

DOTTORATO DI RICERCA

in

Scienze Cliniche Veterinarie

Ciclo XXV

Settore concorsuale: 07/H4 Clinica Medica e Farmacologia Veterinaria

Settore Scientifico disciplinare: VET/08 Clinica Medica Veterinaria

TITOLO TESI

Valutazione della proteinuria e del follow-up clinico e clinicopatologico in cani affetti da Leishmaniosi canina.

Presentata da: **Dott.ssa Russo Samanta**

Coordinatore Dottorato

Prof. Paolo Famigli Bergamini

Relatore

Dott. Francesco Dondi

Sommario

1. Cenni di epidemiologia e patogenesi della Leishmaniosi.....	4
2. Danno renale: pattern istopatologici.....	12
2.1 Revisione della letteratura veterinaria.....	12
2.2 Case reports.....	17
2.3 Focus sulla letteratura umana.....	20
2.4 Case reports.....	21
3. Pattern istopatologici di danno glomerulare.....	22
4. Danno renale: rilievi clinico-patologici.....	30
4.1 Revisione della letteratura veterinaria.....	30
4.2 Revisione della letteratura umana.....	38
5. La proteinuria.....	43
6. Presentazione clinica dei cani con CanL.....	55
7. Diagnosi della CanL.....	56
8. Trattamento della CanL.....	57
9. Prognosi e monitoraggio.....	61
10. Obiettivi.....	65
11. Materiali e Metodi.....	66
12. RISULTATI.....	88
13. DISCUSSIONE.....	140
14. Bibliografia.....	151

Introduzione

La leishmaniosi canina (CanL) è una malattia infettiva, trasmessa da vettore e sostenuta da un protozoo, la *Leishmania infantum*. La CanL ha assunto sempre più importanza sia in medicina veterinaria che in medicina umana, ed è per tale ragione oggetto di numerosi studi in entrambe le discipline. Il medico veterinario svolge un ruolo fondamentale non solo nella corretta gestione del paziente malato, ma anche nella gestione dei pazienti infetti non malati, nella corretta informazione della popolazione con notevoli ripercussioni per la sanità pubblica. In quest'ultimo caso è essenziale il lavoro sinergico con il medico umano.

I cani che manifestano la malattia clinica hanno spesso un coinvolgimento multiorganico, legato ad una reazione eccessiva e scorretta del sistema immunitario, con danno da immunocomplessi a livello oculare, articolare, cutaneo, ma soprattutto renale.

L'obiettivo di questa tesi è stato quello di valutare le alterazioni clinicopatologiche preponderanti nella popolazione di studio, individuare quali possono essere i fattori di rischio per l'instaurarsi di una malattia renale cronica, per la sua progressione e per l'evento morte.

Per fare questo sono stati selezionati 167 cani affetti da CanL sottoposti a terapia leishmanicida, per un totale di 187 casi trattati, questo perché 17 pazienti hanno avuto una o più recidive e sono stati considerati come nuovi casi. Di tali soggetti sono stati raccolti i dati clinici e clinicopatologici partendo dal momento dell'ammissione per arrivare alla fine del periodo di inclusione di circa due anni. I risultati di questo studio evidenziano come le alterazioni più frequenti siano anemia normocitica normocromica, iperprotidemia con ipoalbuminemia e riduzione del rapporto albumine/globuline, iperazotemia con peso specifico inadeguato.

La Leishmaniosi e il danno renale

La Leishmaniosi è una malattia protozoaria trasmessa da vettore, sostenuta da parassiti del genere *Leishmania* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) che colpisce l'uomo e gli animali domestici e selvatici, diffusa in tutti i continenti, eccezion fatta per l'Oceania (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (Dantas-Torres F., 2012). Nell'uomo è possibile suddividerla in tre principali sindromi cliniche: cutanea, mucosale (o mucocutanea) e viscerale (Fig.1) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). In medicina umana quest'ultima presentazione prende anche il nome di *Kala-azar*, termine indiano che significa "febbre nera", definizione che deriva dal colorito assunto dalla cute di alcuni dei pazienti infetti e malati.

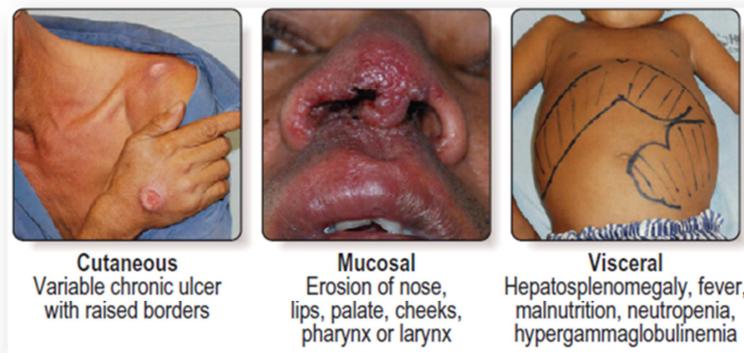


Figura 1 modificata da (Jeronimo S.M.B., 2011). Nell'immagine alcuni esempi di manifestazioni cliniche di Leishmaniosi nell'uomo.

Nel cane questa suddivisione è esclusivamente accademica, nella pratica clinica, infatti, la stragrande maggioranza dei pazienti si presenta con un coinvolgimento sia cutaneo che viscerale (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012).

Tale malattia riveste un ruolo importante in campo nefrologico perché causa nefropatie croniche caratterizzate da glomerulonefriti, su base primariamente immunomediata con caratteristiche istopatologiche differenti, e tubulo-interstiziopatie a carattere principalmente infiammatorio (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012).

1. Cenni di epidemiologia e patogenesi della Leishmaniosi

La *Leishmania* spp. è un protozoo difasico del genere *Leishmania* che, per completare il ciclo biologico (fig.2), richiede un vettore, del genere *Phlebotomus* nel vecchio mondo e *Lutzomyia* nel nuovo mondo, e di un ospite vertebrato.

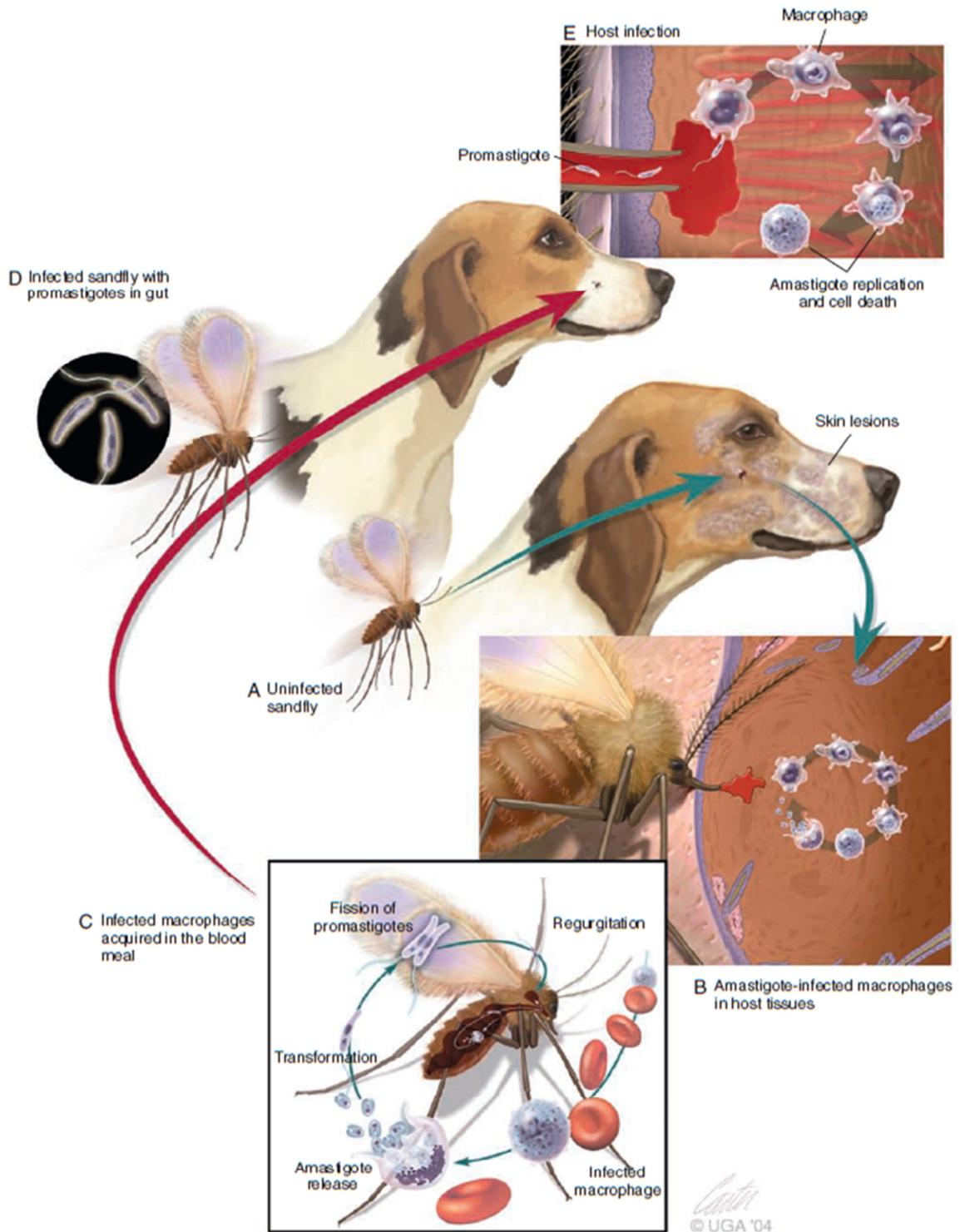


Figura 2 modificata (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) Nell'immagine il ciclo biologico della *Leishmania infantum*. (A) Il flebotomo non infetto esegue il pasto su un ospite canino infetto, con il pasto ingerisce macrofagi contenenti il protozoo nella forma aflagellata di amastigote (B). Gli amastigoti sono rilasciati dai macrofagi nell'apparato digerente del vettore, dove assumono la forma flagellata di promastigoti (C). In questa sede inizia la loro replicazione. I promastigoti migrano attraverso il sistema digerente fino all'apparato masticatore del vettore, dove si localizzano, così che con il pasto successivo, possano essere inoculati con la saliva nella cute dell'ospite vertebrato (Jeronimo S.M.B., 2011). Questi vengono poi fagocitati dai neutrofili (Kaye P. and Scott P., 2011) (Laskay T., 2003) e dai macrofagi dell'ospite, al loro interno perdono il flagello, tornando alla forma amastigote (D) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). Nel citoplasma di queste cellule iniziano a replicare per fissione binaria. In seguito alla morte dei macrofagi gli amastigoti vanno ad infettare altri macrofagi e con essi tramite il circolo ematico si diffondono principalmente agli organi emolinfopoietici, quali fegato, milza, linfonodi e midollo osseo, ed anche alcune aree della cute, stabilendo un'infezione di natura sistemica. Altri flebotomi assumeranno gli amastigoti con il pasto di sangue infetto (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (Jeronimo S.M.B., 2011).

A seconda della specie di *Leishmania* spp. l'ospite finale può essere l'uomo, il cane oppure entrambi. In zone endemiche con un'elevata carica parassitaria sono riportati casi d'infezione e malattia anche nel gatto (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (Dantas-Torres F., 2012). La specie maggiormente responsabile della Leishmaniosi canina (CanL) è la *Leishmania infantum* (*L. chagasi* nel Nuovo Mondo), che ha carattere zoonosico (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012), mentre altre specie di *Leishmania* spp., a carattere antroponotico, possono essere responsabili d'infezione, ma non di malattia clinica nel cane (tab.1) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). Tra queste ritroviamo la *Leishmania donovani*, che assieme alla *L. infantum* (*L. chagasi*), è causa della forma viscerale nell'uomo (Esch K.J., 2013) (Singh RK, 2006). Diversi animali selvatici, tra canidi, felidi e roditori, fungono da serbatoio dell'infezione nelle zone endemiche (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012).

La trasmissione avviene attraverso artropodi ematofagi che nel Vecchio Mondo appartengono al genere *Phlebotomus*, in particolare in Italia, quello maggiormente coinvolto nella trasmissione è il *P. perniciosus*. In letteratura è riportato l'isolamento del DNA del kinetoplasto del protozoo all'interno di zecche del genere *Rhiphicephalus sanguineus*, anche se non è ancora stata dimostrata la capacità dell'artropode di trasmettere il protozoo all'ospite, o di trasmetterlo nella forma matura infettante (Baneth G., 2008) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (Dantas-Torres F., 2012).

