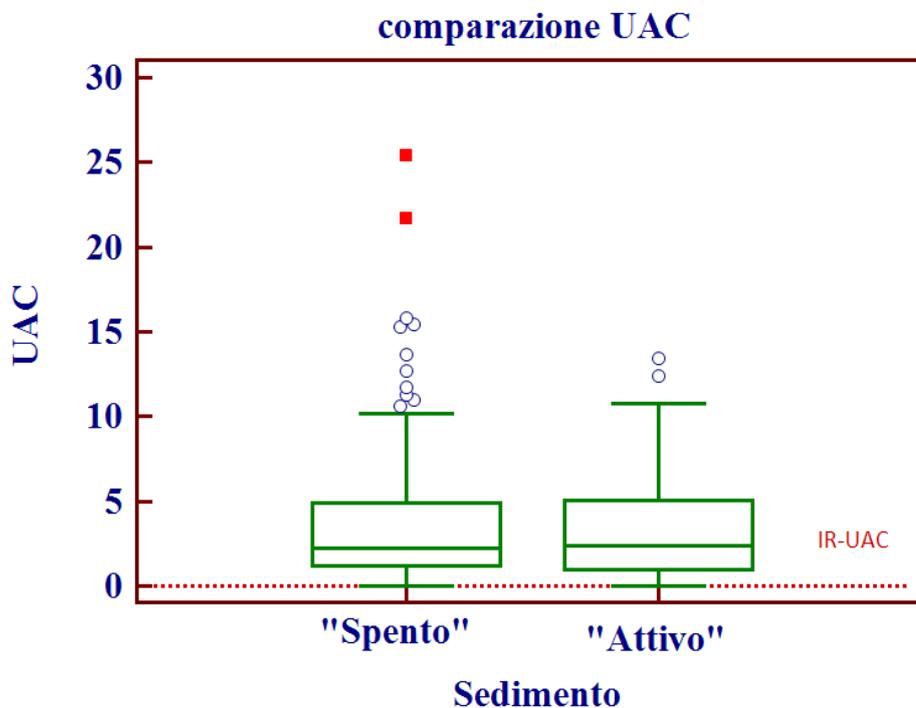


Grafico 59. Comparazione dell'UAC tra pazienti con sedimento "Attivo" e sedimento "Spento" ($p=0,7$). La linea entro i box indica i valori mediani. La linea tratteggiata indica il limite superiore dell'intervallo di riferimento dell'UAC (0-0.03)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

Lo studio effettuato sui pazienti aventi una proteinuria definita glomerulare (UPC>2), pervenuti presso l'Ospedale Didattico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna nell'arco di nove anni ha permesso di raccogliere un numero elevato di casi e di alterazioni clinicopatologiche.

Il confronto con studi precedenti riguardante il segnalamento della popolazione presa in esame permette di concordare con la Letteratura presente a riguardo, in quanto le glomerulopatie colpiscono prevalentemente soggetti adulti e anziani (Lewis, 1976; DiBartola et al., 1980; MacDougall et al., 1986; Cook e Cowgill, 1996). In un recente studio (Klostermann et al., 2011) i cani con sindrome nefrosica erano significativamente più giovani rispetto a quelli che avevano una glomerulopatia non nefrosica.

Anche nel nostro studio, pazienti con UPC maggiore di 3.5 sono risultati essere significativamente più giovani rispetto a quelli con UPC minore di 3.5. Così come pazienti con albumine ≤ 2.5 g/dl presentavano una mediana di età inferiore (7 anni, range 0,3-16 anni) rispetto a quelli con albumina > 2.5 g/dl (9,5 anni, range 0,5-17 anni).

Per quanto riguarda il sesso, nel nostro studio la maggior parte dei pazienti era di sesso maschile (59%) diversamente da altri studi in cui le femmine sterilizzate erano maggiormente rappresentate (Cook e Cowgill, 1996; Klosterman et al., 2011).

La maggior parte dei cani presenti nel nostro lavoro, a differenza che in altri, erano meticci, ma alcune razze presenti concordano con quanto già presente in Letteratura (Cook e Cowgill, 1996; Vasilopoulos et al., 2005; Klosterman et al., 2011), in quanto tra quelle rappresentate sono presenti il Labrador Retriever, il Cocker Spaniel, il Dalmata, il Dobermann Pinscher. I risultati riflettono probabilmente la maggiore diffusione di alcune razze rispetto ad altre, infatti nella nostra popolazione erano presenti, con numerosi soggetti, anche il Boxer, il Setter Inglese, il Segugio Italiano e il Pastore Tedesco.

La nostra popolazione di pazienti proteinurici ha mostrato valori mediani di creatinina, urea, fosforo, albumina urinaria, CRP e fibrinogeno al di sopra del limite superiore di riferimento, valori mediani di albumina sierica, ematocrito, antitrombina al disotto del limite inferiore di riferimento.

Il 53% dei pazienti presentava valori di creatinina al di sopra del limite superiore di riferimento (0,65-1,35 mg/dl), il 59% aveva valori elevati di urea (10-55 mg/dl).

Il 44,3% presentava una lieve anemia (HCT<37%) con un valore mediano di ematocrito di 36,2% (range 12,3-69%). Nel 25,7% dei casi l'anemia era non rigenerativa (Indice Reticolocitario <1%). L'anemia nei pazienti nefropatici è solitamente causata da una carenza di eritropoietina, ma possono essere presenti altre cause, quali perdite ematiche, carenza di ferro, scarso apporto di nutrienti, perdita di ferro e transferrina attraverso le urine. I nostri pazienti con una nefropatia proteino-disperdente hanno mostrato valori mediani di ferro di 81 µg/dl (range 14-341 µg/dl) e di transferrina, espressa come *Total Iron Binding Capacity* (TIBC), di 260 µg/dl (range 74-629 µg/dl), entrambi all'interno dell'intervallo di riferimento (IR-Fe 50-230 µg/dl; IR-TIBC 240-440 µg/dl), anche se vicini al limite inferiore.

L'ipoalbuminemia (albumina ≤ 2.5 g/dl) era presente nel 57,2% dei casi, una percentuale minore rispetto a quanto presente in altri studi, con un valore mediano di 2,35 g/dl (range 0,74-4,29 g/dl), più elevato rispetto a studi precedenti (Cook e Cowgill, 1996; Center et al., 1987; Klosterman et al., 2011).

In Medicina Umana, in corso di nefropatie proteino-disperdenti, l'ipoalbuminemia non è causata solamente dalla perdita renale e la quantità di albumina urinaria non si correla con le albumine sieriche. Molti pazienti mantengono concentrazioni normali di albumine sieriche nonostante gravi proteinurie, ed è riconosciuto che tali pazienti sono a rischio minore di sviluppo di complicazioni presenti nella sindrome nefrosica (Charlesworth et al., 2008). Nel nostro studio è stata rilevata una correlazione altamente significativa tra UPC e albumina sierica e UPC e proteine totali: all'aumentare della proteinuria si aggrava l'ipoprotidemia e l'ipoalbuminemia, questo potrebbe indicare una perdita di selettività in corso di gravi proteinurie.

Inoltre abbiamo riscontrato una correlazione negativa altamente significativa tra l'albumina sierica e quella urinaria. A nostra conoscenza questo tipo di dato, seppur atteso, non era ancora presente nella Letteratura Veterinaria.

In Medicina Umana con valori di UPC > di 3.5 si parla di proteinuria nefrosica. In Medicina Veterinaria non è ancora stato stabilito un *cut-off* di proteinuria al di sopra del quale si può parlare di sindrome nefrosica.

Nel nostro studio, la mediana di UPC è stata di 4,9 (range 2-40,1), quindi verosimilmente, seguendo le linee guida della Medicina Umana, il 65% delle nostre proteinurie si trovava nel range nefrosico.

Suddividendo la nostra popolazione in pazienti con $UPC \geq 3.5$ e < 3.5 e andando a confrontare le alterazioni che caratterizzano la sindrome nefrosica e gli elettroliti sono state riscontrate alcune differenze significative: pazienti con $UPC \geq$ di 3.5 presentano concentrazioni di albumine, di ematocrito, di TIBC, di calcio, significativamente minori rispetto a quelli che hanno proteinuria minore di 3.5, concentrazioni di CRP, di urea e di fosforo significativamente maggiori. Una più grave anemia nei pazienti maggiormente proteinurici potrebbe essere indicativa di una nefropatia cronica o di una maggiore infiammazione, quest'ultima ipotesi avvalorata da una CRP significativamente maggiore in questo gruppo. Risultati simili sono stati riscontrati in un recente studio in cui la CRP si è mostrata significativamente più alta nei cani con malattia renale rispetto ai controlli sani e valori mediani maggiori sono stati misurati in cani con proteinuria più grave ($UPC >2$) e uremia (Raila et al., 2011).

Una calcemia significativamente minore nei pazienti con $UPC \geq 3.5$ potrebbe essere legata all'ipoalbuminemia, infatti nel nostro studio abbiamo ottenuto una correlazione altamente significativa ($p < 0,0001$) tra calcio e albumina, diversamente da Klosterman e coll (2011), in cui era presente una correlazione moderata.

Nessuna differenza tra i gruppi per quanto riguarda le concentrazioni di creatinina, colesterolo, trigliceridi ferro totale, sodio, potassio, cloro e pressione sistolica. Quest'ultima, misurata in 110 soggetti totali, ha mostrato una mediana di 167 mmHg (range 100-246 mmHg). Questo valore rientra nella categoria III di rischio di danno ipertensivo, ovvero rischio moderato secondo il Consensus statement dell'American College of Veterinary Internal Medicine (ACVIM) relativo all'ipertensione arteriosa nel cane e nel gatto. I principali organi a rischio sono l'occhio, il rene, il sistema nervoso centrale e il sistema cardiovascolare (Brown et al, 2007). I nostri pazienti con proteinuria grave, quindi, indipendentemente dal *cut-off* di 3.5, sono risultati essere frequentemente ipertesi.