Leishmania spp.	Vettore	Distribuzione geografica
<i>L. amazonensis</i>	<i>L. flaviscutellata</i> , <i>L. nociva</i> , <i>L. whitmani</i>	Brasile
<i>L. arabica</i>	<i>P. Papatasi</i>	Arabia Saudita
<i>L. braziliensis</i>	<i>L. intermedia</i> , <i>L. migonei</i> , <i>L. wellcomei</i> , <i>L. whitmani</i> e altri	Sud America
<i>L. colombiensis</i>	<i>L. Hartmanni</i>	Venezuela
<i>L. guyanensis</i>	<i>L. anduzei</i> , <i>L. umbratilis</i> , <i>L. whitmani</i>	Colombia
<i>L. infantum</i>	<i>L. longipalpis</i> , <i>L. evansi</i> , <i>P. neglectus</i> , <i>P. perniciosus</i> e altri	Africa, America, Asia, Europa
<i>L. major</i>	<i>P. papatasi</i>	Egitto, Arabia Saudita
<i>L. mexicana</i>	<i>L. ayacuchensis</i> , <i>L. olmeca</i>	Ecuador, USA
<i>L. panamensis</i>	<i>L. hartmanni</i> , <i>L. gomezi</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. trapidoi</i> , <i>L. sanguinaria</i>	Colombia, Ecuador, Panama
<i>L. peruviana</i>	<i>L. peruensis</i> , <i>L. verrucarum</i>	Perù
<i>L. pifanoi</i>	<i>L. flaviscutella</i> , <i>L. youngi</i>	Ecuador
<i>L. tropica</i>	<i>P. sergenti</i>	India, Iran, Marocco, Siria

Tabella 1 modificata da (Dantas-Torres F., 2012). Nella tabella sono riportate le specie di *Leishmania* (L.) nella prima colonna, i vettori (L. = *Lutzomyia*, P. = *Phlebotomus*) nella seconda e la distribuzione del protozoo nella terza.

A carattere aneddotico sono riportate infezioni sperimentali dalla madre al cucciolo (Baneth G., 2008) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). Altre vie di trasmissione segnalate sono: trasfusioni di sangue da donatore infetto, altri vettori ematofagi o attraverso contatto diretto, con il morso oppure tramite cellule neoplastiche infette come potrebbe essere il caso del tumore venereo trasmissibile (TVT). Quest'ultima ipotesi è stata avanzata perché in letteratura umana sono riportati casi d'isolamento degli amastigoti, in cellule del sarcoma di Kaposi, in pazienti leishmaniotici HIV+ (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). Nello studio di Marino e collaboratori (2012), sono stati selezionati diciannove cani infetti da *Leishmania infantum* e colpiti da TVT, nel 26% di questi erano presenti amastigoti nelle cellule tumorali (Marino G., 2012). Non vi sono però, ad oggi, pubblicazioni scientifiche che dimostrino la capacità di queste cellule tumorali di trasmettere il protozoo ed essere causa d'infezione.

La Leishmaniosi è endemica in 98 paesi e 3 continenti, con una maggior casistica nei paesi in via di sviluppo (fig.3) (fig.4). I territori coinvolti aumentano per numero ed espansione principalmente perché si estende la superficie in cui sono presenti i vettori della malattia. Circa 12 milioni di persone sono infette e 350.000 a rischio di infezione (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). La World Health Organization (WHO) nel maggio del 2012, ha dato luogo ad un incontro di aggiornamento sulla base dei risultati delle riunioni regionali di tale organizzazione con revisione della letteratura e opinione degli esperti riguardo alla diffusione della Leishmaniosi, l'impatto sulla salute dell'uomo e le conseguenze che questa ha sulla gestione economica dei paesi coinvolti. I dati ricavati indicano che vi sono, ogni anno, circa 200.000-300.000 nuovi casi di Leishmaniosi Viscerale (LV) e 700.000-1.2 milioni di Leishmaniosi Cutanea (LC). Il tasso di mortalità è di circa 20.000-40.000 decessi/anno (WHO, 2012). In Italia, tra il 2003 e il 2007, sono segnalati 134 nuovi casi/anno di LV, con un'incidenza stimata tra 160-240 casi annui, mentre circa 49 nuovi casi/anno di LC, con un'incidenza stimata tra 140-230 annui (Alvar J., 2012).

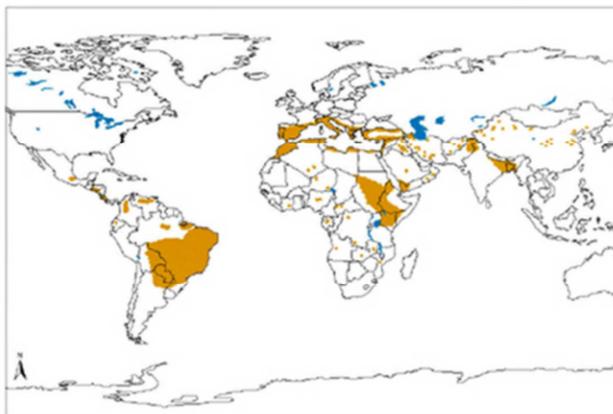


Figura 3 modificato da (WHO, 2012). Nella cartina la diffusione mondiale della Leishmaniosi viscerale, aggiornata al 2010.

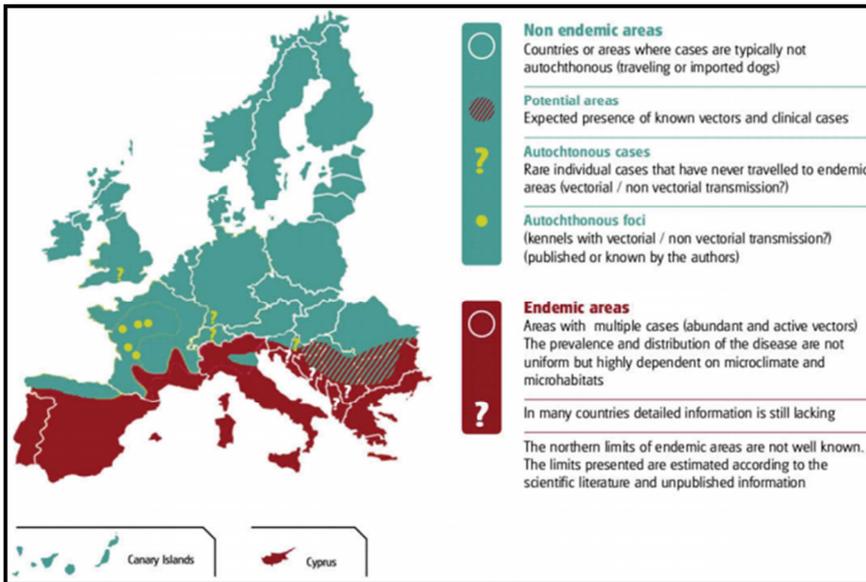


Figura 4 modificato da (Solano-Gallego L. M. G., 2011). Nell'immagine la distribuzione della *L.infantum* in Europa

Nell'area del Mediterraneo in cui l'infezione è endemica (tab.3) il tasso di cani risultati sieropositivi è fra l'8.1% ed il 13%, a seconda della regione, in Spagna; oscilla tra il 4% e il 25% fra Portogallo, Francia, Italia, Grecia, Cipro e Turchia. In particolare in Italia sembra essere stimata attorno al 15% (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012).

In uno studio epidemiologico eseguito in Brasile, paese in cui per il controllo della malattia è previsto l'abbattimento dei cani positivi, si è rivelato come il trend dei casi di LV sia comunque in aumento dal 1990 al 2010 (fig.5), dimostrando come questo metodo non sia efficace nel controllo della diffusione della malattia (Dantas-Torres F., 2012). Infatti la leishmaniosi è una malattia del territorio strettamente legata alla presenza del vettore, dell'ospite e delle condizioni climatiche predisponenti il mantenimento del ciclo biologico del protozoo.

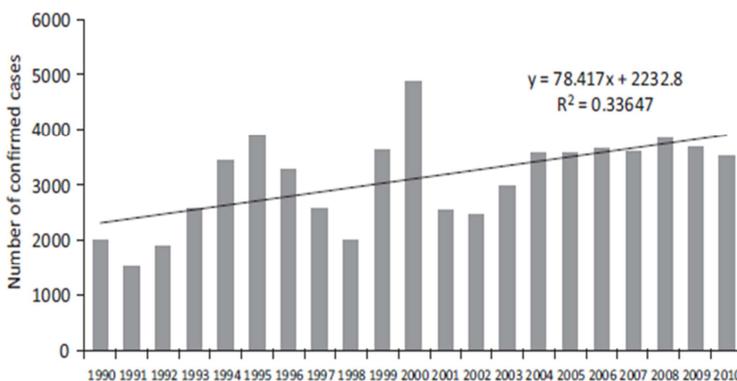


Figura 5 modificato da (Dantas-Torres F., 2012). Nella figura sono riportati i nuovi casi di leishmaniosi viscerale nell'uomo nel territorio brasiliano, tra il 1990 e il 2010. Sono stati inclusi pazienti con sospetto clinico e sierologia positiva, conferma parassitologica e/o risposta al trattamento anti-leishmania. Questo evidenzia un trend di nuovi casi in aumento, che può riflettere un miglioramento nei servizi di notifica dei nuovi casi e l'inefficacia delle misure di controllo attuate.

La maggior parte dei cani è definita resistente perché alberga il protozoo, quindi è infetta, ma in modo subclinico e non manifesta la malattia. Ciò che risulta determinante nella gestione dell'infezione, quindi ciò che stabilisce se il cane resterà portatore infetto o se avrà manifestazioni cliniche della Leishmaniosi canina, è la risposta immunitaria che l'organismo mette in atto al momento dell'infezione. I cani possono quindi essere categorizzati, in modo didattico, in *cl clinicamente resistenti* o *sensibili*. Nel primo caso il soggetto è in grado di eliminare autonomamente il parassita o di controllare l'infezione, rimanendo in uno stadio subclinico della CanL. Nel secondo, invece, il cane sviluppa la malattia clinica, variando da forme lievi a più gravi, molto dipende anche dal tempo impiegato per la diagnosi (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). La prima situazione può non essere permanente, perché vi sono alcuni fattori che, se subentrano modificando l'equilibrio raggiunto dal sistema immunitario del soggetto infetto, possono essere causa del passaggio dalla forma subclinica alla malattia clinica. Tali fattori possono essere lo sviluppo di comorbidità, la somministrazione di terapie immunomodulatrici, la contrazione di altre malattie infettive, fattori che nell'uomo corrispondono a infezioni da HIV oppure alla necessità di subire trapianti e quindi di ricevere terapie immunosoppressive.

La Leishmaniosi viene classificata in medicina umana tra le malattie neglette, ma il suo ruolo, come quello di altre malattie infettive soprattutto parassitarie, sta assumendo sempre più rilevanza in medicina trapiantologica. Questo perché i soggetti sottoposti a trapianto d'organo devono eseguire terapie immunosoppressive e se albergano in modo latente l'infezione questa potrebbe riattivarsi determinando malattia clinica in soggetti già debilitati. Il rischio, inoltre, è rappresentato dai nuovi donatori che sempre di più provengono da paesi extraeuropei ed il protocollo di screening di quest'ultimi non prevede il controllo per alcune malattie tropicali neglette, tra cui *Leishmania infantum* e/o *donovani* (Ministero della Salute, 2005) (Centro Nazionale Trapianti, 2012). Per tale motivo l'organo trapiantato potrebbe risultare non idoneo solo dopo l'intervento e l'inizio delle terapie antirigetto. Diversi sono i case report sugli eventi fatali correlati alla Leishmaniosi post-trapianto, alcuni esempi sono riportati da Prasad e colleghi (Prasad N, 2011), Dettwiler S. e coautori (Dettwiler S M. T., 2010) o Jha P.K. e collaboratori (Jha PK, 2012) e altri (Aardema H, 2009) (Veroux M, 2010).