Concentrazioni di urea e fosforo, ma non di creatinina più elevate nei pazienti con $UPC \geq 3.5$ potrebbero essere indicative di un maggior catabolismo proteico in questi pazienti.

La suddivisione dei pazienti in base alla concentrazione di albumina ha permesso di mettere in evidenza come cani maggiormente ipoalbuminemici siano anche maggiormente iperazotemici e abbiano valori inferiori di ematocrito, proteine totali, colesterolo, Ferro, TIBC e piastrine.

Una più grave ipoalbuminemia associata ad elevati livelli di creatinina e urea potrebbe essere indice di uno stato infiammatorio più grave in pazienti in cui la nefropatia è progredita verso l'iperazotemia e l'uremia, infatti in questi pazienti anche la transferrina è minore.

In corso di uremia, inoltre, può essere presente una ipoalbuminemia a seguito di una diminuzione dell'appetito, di stati di cachessia, e a causa di una maggiore perdita di albumine, ad esempio, attraverso l'apparato gastroenterico (stomatiti, gastroenterite uremica).

Una carenza di ferro può derivare da una insufficiente assunzione con la dieta, inadeguato assorbimento intestinale e perdite croniche. Il fatto che pazienti maggiormente ipoalbuminemici, abbiano una minore concentrazione di ferro, insieme ad una diminuita concentrazione di colesterolo, potrebbe far pensare, ad esempio, ad una perdita intestinale di questi fattori, legata a patologie del tratto gastrointestinale che causano malassorbimento (es. *Inflammatory Bowel Disease*). Una patologia intestinale concomitante potrebbe spiegare anche una concentrazione mediana di colesterolo all'interno dell'intervallo di riferimento.

Un diminuito numero di piastrine nei pazienti ipoalbuminemici potrebbe essere spiegato da una perdita di sangue, dalla coagulazione intravasale disseminata o dalla presenza di una malattia infettiva sottostante che oltre all'ipoalbuminemia dia anche trombocitopenia come l'Ehrlichiosi, la Leishmaniosi, la Leptospirosi. Un'altra causa potrebbe essere l'emodiluizione, infatti alcuni pazienti reclutati in questo studio sono stati ospedalizzati e sottoposti a somministrazione di fluidi.

Pazienti con un peso specifico urinario inadeguato (<1030) presentavano concentrazioni di creatinina, urea e valori di UPC maggiori rispetto a quelli con un peso specifico > 1030 a seguito, verosimilmente, della presenza di nefropatia cronica. Il rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria non viene influenzato dal peso specifico, infatti si è mostrato elevato in entrambi i gruppi senza differenze significative.

Nei nostri pazienti la mediana di peso specifico è stata di 1018 (range 1002-1064). Questo dato è in linea con studi precedenti (Center et al., 1987; Cook e Cowgill, 1996; Klosterman et al., 2011). Il mantenimento di una parziale capacità di concentrare le urine potrebbe essere legato al cosiddetto "disequilibrio tubulo-glomerulare" che si verifica quando il danno tubulare non è così grave come quello glomerulare.

Un risultato interessante si è ottenuto suddividendo i pazienti in base al sedimento "attivo" o "spento", infatti la presenza di un sedimento "attivo" non va ad influenzare né l'UPC né l'UAC, probabilmente a causa del fatto che si tratta di proteinurie molto elevate.

I pazienti con sedimento "attivo", invece, presentano valori di creatinina e di urea significativamente maggiori rispetto a quelli che hanno un sedimento "spento". La spiegazione potrebbe essere duplice: da un lato la presenza di una infezione urinaria potrebbe causare una

pielonefrite con un peggioramento della funzionalità renale, dall'altro l'iperazotemia riflette una progressione della nefropatia con comparsa di incapacità a concentrare le urine e di conseguenza una maggiore suscettibilità alle infezioni.

Nel nostro studio è stata riscontrata una correlazione significativa tra albumina e antitrombina, diversamente da quanto riscontrato da Klosterman e coll. (2011), ma in accordo con Cook e Cowgill (1986).

Questa correlazione, associata alla correlazione significativa tra l'UPC e albumina sierica e UPC e antitrombina avvalorata l'ipotesi della perdita di antitrombina con le urine e potrebbe confermare, come già affermato in Letteratura, che animali con albumine ≤ 2.0 g/dl sono ad elevato rischio di trombosi.

La percentuale di attività dell'antitrombina è stata nell'86% dei pazienti inferiore a 105% (limite inferiore del nostro laboratorio) (mediana 77%, range 25-149%). Solo l'8% presentava una percentuale di AT $<50\%$, considerata ad elevato rischio di trombosi in Medicina Veterinaria (Green, 1988) e il 45% aveva una percentuale di AT $<75\%$, considerata in Medicina Umana, insieme ad una concentrazione di albumine inferiore a 2.0 g/dl, ad una proteinuria maggiore di 10g/24 e ad elevati livelli di fibrinogeno ad elevato rischio trombotico (Charlesworth et al., 2008).

L'utilizzo di un rapporto fibrinogeno/antitrombina è stato suggerito da Green e Kabel (1982) per determinare un indice di trombosi in Medicina Veterinaria ed in particolare cani con valori di fibrinogeno superiori a 300 mg/dl e di attività dell'antitrombina inferiore al 70% rappresenterebbero dei candidati per una terapia anticoagulante.

Le complicazioni tromboemboliche sono associate in Medicina Umana alle glomerulopatie e alla sindrome nefrosica, in quanto è spesso presente uno stato di ipercoagulabilità. Come detto in precedenza la prevalenza di tali complicazioni non è ben conosciuta in Medicina Veterinaria e gli studi riguardanti le alterazioni emostatiche in corso di sindrome nefrosica sono limitati.

E' stato riportato l'aumento dei fattori V, VII, VIII, X, del fibrinogeno e della proteina C, e la diminuzione dell'attivatore del plasminogeno e dei livelli di plasminogeno, la diminuzione dell'AT III, l'aumento dell'aggregabilità piastrinica (Green e Kabel, 1982; Abdullah, 1988; Cook e Cowgill, 1996).

Nel presente studio, oltre all'antitrombina, quali indicatori di tendenza all'ipercoagulabilità, sono stati valutati il fibrinogeno, i D-Dimeri e la trombocitosi.

Il fibrinogeno era al di sopra del limite superiore dell'intervallo di riferimento nell'80% dei pazienti, ma il fibrinogeno, essendo una proteina di fase acuta positiva, aumenta in corso di patologie infiammatorie, e, come evidenziato nei risultati, il 30% dei pazienti in cui era stata diagnosticata una malattia concomitante presentava patologie infiammatorio-infettive.

Alcuni Autori (Stokol, 2003; Nelson e Andreasen, 2003), hanno mostrato che la sensibilità e la specificità dei D-dimeri nel diagnosticare una malattia tromboembolica nei cani sono rispettivamente 100% e 90%. In uno studio di Caldin e coll. (1997), usando un *cut-off* di 0,25 µg/ml, i D-Dimeri hanno mostrato avere una sensibilità dell'82% nella diagnosi precoce di CID, quindi nello stato di ipercoagulabilità.

Nei cani analizzati in questo studio la mediana dei D-dimeri è risultata uguale al nostro limite di riferimento superiore, 0,26 µg/dl (range 0,01-8,84 µg/ml).

I D-dimeri hanno mostrato correlazione significativa positiva con la CRP, i leucociti totali e i neutrofili, questo dato sarebbe da indagare con altri studi e con un numero maggiore di pazienti, in quanto i D-dimeri potrebbero rappresentare un marker infiammatorio, oltre che di alterazione della coagulazione, o potrebbero essere un *link* tra i due processi.

In un recente studio, riguardante le alterazioni emostatiche in corso di endotossiemia indotta sperimentalmente in 5 cani, i D-dimeri sono risultati essere il più precoce indicatore di anormalità della coagulazione endotossiemia-associate (Eralp et al., 2011).

La correlazione significativa negativa tra antitrombina e D-dimeri avvalorava l'ipotesi di una tendenza all'ipercoagulabilità in corso di nefropatie proteino-disperdenti, in quanto al diminuire dell'AT III, persa con le urine, i D-dimeri aumentano.

Il 19% dei pazienti presentava una trombocitosi ($PLT/mm^3 >500.000$), il 20% una trombocitopenia, con una mediana di 308.000 plt/mm^3 (range 1220-1182000 plt/mm^3).

Erano presenti prolungamenti dei tempi di coagulazione PT e aPTT rispettivamente nel 33% e nel 25% dei casi.

Nel presente studio sono presenti diversi elementi a favore di una aumentata tendenza all'ipercoagulabilità (D-dimeri, fibrinogeno, antitrombina) nei pazienti con proteinurie elevate, ma si riconoscono alcuni limiti, in quanto i D-dimeri e l'Antitrombina erano presenti solamente nella metà dei pazienti e sarebbero state necessarie idealmente altre metodiche diagnostiche per confermare la trombofilia in corso di sindrome nefrosica, quali ad esempio la tromboelastografia, in grado di valutare l'intero asse coagulativo e la funzionalità piastrinica.

Nel presente lavoro, l'edema è stato riscontrato solo nel 4% dei pazienti, questo rappresenta un grosso limite, in quanto non in tutte le cartelle cliniche analizzate erano riportati i sintomi.