La risposta immunitaria innata aspecifica dovrebbe essere la prima linea di difesa per l'organismo e l'ipotesi avanzata in questi anni è che il protozoo sia in grado di eludere questo

meccanismo perché la forma amastigote è in grado di replicare e sopravvivere all'interno dei fagolisosomi macrofagici, in quanto capace di produrre sostanze, come i lipofosfoglicani, che bloccano la maturazione dei fagosomi (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). Ipotesi avanzate nell'ultima decade individuano nei granulociti neutrofilici degli effettori importanti per l'entrata e la diffusione del parassita (Kaye P. and Scott P., 2011). In particolare, il primo fu Laskay, che in una pubblicazione del 2003 avanza la tesi che i granulociti neutrofilici polimorfonucleati (PMNs), considerati dei fagociti "professionisti", siano attirati nel sito di inoculo del flebotomo e che fungano da "Cavallo di Troia" per i promastigoti (Laskay T., 2003). In uno studio, pubblicato nel 2001, da Muller e collaboratori condotto su dei topi si è evidenziato come dopo alcune ore dall'inoculo nella cute delle forme promastigote, arrivino in questo sito i granulociti neutrofilici richiamati dalle chemochine prodotte in loco in seguito alla reazione flogistica e solo due o tre giorni più tardi arrivino monociti e macrofagi (Müller K, 2001). Il processo di chemioattrazione di queste cellule è mediato principalmente dall'IL-8, prodotta da cellule endoteliali, chemiociti e fibroblasti, la quale oltre ad attirare i neutrofilici, ne attiva il processo di fagocitosi dell'agente estraneo, in questo caso del protozoo. Si è dimostrato, inoltre, come lo stesso flebotomo possa trasmettere con il pasto batteri e/o virus in loco stimolando ulteriormente la reazione infiammatoria dei tessuti e potenziando così l'attività di richiamo di neutrofilici e dei macrofagi. I neutrofilici così parassitati dai promastigoti, vengono fagocitati dai macrofagi e fungono da "cavallo di Troia", appunto, per il parassita il quale riesce ad entrare nel macrofago senza essere distrutto. Il ruolo dei neutrofilici deve però essere ancora ben indagato in vivo (Kaye P. and Scott P., 2011).

Il ruolo principe nella patogenesi della Leishmaniosi è svolto dalla risposta immunitaria specifica. Nell'uomo e nel modello sperimentale murino si è dimostrato come i soggetti che sviluppano una risposta principalmente o totalmente T helper 2 (Th-2) soccombono all'infezione, mentre soggetti con risposta T helper 1 (Th-1) risultino resistenti. Nel cane la risposta immunitaria, e quindi il manifestarsi della malattia, non ha un carattere così dicotomico; infatti, in esso si attivano entrambi i tipi di risposta, ma in alcuni soggetti prevale la risposta Th-2. Quest'ultimi soggetti risulteranno malati (Barbieri C.L., 2006) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (McCall L.I., 2013) (Proto W.R., 2013).

La risposta Th-1 è mediata da citochine, quali IL-2, TNF- α e IFN- γ che inducono l'attivazione dei macrofagi con conseguente produzione di NO, principale effettore della morte intracellulare degli amastigoti (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (Proto W.R., 2013). In modelli sperimentali si è visto che la riduzione nella produzione di ossido nitrico (NO)

promuove la disseminazione viscerale del parassita (McCall L.I., 2013). La risposta Th-2 è caratterizzata da un incremento prevalente di altre citochine, quali IL-10, IL-4 (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012) (Barbieri C.L., 2006) e TGF- β (S., 2012), ed esita in un'imponente risposta anticorpale con danni d'organo mediati da immunocomplessi (fig.6) (Baneth G., 2008).

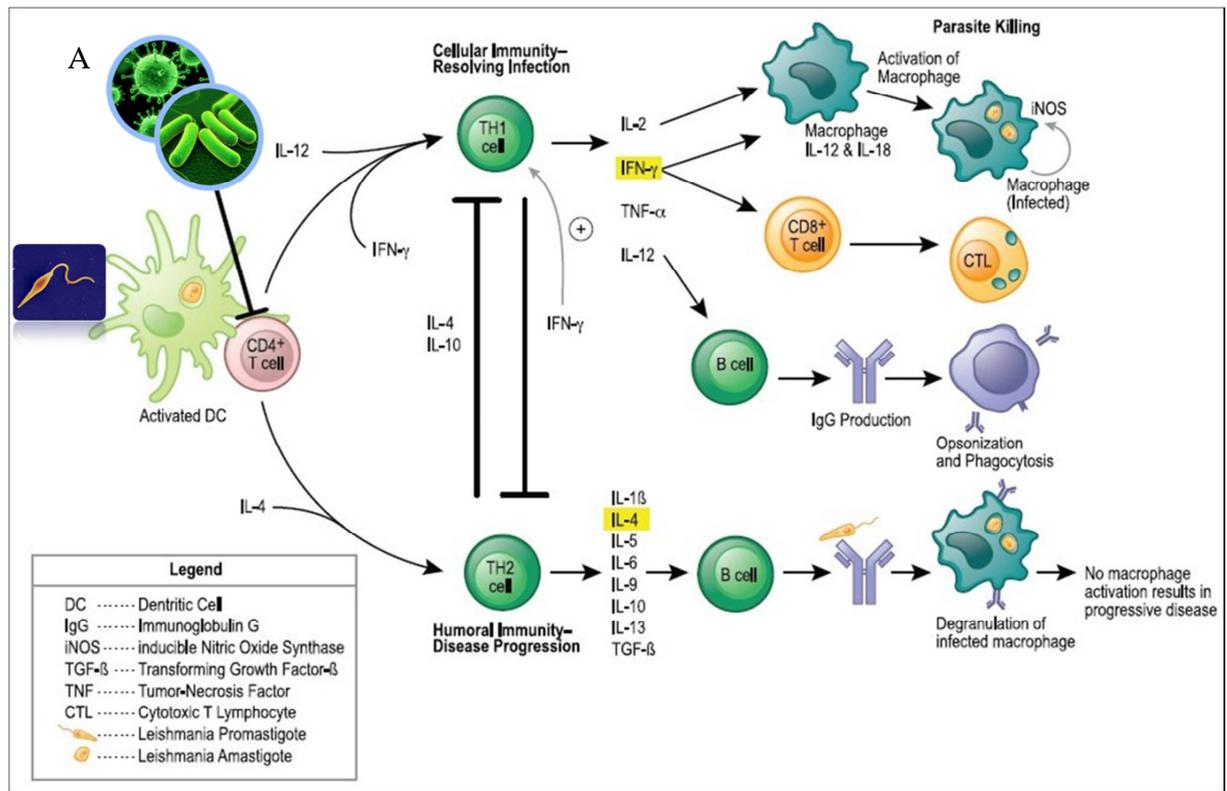


Figura 6 modificata da (Navid Ezra, 2010). Visualizzazione schematica della risposta Th-1 e Th-2 nella leishmaniosi viscerale con particolare focus sulla risposta in corso di CanL. Una risposta mista Th-1 e Th-2 si sviluppa nei cani infetti, quando questa risposta si sbilancia verso la Th-2 il cane soccombe all'infezione, mentre quando prevale una più forte risposta Th-1 il paziente mostra resistenza alla malattia. Le citochine IFN- γ , IL-2 e TNF- α , inducono la produzione di NO con eliminazione del parassita. Al contrario, IL-10, TGF- β e IL-4 sono coinvolte nella diffusione del parassita nell'organismo con un notevole incremento dell'attività dei linfociti b e delle plasmacellule, con iperglobulinemia indotta dalla risposta Th-2. La risposta Th-1 subisce una down-regolazione da IL-10, prodotte dalle cellule T regolatrici (Treg). IL-10 viene, inoltre, prodotta da cellule della linea Th-1 ed è stato avanzato che possa essere benefica nel limitare l'immunopatologia secondaria indotta dalle infezioni, ma previene l'immunità sterile e garantisce il mantenimento di una bassa carica parassitaria. L'immagine A indica possibili co-infezioni o infezioni secondarie che possono alterare l'equilibrio immunitario nei soggetti infetti non malati, con sviluppo di malattia clinica, per viraggio della risposta immunitaria da tipo Th1 a Th2.

In via sperimentale si è dimostrato come l'IL-10 in particolare promuova la progressione della malattia e come l'inibizione di questa citochina porti alla formazione di granulomi e all'eliminazione del parassita (Murray H.W. L. C., 2002). Inoltre l'inibizione di tale citochina induce un incremento dell'IFN- γ e dell'iNOS nei tessuti infetti ed è stato dimostrato come la terapia leishmanicida associata ad una terapia che miri a bloccare questa citochina migliori

l'effetto della terapia eziologica stessa (Murray H.W. M. A., 2003) (Murray H.W. F. K., 2005).

Nell'uomo è già stata dimostrata la predisposizione genetica dei soggetti nello sviluppo della malattia, che sembra essere legata alla mutazione di un gene in particolare, lo *Slc11a1* coinvolto nella sintesi di proteine macrofagiche (Baneth G., 2008). Uno studio spagnolo del 2002 ha individuato un'alterazione a carico di questo gene nei cani sensibili alla CanL (Altet L, 2002).

2. Danno renale: pattern istopatologici

2.1 Revisione della letteratura veterinaria

La leishmaniosi, nell'uomo e nel cane, è associata a danno renale. Diversi lavori scientifici sono stati condotti con lo scopo di individuare un pattern istopatologico renale prevalente in corso di leishmaniosi, al fine di ottimizzare il trattamento ed anche fornire una più corretta prognosi.

Nel corso degli anni l'attenzione si è focalizzata principalmente sul coinvolgimento glomerulare, come principale sede di danno renale in soggetti colpiti da questa malattia protozoaria. Si è visto, però, che non solo questo segmento del nefrone viene colpito e che gioca un ruolo altrettanto importante, nello sviluppo della malattia renale cronica (*Chronic Kidney Disease* – CKD), il danno tubulo-interstiziale, caratterizzato principalmente da infiltrazione linfoplasmocellulare e fibrosi interstiziale.

Nel 1977 Tryphonas e colleghi, riportano il caso di un cane affetto da CanL e descrivono all'esame istopatologico un ispessimento della capsula di Bowman, alterazioni a carico delle cellule epiteliali del tubulo contorto prossimale con accumulo di granuli PAS positivi, senza coinvolgimento dei tratti distali del nefrone. L'infiltrazione predominante che è stata riscontrata è di linfociti e una minima quantità di plasmacellule nell'interstizio renale con incremento della componente fibrosa. Infine hanno evidenziato materiale eosinofilo intraluminale riferibile a materiale proteinaceo (Tryphonas L., 1977).

Nel 1991 Poli e coautori descrivono in un gruppo di 34 cani infetti due principali alterazioni istologiche, in 21 dei 34 cani una glomerulonefrite mesangio-proliferativa (GNMe) (focale o diffusa), in 12 una glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP) segmentale ed in un solo soggetto deposito di sostanza amiloide nel glomerulo e nell'interstizio. All'esame immunoistochimico depositi granulari di IgG, IgM e C3 sono stati evidenziati. Infine in questo stesso studio non hanno trovato un'associazione tra età, sesso, valori di creatinina e urea sieriche, durata della malattia, titolo anticorpale, immunocomplessi circolanti e tipo istopatologico di glomerulopatia, ma sembra esserci un'associazione con la proteinuria, in particolare riguardo l'entità e le caratteristiche qualitative di questa (Poli A., 1991).

Koutinas e colleghi nel 1994, hanno condotto uno studio con l'obiettivo di associare le alterazioni cliniche, clinicopatologiche ed istologiche in 14 cani affetti da CanL proteinurici. All'esame istologico hanno evidenziato nel 43% dei soggetti analizzati una GNMP, nel 29% una glomerulonefrite membranosa (GNMB), nel 21% una GNMe e nel 7% glomerulosclerosi. In tutti i soggetti si apprezzava una nefrite tubulo-interstiziale (NTI) linfoplasmocellulare ed erano visibili, in 12 dei 14 casi, amastigoti nel tessuto connettivo renale (Koutinas A.F. K. V., 1994).

Nel 2003, il gruppo di lavoro brasiliano di Costa e collaboratori, ha considerato un gruppo di 55 cani infetti da *Leishmania chagasi*, sottoposti ad eutanasia come prevede il piano di sorveglianza del paese. La valutazione istopatologica del tessuto renale ha mostrato: alterazioni del glomerulo nel 100% dei casi analizzati, con 32.7% GNMP, 30.9% GNMe, 18.2% glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS), 14.5% *Minimal Change Disease* (MCD) alla microscopia elettronica, 1.8% GN cronica e 1.8 GN a semilune con coinvolgimento del 43% dei glomeruli. Nel 78.2% era apprezzabile una nefrite interstiziale localizzata alla corteccia renale, mentre nel 23.6% questa coinvolgeva anche la midollare, con un infiltrato principalmente linfoplasmocellulare. In quelli in cui era presente flogosi anche della midollare, le lesioni corticali risultavano molto gravi. Nei casi in cui l'infiammazione era meno cospicua, l'infiltrato cellulare si localizzava principalmente in sede peritubulare, intertubulare e perivascolare. L'80% dei soggetti con GN si presentava sintomatico (Costa F.A.L., 2003).