Non siamo, quindi, in grado di definire la reale prevalenza di questa complicazione nella nostra popolazione.

Come in studi precedenti (Klosterman et al., 2011), non abbiamo trovato correlazione tra ipernatremia e sindrome nefrosica, in più, nel nostro lavoro la mediana di sodio si è mantenuta entro gli intervalli di riferimento (146 mEq/l, range 143-154 mEq/l).

Non abbiamo riscontrato alcuna correlazione tra le concentrazioni sieriche di albumina e quelle di sodio e ciò potrebbe essere un dato contro la teoria "underfill" la quale prevede che una ipoalbuminemia seguita da una diminuzione della pressione oncotica provocherebbe una ritenzione di sodio (Rondon-Berrios, 2011).

D'altro canto non è stata trovata nessuna significatività tra la proteinuria e il sodio, come invece prevederebbe la teoria "overfill" che afferma che la ritenzione di sodio sia legata, non all'ipoalbuminemia, ma ad un danno primariamente renale e alla perdita di proteine, in particolare alla perdita di plasminogeno attraverso le urine (Svenningsen et al., 2009). Nel nostro studio non è stata misurata la concentrazione di plasminogeno.

Nel nostro studio è stata riscontrata una correlazione positiva significativa tra il colesterolo e i trigliceridi.

L'ipertrigliceridemia non è un'alterazione clinicopatologica caratteristica della sindrome nefrosica e in Medicina Umana può accompagnare l'ipercolesterolemia. L'iperlipidemia può alterare la funzionalità renale e contribuire alla progressione verso la comparsa di insufficienza renale cronica e al peggioramento della proteinuria (Buemi et al., 2005).

La mediana del colesterolo (302 mg/dl, range 103-897 mg/dl) e quella dei trigliceridi (78 mg/dl, range 28-771mg/dl) si sono mantenute entro gli intervalli di riferimento nei nostri pazienti e non ci sono state differenze nella concentrazione di questi due parametri comparando i gruppi con $UPC \geq 0 < 3.5$, a differenza di quanto avvenuto dello studio di Klosterman e coll. (2011), in cui i pazienti con sindrome nefrosica presentavano concentrazione di colesterolo, ma non di trigliceridi, significativamente maggiore.

E' stata riscontrata una correlazione positiva significativa tra l'aumento dei trigliceridi e l'iperazotemia, ma non tra il colesterolo e l'iperazotemia.

Nessuna correlazione, invece, tra ipercolesterolemia e ipertrigliceridemia e UPC.

La patogenesi della iperlipidemia non è del tutto chiarita, tra le possibili cause si pensa ad una diminuita pressione oncotica che stimolerebbe il fegato ad aumentare la produzione di lipoproteine che legano il colesterolo (de Seigneux e Martin, 2009).

Diversamente da Cook e Cowgill (1996), abbiamo riscontrato una correlazione positiva significativa dell'albumina sierica con il colesterolo, il che potrebbe avvalorare l'ipotesi che non tutte le alterazioni clinicopatologiche in corso di sindrome nefrosica siano da ricondurre all'ipoalbuminemia. Questo risultato meriterebbe ulteriori approfondimenti in studi futuri.

Il colesterolo si è correlato positivamente ed in maniera statisticamente significativa al fibrinogeno e alle piastrine, il che potrebbe favorire fenomeni trombotici e aterosclerotici, questi ultimi soprattutto ben riconosciuti in Medicina Umana.

In Medicina Veterinaria la prevalenza e l'impatto dell'aterosclerosi sono poco conosciuti, e, ad oggi, non sono state riportate complicazioni vascolari associate all'iperlipidemia.

La presenza nella nostra popolazione di patologie sistemiche che possono avere causato la nefropatia proteino-disperdente è stata diagnosticata nel 61% dei casi.

La malattia diagnosticata più di frequente nella nostra realtà è stata la Leishmaniosi, seguita da processi infiammatori/degenerativi quali ad esempio pancreatite, ipercortisolismo e neoplasie. Indipendentemente dal loro potenziale contributo nella patogenesi del danno glomerulare, spesso sono queste malattie ad influenzare il quadro clinico e l'outcome dei pazienti e spesso andando a trattare questi processi sottostanti si può ottenere un miglioramento della proteinuria, anche se spesso purtroppo la prognosi di questi pazienti è sfavorevole.

I limiti maggiori di questo studio sono quelli di non avere avuto a disposizione una diagnosi istologica che potesse confermare che gli animali selezionati avessero effettivamente una patologia glomerulare. Scegliendo un *cut-off* di 2 quale rapporto proteine totali/creatinina urinaria, la possibilità di errore diminuisce, ma non possiamo escludere che alcuni animali avessero una proteinuria tubulare, infatti non abbiamo effettuato una distinzione tra pazienti con patologia cronica e quelli acuti. Inoltre, sarebbe stato utile associare l'istologia alla gravità della proteinuria, come accade in Medicina Umana, in cui la patologia glomerulare influenza l'entità della perdita proteica e anche la prognosi.

L'altro limite è quello legato al fatto di essere uno studio retrospettivo e quindi non tutti i parametri erano presenti in tutti gli animali, inoltre non in tutti erano riportati i segni clinici che sarebbero stati utili nella diagnostica della sindrome nefrosica. Solo in pochi pazienti sono

riportanti edemi, così come i sintomi riferibili a fenomeni trombotici (es. dispnea, alterazioni del polso femorale).

A favore del nostro studio c'è sicuramente un'ampia casistica che ha contribuito a delineare quelle che sono le alterazioni clinicopatologiche che, in Medicina Veterinaria, accompagnano le glomerulopatie proteino-disperdenti e ad avvalorare l'ipotesi che forse non tutte le complicazioni derivano dall'ipoalbuminemia come ad esempio l'ipercolesterolemia e la presenza di edemi.

I pazienti con proteinurie più elevate ($UPC \geq 3.5$) si trovano verosimilmente in uno "stato infiammatorio" maggiore rispetto a quelli che presentano proteinurie minori ($UPC < 3.5$), questa ipotesi avvalorata dalle concentrazioni minori di albumina, di transferrina e da una concentrazione di CRP maggiore. Inoltre i pazienti con $UPC \geq 3.5$ non presentano concentrazioni di creatinina più elevate ma sono maggiormente a rischio di anemia.

Sarebbero necessari ulteriori studi per meglio caratterizzare lo stato infiammatorio di soggetti proteinurici e per individuare altri marker prognostici, quali ad esempio l'utilizzo della CRP, nei pazienti con glomerulopatie proteino-disperdenti.

BIBLIOGRAFIA

1. Abdullah R. Hemostatic abnormalities in nephrotic syndrome. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 18(1):105-112, 1988;
2. Alpers C.E. The Kidney. In: Kumar V., Abbas A.K., Fausto N., Aster J.C. *Robbins and Cotran-Pathologic Basis of Disease, Eight Edition*. Philadelphia, USA, Saunders-Elsevier, 905-969, 2010;
3. Appel G.B.- Improved outcomes in nephrotic syndrome. *Cleveland Clinic Journal of Medicine*, 73(2):161-167, 2006;
4. Bagga A. e Mantan M.- Nephrotic syndrome in children. *Indian Journal of Medical Research*, 122:13-28, 2005;
5. Biewenga W.J.- Proteinuria in the dog: a clinic pathological study in 51 proteinuric dogs. *Research in Veterinary Science*, 41:257-264, 1986;
6. Biewenga W.J., Gruys E., Henriks H.J.- Urinary protein loss in the dog: Nephrological study of 29 dogs without signs of renal disease. *Research in Veterinary Science*, 33:366-374, 1982;
7. Brown S.A., Atkins C., Bagley R. et al.- Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3): 542-58, 2007;
8. Buemi M., Nostro L., Crascì E. et al.- Statins in nephrotic syndrome: a new weapon against tissue injury. *Medical Research Reviews*, 25(6):587-609, 2005;
9. Caldin M., Furlanello T., Berto D., et al.- Preliminary investigations of D-dimeri concentrations in normal dogs and in dogs with disseminated intravascular coagulation (DIC) (abstract). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 11(2): 130, 1997;
10. Carter A.J. e Van Heerden J.- Aortic thrombosis in a dog with glomerulonephritis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 65:189-192, 1994;
11. Center S.A., Smith C.A., Wilkinson E. et al.- Clinicopathologic, renal immunofluorescent, and light microscopic features of glomerulonephritis in the dog:41 cases (1975-1985). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 190(1):88-90, 1987;