Sempre lo stesso anno, Zatelli e colleghi hanno condotto uno studio su 41 cani infetti da *Leishmania infantum* che aveva come obiettivo l'identificazione delle lesioni istopatologiche renali e, se possibile, associare ad esse un preciso pattern elettroforetico delle proteine

urinarie, tramite analisi qualitativa della proteinuria con SDS-AGE. All'analisi dei campioni di tessuto renale 29.3% di GNMP, 26.8% di GN membranosa (GNM), 21.9% GN mesangiale (GNMe), 19.5% FSGS e in un solo caso la prima biopsia non mostrava lesioni istologiche, mentre nel secondo prelievo bioptico hanno riscontrato FSGS. Tutti i cani con danno glomerulare possedevano un pattern elettroforetico simile, senza differenze tra pattern istologici differenti (Zatelli A., 2003).

Nel 2006 Plevraki e coautori, pubblicano i dati di uno studio condotto su 40 cani affetti da Leishmaniosi canina, al fine di monitorare l'effetto dell'allopurinolo sulla progressione del danno renale in questi pazienti. Il gruppo dei cani non proteinurici e non azotemici mostrava, all'esame istopatologico del tessuto renale, una prevalenza di GNMe, i pazienti con proteinuria ed azotemia una maggior presenza di GNMP, mentre il gruppo di cani proteinurici, ma asintomatici aveva un eguale prevalenza di GNMe e GNMP. In tutti i 40 cani vi era NTI. Gli autori sottolineano inoltre che le lesioni patologiche, in quanto ad estensione e gravità del danno, erano evidentemente più lievi nel gruppo dei non proteinurici e non azotemici (Plevraki K., 2006).

Nel 2008 Albuquerque e collaboratori, hanno analizzato le biopsie renali di 20 cani, 12 infetti naturalmente con leishmania e 8 cani come gruppo di controllo. Nel gruppo di studio il 91.7% presentava proliferazione mesangiale, l'83.3% glomerulosclerosi, il 33.3% riduzione dello spazio di Bowman con deposito multifocale di calcio nelle anse di Henle e il 58.3% cilindri ialini endotubulari (de Albuquerque B.C.N.C., 2008).

Il gruppo brasiliano di Soares, nel 2009, ha analizzato campioni di tessuto renale di 40 cani positivi a *L. chagasi* (25 sintomatici e 15 asintomatici), con tecnica di immunistochemica per individuare i depositi di immunoglobuline G (IgG) ed M (IgM). Questi hanno evidenziato la presenza di depositi prevalentemente sub-endoteliali, a pattern granulare, nei capillari glomerulari, con differenze d'intensità tra IgG e IgM. Le seconde mostravano una reazione più intensa che raramente coinvolgeva cellule mesangiali ed interstizio, mentre le prime avevano una reazione più blanda, ma prevalentemente localizzata a livello mesangiale ed interstiziale. Con un'intensità di reazione per le IgG maggiore in modo statisticamente significativo per i cani sintomatici rispetto a quelli asintomatici (Soares M.J.V., 2009).

Nel 2010 Costa e colleghi, hanno eseguito uno studio con 55 cani infetti e 8 controlli sani. In 8 cani hanno riscontrato una FSGS, in 8 GNMe, in 8 GNMP e in altri 8 MCD. Lo studio aveva come scopo primario quello di individuare che tipo d'immunoglobuline (Ig) fossero

coinvolte nel danno glomerulare e tubulare. I ricercatori non hanno evidenziato una differenza significativa di deposito di IgG, IgM, IgA e C3 a livello renale tra i cani infetti e quelli del gruppo di controllo, avanzando quindi l'ipotesi di un altro meccanismo alla base della patogenesi della malattia renale in corso di Leishmaniosi quale la migrazione di CD4+ T-cella nei glomeruli associata alla partecipazione di molecole d'adesione e riduzione dell'apoptosi, con progressione e ingravescenza dell'iper cellularità glomerulare (Costa F.A.L., Prianti M.G., 2010).

Nihat Toplu ed il collega Ahmet Aydogan, nel 2011, hanno pubblicato uno studio su 22 soggetti affetti da CanL in cui è stata fatta un'indagine immunoistochimica in vari tessuti, fegato, milza, linfonodi, polmone, cute, MO, intestino ed il rene. A livello di quest'ultimo hanno osservato un'infiltrazione di natura infiammatoria prevalentemente plasmacellulare, con linfociti e linfoblasti, inclusi dei macrofagi soprattutto a livello corticale in 19 su 22 soggetti e anche midollare in 6 su 22. Inoltre le lesioni glomerulari riscontrate sono risultate essere glomerulosclerosi (5/22), GNMe (6/22) e GNMP (5/22) (Toplu N. and Aydogan A., 2011).

Nel 2012 Aresu e colleghi hanno pubblicato un lavoro prospettico in cui sono stati selezionati 15 cani infetti sottoposti a biopsia renale al momento della diagnosi e 60 gg post-trattamento leishmanicida. Alla prima biopsia in 3 soggetti hanno riscontrato una GNMe (fig.7), in 3 una GNMP (fig.8), in 5 glomerulosclerosi ed in 3 tutti i reperti caratteristici di una malattia renale cronica in stadio avanzato, quali sinechie, più del 40% di glomeruli obsolescenti, ciuffi di capillari glomerulari di forme diverse con ispessimento della capsula di Bowman (fig.9). Uno dei soggetti non ha mostrato alcuna alterazione, mentre in nove sono risultati evidenti, alla microscopia elettronica, dei depositi elettrondensi alla microscopia elettronica e in sette si è osservato l'infiltrato linfoplasmocellulare. Alla seconda biopsia, post-trattamento, non hanno notato modifiche né delle lesioni glomerulari, né della fibrosi o della flogosi interstiziale. Agli approfondimenti clinicopatologici 13 cani sono risultati essere proteinurici (UPC>0.3) e 10 erano iperazotemici (creatinina sierica > 1 mg/dl) a tempo 0 (Aresu L. B. S., 2012).

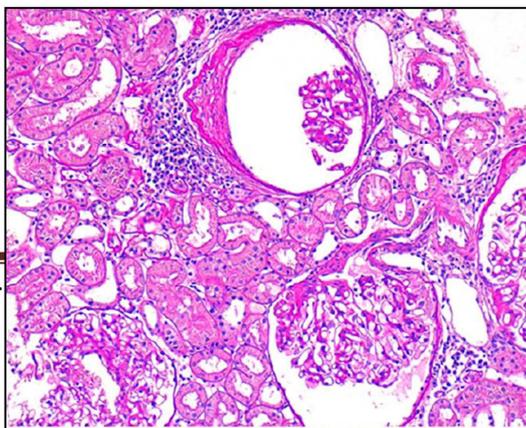


Figura 7 modificata da (Aresu L. B. S., 2012). Glomeruli con ampliamento dello spazio urinario, inspessimento e sdoppiamento della capsula.

Figura 8 modificata da (Aresu L. B. S., 2012). Glomerulo con sdoppiamento segmentale della membrana basale glomerulare per interposizione di cellule mesangiali (freccia gialla).

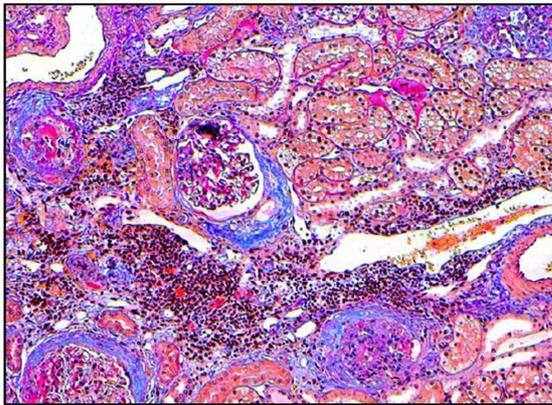
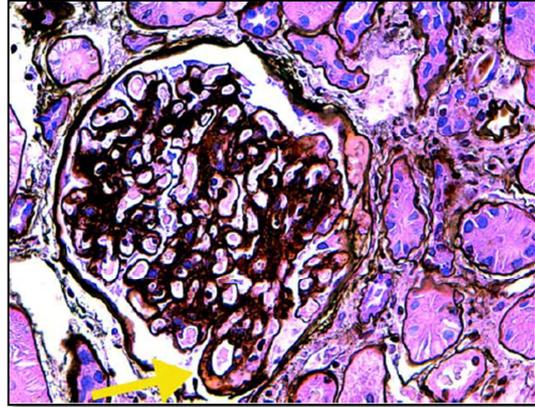


Figura 9 modificata da (Aresu L. B. S., 2012). Alterazioni glomerulari e tubulointerstitiali gravi e croniche con aree di flogosi e fibrosi.

Nel 2013 il gruppo Brasiliano di Belo Horizonte, guidato da Tafuri, ha considerato la CanL come una patologia sistemica fibrotica, indotta da un processo infiammatorio cronico che porta alla formazione e al deposito intraparenchimatoso multiorganico di sostanza connettivale. In particolare, nei campioni di tessuto renale hanno potuto evidenziare nel 75% dei casi una GNMP con incremento della cellularità del ciuffo capillare dei glomeruli conseguenza di una proliferazione endoteliale, epiteliale o delle cellule mesangiali. Nel 50% dei soggetti si è osservata TNI, nel 41.6% atrofia glomerulare e presenza del parassita nel 45.8% dei campioni. Le alterazioni non glomerulari riportate hanno riguardato una proteinuria tubulare e un'intensa e diffusa flogosi cronica dell'interstizio (Silva L.C., 2013).

Di recente pubblicazione un lavoro di Rigo e colleghi, in cui sono stati selezionati 100 cani raccolti dal Centro di Controllo delle Zoonosi dello stato brasiliano di Mato Grosso Del Sole e

poi soppressi seguendo le direttive del piano di sorveglianza della Leishmaniosi. Nel 74.7% dei soggetti non vi era infiltrazione tubulare a carattere infiammatorio, mentre nel 67% vi era evidenza di coinvolgimento interstiziale e nel 52% erano presenti lesioni glomerulari. Il pattern istopatologico più frequente era rappresentato da GNMP e GNM, entrambe presenti nel 18% dei soggetti, il 14% presentava FSGS e 2% GN cronica. I cani sono stati suddivisi in sintomatici ed oligosintomatici per verificare se vi fosse una correlazione tra la sintomatologia clinica e le lesioni glomerulari, per tipo di pattern e/o entità del danno, ma non hanno riscontrato differenze significative tra i due gruppi. Gli autori riportano inoltre la presenza di cilindri intratubulari, ipertrofia tubulare e fibrosi (Rigo R.S., 2013).

2.2 Case reports

Diversi sono i *case reports* in letteratura che associano la CanL a lesioni istologiche renali, come quello pubblicato da Tafuri et al., nel 2001, di un cane con *Leishmania chagasi*, sintomatico in quanto presentava un coinvolgimento multiorganico (midollo osseo, fegato, milza, linfonodi, cute) e in particolare in sede renale riportavano una GNMP con incremento della cellularità nel ciuffo capillare, proliferazione endoteliale, epiteliale e mesangiale, accumulo intravascolare di granulociti neutrofilici e monociti, ispessimento della parete dei capillari glomerulari per ispessimento della membrana basale ed edema epiteliale ed endoteliale. Inoltre, del materiale ialino era presente nell'area mesangiale e risultava esserci un ispessimento della capsula di Bowman, atrofia del ciuffo capillare di alcuni glomeruli, materiale proteinaceo intratubulare e intensa e diffusa flogosi interstiziale (Tafuri W.L., 2001). Ancora, nel 2007, Aresu e colleghi riportano il caso di un cane con co-infezione di *Leishmania infantum* e *Dirofilaria immitis*, iperazotemico con iperfosfatemia, anemia grave normocitica normocromica non rigenerativa, iperprotidemia con riduzione del rapporto albumine/globuline (A/G), proteinuria nefrosica mista. All'esame immunoistochimico hanno riscontrato una GNMP, il tessuto renale all'esame immunoistochimico risultava positivo a IgG, IgA, IgM e componente 3 del complemento (C3). Inoltre erano visibili sia nel tessuto renale che nei campioni di fegato e milza amastigoti di *Leishmania infantum* (Aresu L. V. F., 2007).