12. Charlesworth J.A., Gracey D.M., Pussell B.A.- Adult nephrotic syndrome: non specific strategies for treatment. *Nephrology*, 23:45-50, 2008;
13. Clements C.A., Rogers K.S., Green R.A. et al.- Splenic vein thrombosis resulting in acute anemia: an usual manifestation of nephritic syndrome in a Chinese shar pei with reactive amyloidosis. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 31:411-415, 1995;
14. Cook A.K. e Cowgill L.D.- Clinical and pathological features of protein-losing glomerular disease in the dog: A review of 137 cases (1985–1992). *Journal of the American Animal Hospital Association*, 32:313–322, 1996;
15. de Seigneux S. e Martin P.Y.- Management of patients with nephrotic syndrome. *Swiss Medical Weekly*, 139:416-422, 2009;
16. DiBartola S.P., Spaulding G.L., Chew D.J. et al.- Urinary protein excretion and immunopathologic findings in dogs with glomerular disease. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 177(1):73-77, 1980;
17. DiBartola S.P., Tarr M.J., Parker A.T., et al: Clinicopathologic findings in dogs with renal amyloidosis: 59 cases (1976-1986). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 195:358-364, 1989;
18. DiBartola S.P., Tarr M.J., Webb D.M. et al: Familial renal amyloidosis in Chinese Shar-Pei dogs. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 197:483-487, 1990;
19. Eberst M.E. e Berkowitz L.R.- Hemostatis in renal disease: pathophysiology and management. *American Journal of Medicine*, 96:168-179, 1994;
20. Eralp O., Yilmaz Z., Failing K. et al.- Effect of experimental endotoxemia on thromboelastography parameters, secondary and tertiary hemostasis in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24(3): 524-531, 2011;
21. Feehally J. e Johnson R.J. Introduction to Glomerular Disease: Clinical Presentations. In: Johnson R.J. e Feehally J. *Comprehensive Clinical Nephrology*, 2nd Edition. Mosby-Elsevier, 255-269, 2003;
22. Gerber B., Haugh K., Heichenberger S et al.- Follow-up of Bernese Mountain dogs and other dogs with serologically diagnosed *Borrelia burgdorferi* infection: What happens to seropositive animals? *BMC Veterinary Research*, 5:18, 2009;
23. Grauer G.F. Proteinuria: measurement and interpretation. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3): 121-127, 2011;
24. Grauer G.F., Frisbie D.D., Snyder P.S. et al.- Treatment of membranoproliferative glomerulonephritis and nephrotic syndrome in a dog with a thromboxane synthetase inhibitor. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 6(2):77-81, 1992;

25. Green R.A. e Kabel A.L.- Hypercoagulable state in three dogs with nephrotic syndrome: role of Acquired antithrombin III deficiency. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 181(9):914-917, 1982;
26. Green R.A.- Pathophysiology of antithrombin III deficiency. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 18(1):95-104, 1988;
27. Green RA, Russo EA, Greene RT, et al. Hypoalbuminemia related platelet hypersensitivity in two dogs with nephrotic syndrome. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 186:485–488, 1985;
28. Hood J.C., Huxtable C., Naito I. et al.- A novel model of autosomal dominant Alport syndrome in Dalmatian dogs. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association – European Renal Association*, 17:2094-2098, 2002;
29. Hood J.C., Savige J., Hendtlass A., et al.- Bull terrier hereditary nephritis: a model for autosomal dominant Alport syndrome. *Kidney International*, 47:758-765, 1995;
30. Hull R.P. e Goldsmith D.J.A.- Nephrotic syndrome in adults. *BMJ British Medical Journal*, 336:1185-1189, 2008;
31. Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A. et al.- Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226:393-400, 2005;
32. Jaenke R. e Allen T.- Membranous nephropathy in the dog. *Veterinary Pathology*, 23(6):718-733, 1986;
33. Kayali F., Najjar R., Matta F. et al.- Venous thromboembolism in patients hospitalized with nephrotic syndrome. *The American Journal of Medicine*, 121(3):226-230, 2008;
34. Klosterman E.S. e Pressler B.M.- Nephrotic syndrome in dogs: clinical features evidence-based treatment consideration. *Topics in Companion Animal Medicine*, 26(3):135-142, 2011;
35. Klosterman E.S., Moore G.E., de Brito Galvao J.F., et al.- Comparison of Signalment, Clinicopathologic Findings, Histologic Diagnosis, and Prognosis in Dogs with Glomerular Disease with or without Nephrotic Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 25:206–214, 2011;
36. Kodner C.- Nephrotic syndrome in adults: diagnosis and management. *American Family Physician*, 80:1129-1134, 2009;
37. Koeman J.P., Biewenga W.J., Gruys E.- Proteinuria in the dog: a pathomorphological study of 51 proteinuric dogs. *Research in Veterinary Science*, 43:367-378, 1987;

38. Lees G.E., Brown S.A., Elliott J. et al.- Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement (Small Animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19:377-385, 2005;
39. Lees G.E., Helman R.G., Kashtan C.E. et al.- A model of autosomal recessive Alport syndrome in English cocker spaniel dogs. *Kidney International*, 54:706-719, 1998;
40. Lees G.E., Helman R.G., Kashtan C.E. et al., New form of X-linked dominant hereditary nephritis in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 60:373-383, 1999;
41. Lewis R.J.- Canine glomerulonephritis: results from a microscopic evaluation of fifty cases. *Canadian Veterinary Journal*, 17:171-176, 1976;
42. MacDougall D.F., Cook T., Steward A.P., et al.- Canine chronic renal disease: prevalence and types of glomerulonephritis in the dog. *Kidney International*, 29:1144-1151, 1986;
43. Mahmoodi B.K., ten Kate M.K., Waanders F. et al.- High absolute risks and predictors of venous and arterial thromboembolic events in patients with nephrotic syndrome: Results from a large retrospective cohort study. *Circulation*, 117:224-230, 2008;
44. Mason N.J. e Day M.J: Renal amyloidosis in related English foxhounds. *Journal of Small Animal Practice*, 37:255-260, 1996;
45. Miyauchi Y., Nakayama H., Uchida K.- Glomerulopathy with IgA deposition in the dog. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54:969-975, 1992;
46. Muller-Peddinghaus R. e Trautwein G.- Spontaneous GN in dogs. 1. Classification and Immunopathology. *Veterinary Pathology*, 14:1-13, 1977;
47. Nelson O.L., Andreasen C.- The utility of plasma D-dimer to identify thromboembolic disease in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17: 830-834, 2003.
48. Orth S.R. e Ritz E.- The nephrotic syndrome. *The New England Journal of Medicine*, 338:1202-1210, 1998;
49. Pras M.- Familial Mediterranean fever: from the clinical syndrome to the cloning of the pyrin gene. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 27:92-97, 1998;
50. Pressler B. Nephrotic Syndrome. In: Bartges J. e Polzin D.J. *Nephrology and Urology of Small Animals*. Chichester, West Sussex, UK, Wiley-Blackwell, 415-421, 2011;
51. Pressler B.M. e Vaden S.L. Managing renal amyloidosis in dogs and cats. *Veterinary Medicine*, 98:320-333, 2003;
52. Raila J., Schweigert F.J., Kohn B.- C-Reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23(4):710-715, 2011;