Autori	Anno	N° casi studio + ctr	Glomerulopatie	Tubulo-interstiziopatia
Koutinas et al.	1994	14	GNMP 43%, GNM 29%, GNMe 21% Glomerulosclerosi 7%	NTI 100%
Zatelli et al.	2003	41	29.3% GNMP, 26.8% GNM, 21.9% GNMe, 19.5% FSGS, 2.4% FSGS alla seconda biopsia	n.d.
Costa et al.	2003	55 + 5	32.7% GNMP, 30.9% GNMe, 18.2% FSGS, 14.5% MCD, 1.8% GN cronica, 1.8% GN "a semiluna"	78.2% NTI 23.6% anche nella midollare
Plevraki et al.	2006	40	21/36 GNMe, 15/36 GNMP	40/40 NTI
Aresu et al.	2012	15	5/15 glomerulosclerosi, 3/15 GNMe, 3/15 GNMP, 3/15 ESKD, 1/15 no lesioni glomerulari, 9/15 depositi elettrondensi	7/15 infiltrato linfoplasmacellulare
Silva et al.	2013	24	75% GNMP, 41.6% atrofia glomerulare/fibrosi, 16.6% fibrosi e lesioni cicatriziali	50% nefrite interstiziale con cilindri ialini nei tubuli
Rigo et al.	2013	100	18% GNM, 18% GNMP, 14% FSGS, 48% normali	67% coinvolgimento interstiziale 74.7% assenza di infiltrazione di cellule infiammatorie nel tubulo

2.3 Focus sulla letteratura umana

In medicina umana la forma di Leishmaniosi più diffusa è quella cutanea, mentre la forma viscerale è la meno frequente, ma anche quella che compromette maggiormente la sopravvivenza nell'uomo e che ne compromette la qualità di vita. Anche in medicina umana, come dimostrato nel cane, la malattia provoca danni al parenchima renale, spesso non reversibili che portano allo sviluppo di una malattia renale cronica. Uno dei primi studi riportati risale al 1975, di De Brito e colleghi, in cui sono stati selezionati tre pazienti con diagnosi accertata di *kala-azar* sottoposti a biopsia renale percutanea. I risultati del gruppo brasiliano riportano all'esame istopatologico la presenza di gocce ialine nel citoplasma delle cellule del tubulo contorto prossimale. All'esame immunoistochimico è stata individuata la positività del tessuto per IgG e C3 nei 3 casi e per IgM in 2 su 3, la fluorescenza era molto ben visibile all'interno del mesangio. Alla microscopia elettronica erano visibili depositi elettrondensi sia tra la membrana basale e le cellule mesangiali, sia all'interno della matrice mesangiale. Gli autori, infine, concludono che il quadro da loro riscontrato era caratterizzato dalla proliferazione di cellule mesangiali, quindi GNMe (De Brito T., 1975). Un *case report* di Weisinger et al. del 1978, riporta una GNMe, con deposito di IgG nella membrana basale a pattern granulare. Dichiarano inoltre che dopo la terapia con composti antimoniai hanno riscontrato un decremento della proteinuria, scomparsa dell'ematuria microscopica e un aumento della clearance della creatinina (Weisinger J.R., 1978).

Nel 1985, Dutra e colleghi, hanno analizzato 50 pazienti affetti da *kala-azar*, che risultavano per il 51% proteinurici, di cui il 57% con una escrezione delle proteine urinarie nelle 24 ore inferiore a 1 g. Di questi 50 casi, 7 sono stati sottoposti a biopsia renale che ha evidenziato in tutti i 7 casi la presenza di una tubulo-interstiziopatia e in 5 di questi la compresenza di GN proliferativa (Dutra M., 1985).

Il gruppo di studio brasiliano guidato dal Prof. Costa, nel 2003 ha considerato 11 pazienti con LV, nei quali il 63.3% presentava ematuria, di questi il 45.4% di tipo macroscopico. Nel 90.9% dei soggetti proteinurici l'81.8% aveva microalbuminuria e il 54.5% leucocituria. In cinque degli undici casi è stata riscontrata una tubulopatia localizzata al tratto più prossimale del nefrone tramite misurazione della *retinol-binding protein* (Natalino Salgado Filho, 2003).

2.4 Case reports

Vi sono poi numerosi *case report* riguardo il danno renale in corso di *kala-azar*, come quello pubblicato da Chaigne et al. nel 2004, di un paziente affetto da LV con danno renale acuto, sindrome nefrosica (SN) e all'esame istopatologico la presenza di una GN segmentale necrotizzante (Chaigne V, 2004). Negli ultimi anni sono aumentati i *case reports* riguardo pazienti trapiantati che manifestano, in seguito al trattamento immunosoppressivo, la malattia clinica. Ad esempio, del 2010 Dettwiller e colleghi riferiscono un paziente in cui post-trapianto si è instaurata una nefrite interstiziale con infiltrazione di macrofagi, linfociti, plasmacellule, istiociti e concomitante presenza di forme amastigote del parassita (Dettwiler S M. T., 2010). Ancora nel 2012, un caso interessante arrivato al gruppo di lavoro di Amann, di un paziente affetto da HIV, iperazotemico con SN e sedimento nefritico, sottoposto a due biopsie renali che hanno rivelato la presenza di una MPGN con amastigoti nel tessuto renale, positivi a IgG, IgM, C3 e tubulo-interstiziopatia con atrofia dei tubuli e infiltrato plasmacellulare (Amann K, 2012).

Dai dati presenti in letteratura possiamo quindi concludere che i pattern istopatologici più frequentemente riscontrati in corso di Leishmaniosi canina sono la GNMP con una prevalenza che oscilla, a seconda degli studi considerati, tra il 28% e il 75%, GNMe 19.5-58.3%, GNM 18-29%, FSGS 14-19.5%, glomerulosclerosi 7-41.6% e, infine, il coinvolgimento tubulo-interstiziale è segnalato in quasi la totalità dei lavori presenti in letteratura con una prevalenza tra il 46% e il 100%, si tratta principalmente di infiltrati di natura linfoplasmocellulare. I pattern segnalati hanno la caratteristica comune di essere il risultato del deposito a livello tissutale renale di IMC e, come descritto nel prossimo capitolo, a seconda dell'entità, della localizzazione, del tipo di IMC e della risposta delle cellule presenti in sede glomerulare si sviluppano le diverse lesioni istopatologiche. In medicina umana il riscontro più frequente è di un coinvolgimento principalmente tubulo-interstiziale con conseguenze legate principalmente ad un deficit funzionale del tubulo.

3. Pattern istopatologici di danno glomerulare

La valutazione patologica del tessuto renale, ha lo scopo di individuare e caratterizzare le lesioni a carico del parenchima per poter fornire al medico clinico informazioni riguardo al possibile trattamento e alla prognosi del paziente (Brown, 2011).

I pattern morfologici di danno glomerulare sono: glomerulonefrite membranosa (GNM), glomerulonefrite membranoproliferativa (GNMP), glomerulonefrite mesangioproliferativa (GNMe), *Minimal Change Disease* (MCD), glomerulosclerosi focale segmentale (FSGS) e sindrome di Alport.

La glomerulonefrite (GN) è una patologia immunomediata, caratterizzata dal deposito di immunocomplessi (IMC) nel glomerulo, i quali possono arrivare tramite il circolo ematico oppure formarsi *in situ*. Nel primo caso gli IMC sono presenti nel torrente circolatorio e quando arrivano al filtro glomerulare si possono depositare a diversi livelli del filtro glomerulare, con lesioni istopatologiche differenti. Ciò si verifica per tre condizioni che in sede glomerulare vengono soddisfatte: il glomerulo riceve il 25% della gittata cardiaca, la pressione nei capillari glomerulari è maggiore se confrontata a quella di altri capillari dell'organismo e la carica negativa delle pareti capillari facilita il legame con le valenze positive degli immunocomplessi (Nangaku M. and Couser W.G., 2005). Ci sono tre diversi tipi di IMC che possono formarsi in circolo a seconda del rapporto antigene-anticorpo (Ag:Ab), ovvero IMC di piccole dimensioni e solubili, che si formano in presenza di un eccesso di antigene (Ag) e che difficilmente tendono a depositarsi, non legano il complemento e raramente sono la causa di danno glomerulare; poi vi sono IMC di grosse dimensioni e insolubili, che si formano per un eccesso di anticorpi (Ab) e vengono eliminati rapidamente dal sistema fagocitario; infine vi sono IMC di medie dimensioni i quali si formano quando il rapporto Ag/Ab è pari a 1 o lievemente a favore dell'Ag, possono depositarsi e restare intrappolati nel glomerulo. Sono questi ultimi la principale causa che induce lo sviluppo di glomerulonefrite (Grauer F.G., 2005). Gli IMC circolanti si depositano prevalentemente a livello sub-endoteliale o mesangiale, difficilmente a livello sub-epiteliale, perché sono molecole comunque troppo grandi per poter attraversare le MBG, anche se in alcune condizioni particolari possono dissociarsi, superare questa barriera e riformarsi poi in sede sub-epiteliale (fig.10) (Nangaku M. and Couser W.G., 2005). Nel secondo caso, invece, vi sono Ab circolanti che si legano a formare IMC con Ag glomerulari o contro Ag circolanti

che arrivano a depositarsi in sede sub-endoteliale, sub-epiteliale o nell'area mesangiale (fig.11).

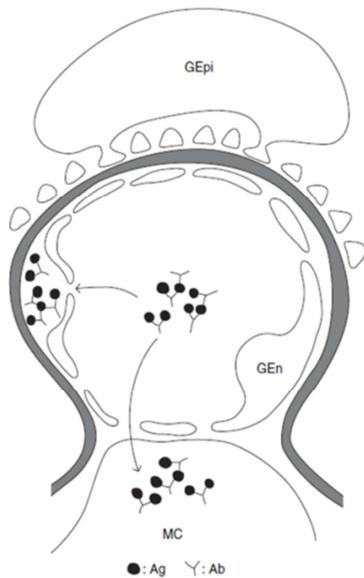


Figura 10 modificato (Nangaku M. and Couser W.G., 2005). Rappresentazione grafica del deposito di IMC circolanti, che si localizzano a livello mesangiale o subendoteliale. GEn, cellule glomerulari endoteliali; GEpi, cellule glomerulari epiteliali; MC, cellule mesangiali; Ag, antigeni; Ab, anticorpi

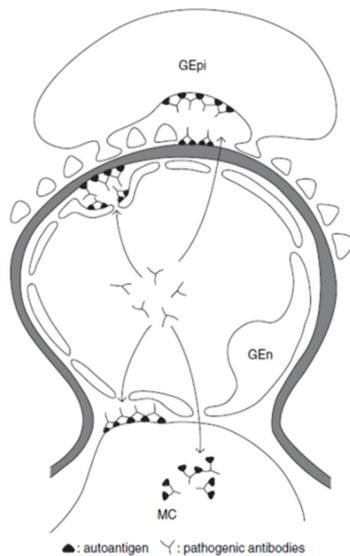


Figura 11 modificato (Nangaku M. and Couser W.G., 2005) Rappresentazione grafica della formazione in situ degli IMC che può avvenire a livello subepiteliale, subendoteliale e mesangiale.

La risposta immunologica e glomerulare associata al deposito dipende da tipo, entità, sede e meccanismo patogenetico che lo caratterizzano ed esita in differenti pattern istopatologici. Per valutare tali anomalie è necessario analizzare i tessuti al microscopio ottico che può essere altamente suggestivo di GN, la microscopia elettronica è in grado di localizzare i depositi anche di piccole dimensioni e tramite l'immunofluorescenza è possibile risalire alla natura specifica del deposito (IgG, IgM, IgA e/o complemento o frammenti di questo) (Brown, 2011).

La GNM è la causa più frequente di SN nell'uomo ed è riportata nel 10-45% dei casi di GN nel cane, è l'esito della formazione in situ degli IMC, più comunemente include IgG e Ag presenti sul versante sub-epiteliale della membrana basale. La cellularità appare normale, ma è ben evidente un ispessimento della membrana basale dei capillari (fig.12). Il deposito sub-epiteliale induce l'attivazione dei fattori del complemento che danneggiano i podociti e tale insulto determina la formazione di radicali liberi e proteasi che portano al distacco della nefrina dall'actina del citoscheletro podocitario, con compromissione dell'integrità dello *slit diaphragm*, da cui deriva l'insorgenza di proteinuria (Brown, 2011).

La GNMP è la forma più frequente di glomerulonefrite riportata, ad oggi, nel cane. La percentuale dei casi riportati è del 20-60%. La definizione deriva dall'aspetto del glomerulo e dei suoi componenti, quando la sezione istologica viene analizzata alla microscopia ottica, in quanto la GNMP si caratterizza per un ispessimento della parete del capillare associata ad incremento della cellularità glomerulare, conseguenti al deposito di immunocomplessi (fig.13). A seconda della localizzazione del deposito è possibile riconoscere due forme di GNMP: tipo I, caratterizzata da deposito sub-endoteliale di IMC; tipo III quando il deposito si estende al mesangio e/o sub-epitelio ed, infine, il tipo II chiamata anche malattia da depositi densi, quando a depositarsi è il complemento in bande omogenee nella membrana basale glomerulare (MBG). Il tipo III sembra essere la forma più comune nei nostri animali domestici. Il deposito sub-endoteliale non è separato dal circolo ematico da una membrana basale, per tale ragione attiva il complemento ed è facilmente esposto ai granulociti neutrofili, macrofagi e piastrine circolanti. Tali linee cellulari producono mediatori dell'infiammazione come citochine, fattori di crescita e proteasi con attivazione della cascata coagulativa che esita in un grave danno dei capillari glomerulari, infiltrazione di cellule infiammatorie e proliferazione mesangiale (Nangaku M. and Couser W.G., 2005). Questo tipo di GN si caratterizza per l'incremento della cellularità con ispessimento diffuso e irregolare della parete dei capillari glomerulari. La cellularità è essenzialmente costituita da cellule mesangiali, proliferazione endoteliale e cellule infiammatorie intravascolari, inoltre l'incremento della matrice mesangiale può portare il ciuffo capillare ad assumere un aspetto globoso. Si può inoltre evidenziare uno sdoppiamento della membrana basale, legato prima all'infiltrazione di cellule mesangiali tra endotelio e membrana basale poi al deposito di una nuova membrana basale tra la matrice mesangiale e l'endotelio. La conferma viene data dalla microscopia elettronica che individua il deposito in sede sub-endoteliale. Tale deposito è facilmente accessibile a cellule infiammatorie e piastrine ed è associato a maggior danno delle

pareti capillari e maggior attivazione delle cellule glomerulari, che iniziano a proliferare nel tentativo di riparare il danno. L'insulto e l'attivazione delle cellule mesangiali determinano la proliferazione di questa linea cellulare associata a maggior deposito di matrice mesangiale. In alcuni casi di GNMP è possibile che le lesioni glomerulari assumano un aspetto particolare, per il quale vengono definite "a semiluna". Quest'ultime sono indicative di un danno glomerulare più grave perché causate da porosità, che si formano in modo patologico nella MBG danneggiata permettendo il passaggio di fibrinogeno e macrofagi nello spazio urinario. La fibrina e le cellule macrofagiche stimolano la proliferazione di cellule epiteliali parietali e fibroblasti in seguito alla quale si formano delle lesioni a semiluna (fig.17). Le glomerulonefriti che si presentano con un elevato numero di glomeruli coinvolti da questo tipo di lesioni sono tipicamente più aggressive e a decorso più rapido e vengono comunemente riscontrate in corso di nefrite di *Lyme*. In generale la GNMP può essere ad eziologia sconosciuta, ma più spesso conseguenza di patologie sistemiche e/o infettive, frequentemente associate a infezioni da *Staphylococcus spp.* e l'infezione spesso si risolve prima che compaiano i segni clinici del danno glomerulare (Brown, 2011). In medicina umana una *review* molto recente di Sethi e Fervenza, pubblicata sul "*The New England Journal of Medicine*", focalizza l'attenzione oltre che sulla classificazione "classica" di queste GN (GNMP I, II e III) che si basa sulla localizzazione del deposito, anche sul meccanismo patogenetico alla base. Ovvero, suddivide queste GN in GNMP mediata da immunocomplessi e GNMP mediata dal complemento. Nel primo caso la causa è il deposito di IMC dovuto a un'antigenemia persistente, come in corso di infezioni croniche per le quali l'esempio classico sono l'epatite B e C, ma non solo e che determinano la formazione di IMC circolanti che poi si depositano in diversi siti del glomerulo; oppure disordini autoimmuni con IMC circolanti, come l'artrite reumatoide o la *Sindrome di Sjorgen*; o secondaria a una paraprotidemia in corso di gammopatie monoclonali come in corso di discrasie plasmacellulari (plasmocitoma, mieloma multiplo), linfomi a cellule B, linfoma linfoplasmocitico, leucemia linfocitica cronica o la gammopatia monoclonale di significato sconosciuto (MGUS, *monoclonal gammopathy of undetermined significance*). Nel secondo caso invece vi è un'alterazione nel meccanismo di regolazione della cascata del complemento, che svolge un ruolo fondamentale nell'immunità innata, e la cui attivazione determina una risposta infiammatoria importante con chemiotassi di macrofagi, opsonine e induzione della lisi cellulare, inclusi gli agenti patogeni. Questo meccanismo di difesa prevede però anche una via alternativa di regolazione per evitare che sfugga al controllo provocando danni all'organismo, perdendo così la funzione di difesa. Nel caso di mutazioni delle proteine che entrano a far parte della cascata, o per la

presenza di autoanticorpi, contro queste stesse proteine, la cascata del complemento può sfuggire al controllo dei sistemi regolatori e determinare il deposito di prodotti derivati dal complemento o di frammenti delle proteine sopracitate a livello mesangiale o subendoteliale (Sethi S. and Fervenza F.C., 2012).

La GNMe è riportata avere una frequenza tra il 2-16% nel cane, come la GNMP e la GNM, è una patologia mediata dal deposito di immunocomplessi nell'area mesangiale. Tale deposito danneggia e attiva le cellule mesangiali presenti, che iniziano a proliferare e a produrre *transforming grow factor* (TGF)- β e *platelet derived growth factor* (PDGF), citochine e matrice extracellulare (Nangaku M. and Couser W.G., 2005). Istologicamente è caratterizzata da iperplasia delle cellule mesangiali, intesa come più di tre cellule per area mesangiale associata ad incremento della matrice mesangiale (fig.14). Poiché tali lesioni sono comuni anche in animali con una patologia renale cronica, caratterizzata da glomerulosclerosi, tale pattern deve essere confermato con la microscopia elettronica e l'immunofluorescenza, attraverso l'identificazione di depositi mesangiali che solitamente sono di immunoglobuline A (Brown, 2011).

La MCD deve il suo nome agli scarsi rilievi istopatologici che si evidenziano usando la microscopia ottica, tanto è vero che la diagnosi di MCD è possibile eseguirla solo previa valutazione della sezione al microscopio elettronico. Tale glomerulopatia è causa di circa il 15-20% delle sindromi nefrosiche idiopatiche nell'uomo adulto e della maggior parte di queste nei bambini. Raramente descritta nel cane per il numero ridotto di prelievi bioptici che si eseguono nella pratica clinica ed anche per la scarsa frequenza dell'utilizzo della microscopia elettronica in campo veterinario, se non a scopo di ricerca. Il danno si localizza principalmente ai podociti, che posseggono una limitata capacità di ripararsi o rimpiazzare quelli danneggiati. Il meccanismo con cui si instaura il danno non è molto conosciuto, ma sembrano essere coinvolti dei fattori solubili delle cellule T. Le persone colpite da MCD tendono a rispondere bene alla terapia con corticosteroidi, con un *range* dell' 80-90%. In rari casi la causa è la reazione avversa ad un farmaco e si può ottenere una rapida remissione sospendendo tale medicamento. Anche se i glomeruli appaiono normali al microscopio ottico, ci sono lesioni ultrastrutturali caratteristiche limitate alle cellule epiteliali glomerulari, che mostrano una perdita o un appiattimento diffuso dei processi podocitari, senza un'evidenza di depositi elettrondensi (fig.15). Frequentemente è possibile notare che i podociti vanno incontro ad una trasformazione villosa, che rappresenta una modifica aspecifica, ma comunque associata a proteinuria; tali cambiamenti sono reversibili se la causa primaria viene

eliminata e di conseguenza anche la proteinuria tende a ridursi d'entità o addirittura a risolversi (Brown, 2011).

L'FSGS è una lesione che deriva da un danno ai podociti. Si differenzia in maniera sostanziale dalla MCD perché le lesioni in questo caso, diversamente dalla MCD sono irreversibili. L'FSGS insorge come malattia glomerulare primaria nelle persone ed è la causa più frequente di SN nell'adulto. Come la MCD, quando associata a SN si pensa sia associata ad un danno immunomediato e la terapia immunosoppressiva può essere efficace nel trattamento. È stato inoltre proposto dalla comunità scientifica che la MCD e l'FSGS siano in realtà due evoluzioni diverse dello stesso spettro di patologie: la MCD secondaria ad un danno podocitario più lieve e reversibile, nel corso della quale raramente si ha la progressiva perdita di funzionalità renale; mentre l'FSGS è il risultato di una sclerosi focale secondaria ad un danno più grave con perdita irreversibile del podocita, per cui più facilmente si assisterà ad un progressivo deterioramento della funzionalità renale. Mentre di rado l'FSGS viene associata a SN nel cane, l'FSGS secondaria è un reperto prevedibile in corso di malattia renale cronica ed anche secondariamente ad un danno glomerulare primario. I segmenti sclerotici dei glomeruli colpiti mostrano un'iper cellularità mesangiale con espansione della matrice che porta ad un consolidamento delle anse periferiche dei capillari glomerulari. Allo stesso tempo, in corso di ipertrofia glomerulare, le cellule mesangiali e quelle endoteliali proliferano, il numero di podociti resta invariato, ma si assiste ad una riduzione della loro densità. Se i podociti non sono in grado di colmare questo incremento di superficie glomerulare, oppure se si staccano e vanno in apoptosi, una porzione della MBG resta esposta e si possono formare sinechie tra la porzione sclerotica del ciuffo capillare e la capsula di Bowman. La gravità della proteinuria in corso di FSGS può essere moderata, perché strettamente correlata al numero di nefroni funzionanti, e possono esserci evidenze di patologia renale. L'FSGS secondaria è una lesione aspecifica associata a malattia renale cronica, come l'infiammazione linfoplasmocitica interstiziale, fibrosi interstiziale, mineralizzazione della membrana basale, obsolescenza dei glomeruli, dilatazione e atrofia dei tubuli e iperplasia del dotto collettore (fig.16) (Brown, 2011).

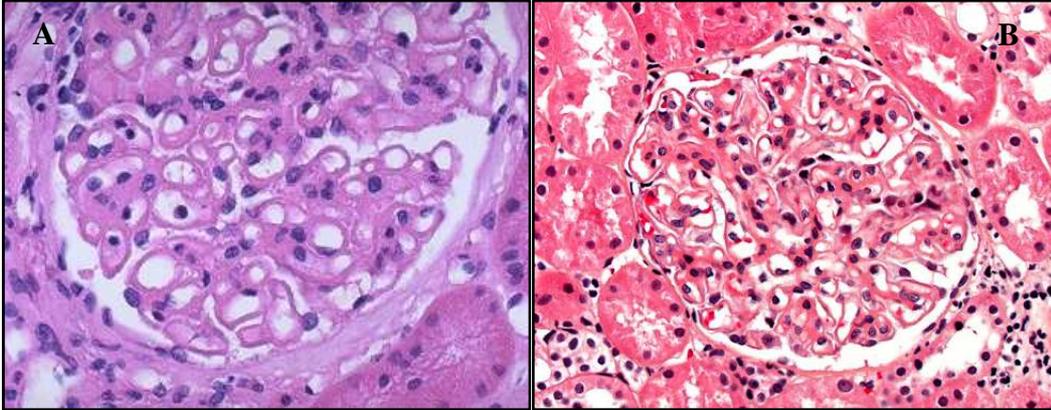


Figura 12 **GNM** **A**) (The University of Utah , 2012); **B**) (Virginia Commonwealth University, 2013) è visibile un inspessimento della parte dei capillari glomerulari senza un incremento della cellularità.

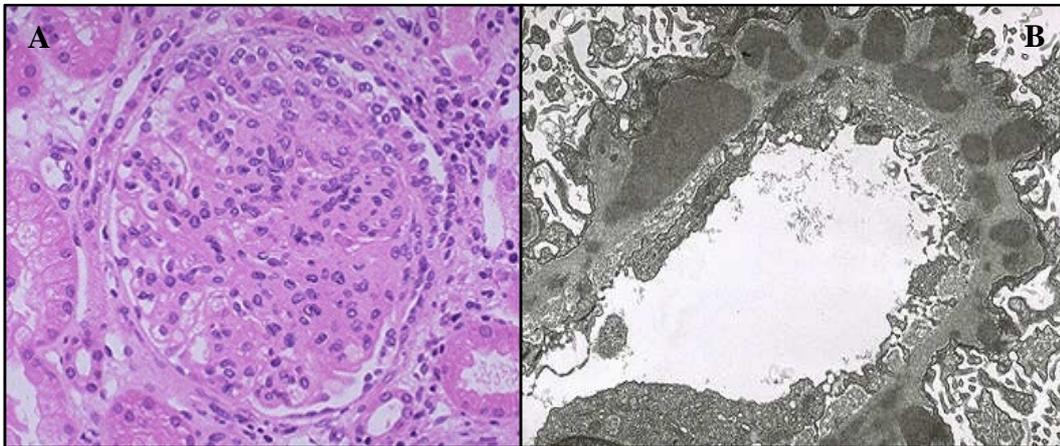


Figura 13 **GNMP** **A**) nel preparato istologico colorato con ematossilina e eosina è evidente un incremento della cellularità, prevalentemente mesangiale (University of Utah, 2013); **B**) Si visualizza alla microscopia elettronica la presenza di depositi elettrondensi di IMC con inspessimento della membrana basale (University of Utah, 2013).