53. Relford R.L. e Lees G.E.- Nephrotic syndrome in dogs: diagnosis and treatment. *Compendium on Continuing Education for the practicing veterinarian*, 18(3):279-292, 1996;
54. Ritt M.G., Rogers K.S., Thomas J.S.- Nephrotic Syndrome resulting in thromboembolic disease and disseminated intravascular coagulation in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 33: 385-391, 1997.
55. Rodriguez-Iturbe B., Herrera-Acosta J., Johnson R.J.- Interstitial inflammation, sodium retention, and pathogenesis of nephrotic edema: a unifying hypothesis. *Kidney International*, 62:1379-1384, 2002;
56. Rondon-Berrios H.- New insights into the pathophysiology of oedema in nephrotic syndrome. *Nefrologia*, 31(2):148-154, 2011;
57. Schrier R.W. e Fassett R.G.- A critique of the overfill hypothesis of sodium and water retention in the nephrotic syndrome. *Kidney International*, 53:1111-1117, 1998;
58. Singhal R. e Brimble K.S.- Thromboembolic complications in the nephritic syndrome: pathophysiology and clinical management. *Thrombosis Research*, 118:397-407, 2006;
59. Slauson DO, Gribble DH.- Thrombosis complicating renal amyloidosis in dogs. *Veterinary Pathology*, 8:352-363, 1971;
60. Stokol T.- Plasma D-dimer for the diagnosis of thromboembolic disorders in dogs. *Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice*. 33: 1419-1435, 2003;
61. Svenningsen P., Bistrup C., Friis U.G. et al.- Plasmin in nephrotic urine activates the epithelial sodium channel. *Journal of the American Society of Nephrology*, 20:299-310, 2009;
62. Vaden S.L. e Brown C.A. Glomerular Disease. In: Bonagura J.D. e Twedt D.C. *Kirk's Current Veterinary Therapy XIV*. St Louise, Missouri, USA, Saunders-Elsevier, 863-868, 2009;
63. Vaden S.L. e Grauer G.F. Glomerular Disease. In: Bartges J. e Polzin D.J. *Nephrology and Urology of Small Animals*. Chichester, West Sussex, UK, Wiley-Blackwell, 538-546, 2011;
64. Vaden S.L. Glomerular Disease. In: Ettinger S.J. e Feldman E.C. *Textbook of Veterinary Internal Medicine, Seventh Edition*. St Louise, Missouri, USA, Saunders-Elsevier, 2021-2036, 2010;
65. Van den Berg J.G. e Weening J.J.- Role of the immune system in the pathogenesis of idiopathic nephrotic syndrome. *Clinical Science*, 107:125-136, 2004;

66. Vasilopoulos R.J., Lavergne S.N., Trepanier L.A.- Nephrotic syndrome associated with administration of sulfadimethoxine/ormetoprim in a doberman. *Journal of Small Animal Practice*, 46:232-236, 2005;
67. Vilafranca M., Wohlsein P., Leopold-Temmler B., et al.- A canine nephropathy resembling minimal change nephrotic syndrome in man. *Journal of Comparative Pathology*. 109:271-280, 1993;
68. Vilafranca M., Wohlsein P., Trautwein G. et al.- Histological and immunohistological classification of canine glomerular disease. *Journal of Veterinary Medicine*, 41:599-610, 1994;
69. Wehner A., Hartmann K., Hirschberger J.- Association between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal disease. *The Veterinary Record*, 162:141-147, 2008;
70. Zaffanello M., Brugnara M., Fanos V., et al.- Prophylaxis with AT III for thromboembolism in nephritic syndrome: why should it be done? *International Urology and Nephrology*, 41:713–716, 2009.