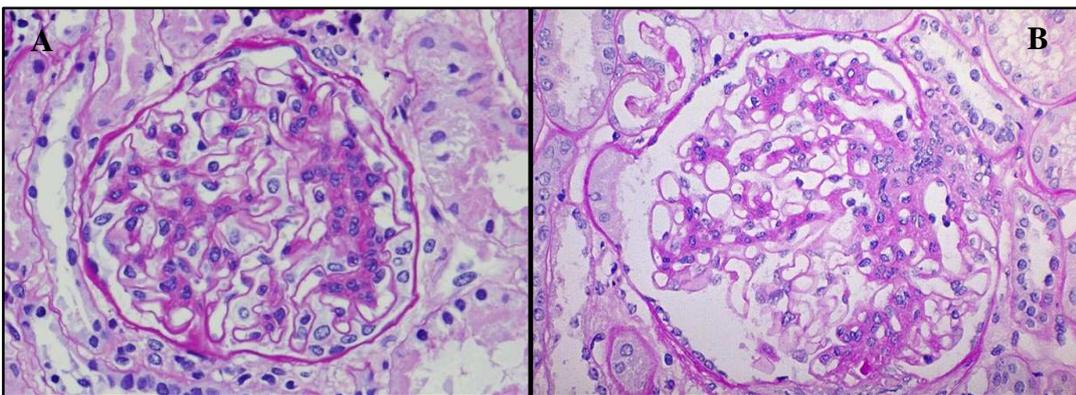


Figura 14 **GNMe** **A**) è possibile identificare un incremento della cellularità di tipo mesangiale con abbondante matrice mesangiale (Boonyarit Cheunsuchon, 2012); **B**) è visibile un aumento della componente mesangiale con un area sclerotica vicino al polo vascolare (Dieter Glatz, 2002).

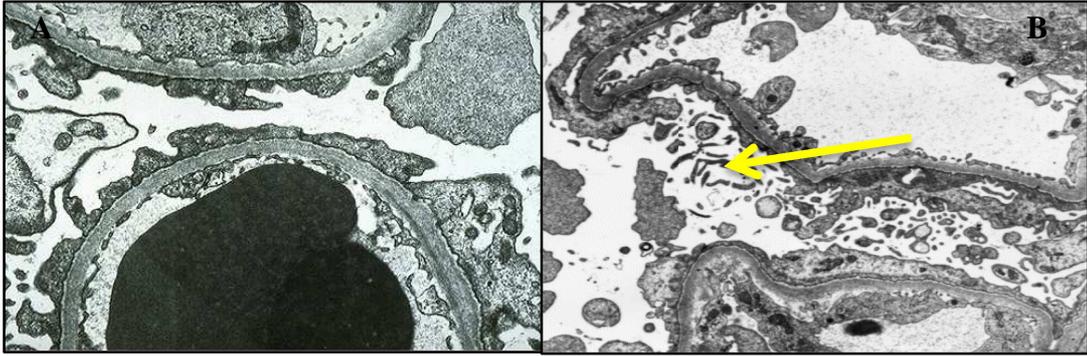


Figura 15 **MCD** **A**) alla microscopia elettronica sono visibili le fusioni tra i processi podocitari ed il distacco di alcuni detriti di questi (**University of Utah, 2013**); **B**) è visibile il distacco dei podociti (freccia gialla) dei podociti (freccia gialla) (**Medical Book Online, 2012**).

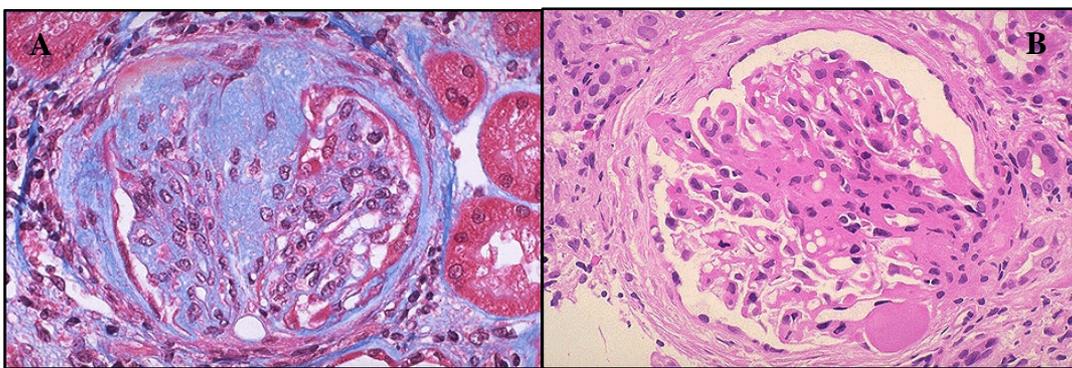


Figura 16 **FSGS** **A**) nella prima immagine una sezione istologica renale colorata con Tricromica di Masson che mette in evidenza il collagene (azzurro) (**University of Utah, 2013**); **B**) nel preparato colorato con ematossilina&eosina è evidente un'area di sclerosi al centro del glomerulo (**University of Utah, 2013**). Come dice il nome vengono colpiti solo alcuni glomeruli (focale) e solo alcune parti di questo (segmentale).

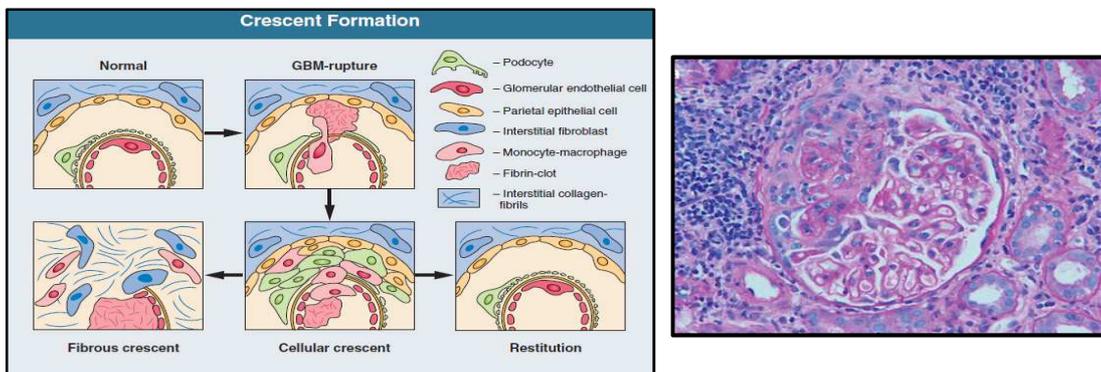


Figura 17 **GN "a semiluna"** **A**) modificato da (**Richard J. Johnson, 2010**) Nella formazione precoce delle lesioni a semiluna, citochine e fattori di crescita attraversano la membrana basale con conseguente proliferazione delle cellule epiteliali parietali. Piccole lesioni della MBG insorgono secondariamente ad un danno indotto da antiossidanti e proteasi dei neutrofili e macrofagi, permettendo in questo modo ai macrofagi stessi di passare nello spazio di Bowman, dove possono proliferare. I danni alla capsula di Bowman secondaria a flogosi periglomerulare possono instaurarsi determinando l'entrata di più cellule infiammatorie così come dei fibroblasti. La proliferazione di cellule epiteliali parietali, viscerali e dei macrofagi è associata alla deposizione di fibrina, che lentamente si accumula soffocando il ciuffo capillare, finché non riescono più ad infiltrarsi cellule infiammatorie. Nello stadio finale, le forme a semiluna diventano fibrotiche ed il glomerulo entra in uno stadio finale di malattia. In alternativa nei casi meno gravi, si può verificare la completa *restitutio ad integrum* del ciuffo glomerulare. **B**) Nell'immagine istologica è visibile una formazione semilunare fibrocellulare che occupa parte dello spazio di Bowman con presente una rottura focale a carico della capsula di Bowman; inoltre, nell'interstizio è presente abbondante infiltrato infiammatorio (**A Chang, 2007**).

4. Danno renale: rilievi clinico-patologici.

4.1 Revisione della letteratura veterinaria

Nel 1994 Koutinas e colleghi, oltre ad analizzare i campioni di biopsie renali di 14 cani affetti da leishmaniosi, di questi soggetti hanno eseguito una valutazione clinico-patologica comprendente esame emocromocitometrico completo (CBC), profilo protidemico ed analisi delle urine, includendo la misurazione quantitativa della proteinuria. I loro risultati erano suggestivi di proteinuria nel 100% dei soggetti, considerata grave (>500 mg/dl *dipstick*) nel 64%, con cilindruria in 10 su 14 cani, peso specifico inadeguato in 12 su 14 e anemia non rigenerativa in 13 su 14 casi. Inoltre segnalano iperprotidemia in 13 su 14 cani, iperfosfatemia e trombocitopenia in 4 su 10, rispettivamente. Sei dei 14 pazienti avevano una nefropatia cronica, due manifestavano solo poliuria e polidipsia, quattro avevano iperazotemia ed iperfosfatemia con i segni clinici tipici della malattia renale cronica, mentre il 57% si mostrava asintomatico (Koutinas A.F. K. V., 1994).

Un'analisi eseguita nel 1997 da Ciaramella e collaboratori su 150 cani all'ammissione, affetti da *Leishmania infantum* ha riscontrato nel 60% dei cani anemia scarsamente rigenerativa normocitica normocromica, nel 29.3% trombocitopenia e nel 24% leucocitosi neutrofilica. Nel 63.3% dei soggetti era presente iperprotidemia, con ipoalbuminemia nel 68%, iperglobulinemia nel 70.6% e riduzione del rapporto albumine/globuline (A/G) nel 76%. In 24 soggetti vi erano segni di insufficienza renale, con urea > 300 mg/dl e creatinina sierica > 10 mg/dl in 6 su 24. Il 16% dei cani aveva anche un lieve incremento delle transaminasi epatiche (Ciaramella P., 1997).

Palacio e altri sempre nel 1997 hanno pubblicato un lavoro scientifico su 15 cani malati e 8 sani come gruppo di controllo ed hanno evidenziato una differenza significativa tra i due gruppi per i livelli di urea e di creatinina sierica, che restavano però all'interno dell'intervallo di riferimento. Il gruppo di studio ha inoltre osservato una differenza significativa riguardo l'UPC e l'attività di alcuni enzimi urinari quali la gamma-glutamyl transpeptidasi (GGT), l'N-Acetil- β -D-glucuronidasi (NAG) e la β -glucuronidasi. All'interno del gruppo di studio vi era una correlazione significativa tra l'entità della proteinuria e l'attività enzimatica urinaria. In alcuni studi precedenti a questo è stato suggerito che la GGT urinaria sia un marker più utile di danno renale acuto, mentre il NAG e la β -glucuronidasi siano maggiormente associati ad un danno renale cronico (Palacio J., 1997).

Nel 1999 il gruppo greco di Koutinas e colleghi ha considerato 158 cani affetti da CanL, in un lavoro retrospettivo, con l'obiettivo di individuare i rilievi clinicopatologici principali in corso di tale patologia. Ciò che hanno riscontrato i ricercatori è anemia non rigenerativa normocitica normocromica nel 73.4% (116/158) dei soggetti, iperprotidemia con valori superiori a 12 g/dl nel 72.8% (115/158), proteinuria da lieve a grave nel 71.5% (98/137) ed azotemia nel 38.1% (24/63). In tre animali (1.9%) era presente una sindrome nefrosica, con edema sottocutaneo, ipercolesterolemia (>300 mg/dl) e ipoalbuminemia (<1.5 mg/dl) (Koutinas A.F., Polizopoulou Z.S., 1999).

Sempre Koutinas con altri collaboratori, nel 2001 ha pubblicato uno studio sull'efficacia dell'allopurinolo nel trattamento a lungo termine dei cani malati ed i reperti riportati più frequentemente all'ammissione erano riduzione del valore ematocrito, leucopenia con linfopenia, trombocitopenia, incremento delle proteine totali, iperglobulinemia con riduzione A/G, incremento di creatinina sierica, della BUN, del fosforo e dell'UPC con peso specifico urinario inadeguato (Koutinas A.F. S. M., 2001).

Zatelli e coautori nel 2003, riportano i risultati di uno studio eseguito su un gruppo di 41 cani infetti, sottoposti a biopsia renale e valutazione qualitativa della proteinuria tramite tecnica elettroforetica di SDS-AGE. L'analisi dei dati ottenuti evidenziano una proteinuria glomerulare non selettiva, con presenza di albumine, transferrina e IgG, nel 95.1% dei soggetti ed una proteinuria mista nel restante 4.9%. Gli autori riportano, inoltre, una correlazione tra il tipo di lesione istopatologica e il pattern elettroforetico (Zatelli A., 2003).

Uno studio molto interessante è quello condotto da Solano-Gallego e colleghi, pubblicato nel 2003, sul rilievo di anticorpi anti-Leishmania nelle urine di cani infetti. Su un totale di 95 campioni di urine, sono stati selezionati 50 cani con dati clinicopatologici completi e di questi 30 erano affetti da CanL e 20 da altre patologie. I 30 pazienti infetti sono stati poi suddivisi in due gruppi in base al riscontro o meno di anticorpi anti-Leishmania nelle urine e poi confrontati i dati clinicopatologici. Nel gruppo di cani (20/30) in cui era possibile rilevare anticorpi anti-leishmania sia nel siero che nelle urine, rispetto al gruppo (10/30) in cui si rilevavano solo nel siero, si evidenziava una differenza significativa a proposito di concentrazioni sieriche di gammaglobuline, alfa-1-globuline, albumine e rapporto A/G e riguardo all'UPC, più elevato nel primo gruppo, con un *range* di valori nel primo di 5.8 ± 5 contro 0.7 ± 0.6 rispettivamente (Solano-Gallego L., 2003).

Nello stesso anno un altro studio di Costa e collaboratori, ha considerato un gruppo di 55 cani, di questi 49 avevano parametri clinicopatologici completi e 22 di questi mostravano iperprotidemia, 21 iperglobulinemia e 30 ipoalbuminemia. Undici soggetti disponevano anche di analisi delle urine comprendenti la valutazione quantitativa della proteinuria, in base ai risultati delle quali si individuavano 6 soggetti proteinurici su 11 (*urinary proteine to creatinine ratio*, $UPC > 1$), 3 su 11 presentavano aumento della creatinina sierica (creatinina sierica, $sCr > 1 \text{ mg/dl}$) e 2 su 11 ipercolesterolemia (colesterolo $> 210 \text{ mg/dl}$) (Costa F.A.L., 2003).

Ancora, nel 2005 uno studio di Pasa e colleghi, con 7 cani affetti da CanL per il monitoraggio clinico e sierologico pre- e post- trattamento, ha mostrato come i soggetti all'ammissione avessero valori di PCV ed emoglobina inferiori all'intervallo di riferimento, associati ad ipoalbuminemia, iperglobulinemia, aumento dell'AST con creatinina sierica e BUN ancora nell'intervallo di riferimento (Pasa S., 2005).

Nel 2006 Cortadellas e altri, hanno valutato parametri clinici tra cui la pressione arteriosa e parametri clinicopatologici, inclusi emocromocitometrico, biochimica sierica, analisi delle urine con proteinuria quantitativa su 105 cani. Dai risultati è possibile concludere che in questo studio, il 49.5% dei cani ha un coinvolgimento renale associato ad un deficit funzionale, 82 di 105 sono proteinurici al dipstick urinario, di questi 34 hanno $UPC > 1$ (Cortadellas O. F.-d. T., 2006).

Plevraki e collaboratori nel 2006 hanno pubblicato i dati di un lavoro svolto per capire quali potessero essere le ripercussioni clinicopatologiche dell'allopurinolo nella terapia della CanL. I cani inclusi erano 40, 17 non proteinurici e non azotemici, 15 proteinurici asintomatici non azotemici e 8 proteinurici ed azotemici, intendendo per proteinurico $UPC > 1$. Inoltre in 27 sui 40 cani valutati è stata riscontrata iperprotidemia (Plevraki K., 2006).

Lo stesso anno, Reis e colleghi pubblicano uno studio su un campione di 40 pazienti canini in cui hanno valutato lo stato ematobiochimico. Ciò che è risultato dall'analisi degli accertamenti clinicopatologici è che vi era una differenza statisticamente significativa per la concentrazione di albumina sierica tra i cani che si mostrano asintomatici e quelli oligosintomatici e sintomatici, presentandosi più ridotta in questi ultimi; mentre vi era un incremento con altrettanta significatività statistica della concentrazione di globuline plasmatiche tra gli asintomatici e gli altri. Inoltre appariva ridotto anche il rapporto A/G. Altri parametri per i quali hanno trovato una differenza statisticamente significativa sono stati: il

numero di eritrociti, l'ematocrito (Hct) e l'emoglobina (Hb), che risultavano ridotti nel gruppo con malattia clinicamente evidente. Stesso comportamento per il numero di leucociti totali e gli eosinofili (Reis A.B., 2006).

Nel 2007 Ikeda-Garcia e altri, hanno riportato i dati raccolti su 8 cani all'ammissione e dopo il trattamento Leishmanicida con composti antimoniai. Degli 8 inclusi, in tre segnalano cilindruria, proteinuria e incremento dei valori di urea. Uno dei tre presentava una sindrome nefrosica. Due su otto erano iperprotidemici ed uno solo ipoprotidemico, verosimilmente perché gravemente malnutrito (Ikeda-Garcia F.A., 2007).

In una comunicazione breve, del 2008, Manna e colleghi discutono di un gruppo di 41 cani, da loro presi in esame. Divisi poi in 3 gruppi a seconda della sintomatologia clinica: esclusivamente lesioni cutanee, presenza di sola ematuria e cani con segni clinici di nefropatia grave. Gli autori dopo un'analisi dei risultati clinico-patologici segnalano una differenza statisticamente significativa tra i gruppi per valori di urea, creatinina sierica, proteine totali e globuline risultati più elevati nel gruppo dei nefropatici, con riduzione della concentrazione di albumine e A/G, tutti questi dati associati ad un peso specifico inadeguato ed una proteinuria più grave in tale gruppo rispetto agli altri due (Manna L., 2008).

Ginel e coautori, sempre nel 2008, pubblicano uno studio che ha come obiettivo valutare se esiste una correlazione tra i livelli di anticorpi anti-istoni (AHA) e la presenza di glomerulonefrite nei cani con CanL. Il gruppo era composto da 55 cani sani e 43 infetti e ciò che hanno riscontrato i ricercatori è la presenza di valori più elevati di creatinina sierica ed urea nei cani proteinurici ($UPC > 1$) con una correlazione positiva tra la proteinuria ed i livelli di AHA circolanti. Sugerendo quindi che questi potrebbero svolgere un ruolo nello sviluppo e nella progressione delle glomerulonefriti in corso di leishmaniosi canina (Ginel P.J., 2008).

In corso di malattia renale cronica notevole importanza, nella gestione del paziente, è rivestita dalle concentrazioni sieriche di fosforo. Uno studio del 2009 di Cortadellas ed altri, hanno analizzato 155 cani affetti da CanL e 54 cani sani come gruppo di controllo. I cani infetti sono stati suddivisi in 5 gruppi in base al valore di creatinina sierica e due sottogruppi nello stadio 1 ($sCr < 125 \mu\text{mol/l}$) sulla base dell'UPC. Ciò che hanno riscontrato analizzando i dati ottenuti è che la concentrazione sierica di fosforo aumenta progressivamente passando dallo stadio 0 allo stadio 4 con una percentuale di cani iperfosfatemici 12% nel gruppo 1 fino al 100% nello stadio 4. Inoltre la concentrazione sierica di fosforo ha una correlazione significativa e positiva con i valori di UPC, sCr e urea (Cortadellas O. F.-d. P., 2009).

Uno studio prospettico condotto da Maia e collaboratori, pubblicato nel 2010, che ha previsto l'infezione sperimentale di 12 cani e il loro *follow-up* per 6 mesi ha mostrato come, a partire dal sesto mese post-inoculazione, si verificasse nei soggetti la comparsa di un titolo anticorpale, inversione del rapporto A/G, riduzione della conta leucocitaria e piastrinica, con contemporaneo e progressivo incremento della carica parassitaria. La milza è risultata essere inoltre l'organo a più elevata carica (Maia C., 2010).

Nel 2011, Coural-Vital e coautori hanno pubblicato i dati di uno studio sulla risposta umorale e cellulare in corso di infezioni naturali da *Leishmania infantum*. Hanno riscontrato che i cani con sintomatologia clinica presentavano una concentrazione significativamente ridotta di emoglobina rispetto al gruppo di controllo di cani sani e agli asintomatici, oltre a valori ridotti di Hct ed un più basso numero di eritrociti rispetto al gruppo di controllo ed agli asintomatici positivi alla PCR e negativi a IFI *Leishmania spp.*. Questo suggerisce che l'insorgenza di sindrome anemica in questi pazienti, a diversa eziologia, possa essere determinante per la comparsa o meno della sintomatologia (Coura-Vital M., 2011).

Un altro studio del 2011 di Torres e altri riconferma l'alterazione del profilo protidemico che si verifica in corso di una malattia infettiva come la CanL, come per altre malattie infettive, con elevate concentrazioni di proteine plasmatiche e globuline, che dopo il trattamento tendono a calare fino a rientrare negli intervalli di riferimento del laboratorio, con contemporanea riduzione del titolo anticorpale (Torres M., 2011).

Figueredo e colleghi nel 2012 riportano con quale frequenza sono presenti le alterazioni cliniche e clinicopatologiche nei cani brasiliani infetti catturati per il controllo della malattia. Il lavoro si basa sui dati raccolti su un campione di 17 esemplari e le alterazioni ematologiche più frequenti sono 82.4% trombocitopenia, 70.6% anemia, 52.9% riduzione PCV e 41.2% eosinofilia (Figueredo L.A., 2012).

Uno studio molto interessante, anche per le ripercussioni cliniche pratiche, è quello pubblicato nel 2012 dal gruppo di Geisweid e altri ricercatori, in cui analizzando un gruppo di 72 cani affetti da CanL, hanno voluto identificare quali fossero i fattori prognostici per i pazienti affetti da tale patologia. Circa il 51% dei cani era proteinurico (UPC>0.5 o dipstick positivo per proteine) all'ammissione, il 40% ipoalbuminemico (albumine sieriche <2.5 g/dl), 36.8% iperglobulinemico, il 31.6% azotemico (creatinina sierica > 117 µmol/l con USG <1025), il 31% trombocitopenico, il 30% anemico ed il 28.7% linfopenico. In questo studio hanno

concluso che i fattori prognostici negativi in corso di leishmaniosi canina sono la presenza di proteinuria, ipoalbuminemia, azotemia e linfopenia (Geisweid K., 2012).

Nel 2012, il gruppo di lavoro di Ceròn ha indagato il comportamento dell'adiponectina sierica ed urinaria in 64 cani affetti da malattia renale in corso di leishmaniosi. L'adiponectina è una proteina con un peso molecolare di 30 kDa che sembra essere coinvolta nella funzione glomerulare e sembra possa essere utilizzata come marker precoce di danno glomerulare. In questo lavoro gli autori hanno individuato, sulla base degli approfondimenti clinicopatologici, 42 cani proteinurici (UPC>0.5), di questi 11 erano iperazotemici (sCr > 1.4 mg/dl) e 31 normoazotemici. Inoltre affermano che i livelli di adiponectina sierica sono più elevati nei cani azotemici rispetto a quelli normoazotemici ed è stata osservata una correlazione positiva tra adiponectina sierica ed urinaria con la creatinina sierica, l'UPC, l'UAC e il rapporto adiponectina urinaria:sierica. In questo studio concludono che l'adiponectina nelle urine aumenta all'incrementare dell'UPC come nell'uomo e la patogenesi può essere duplice: maggior passaggio di questa proteina attraverso il filtro glomerulare con saturazione dei meccanismi di riassorbimento tubulare, quindi possibile utilizzo come marker di danno glomerulare, oppure, considerando che questa proteina riveste i capillari glomerulari e le arteriole intrarenali, la sua presenza nelle urine può indicare la presenza di un danno vascolare, in modo ancora più precoce rispetto all'albuminuria (Tvariionaviciute A., 2012).

Nel 2013 Athanasiou e altri hanno pubblicato i dati raccolti su 12 cani dei quali hanno seguito il follow-up durante la terapia leishmanicida. All'ammissione il 91.7% era iperglobulinemico con riduzione del rapporto A/G, il 75% presentava una riduzione dell'ematocrito (Hct), il 66.7% riduzione della concentrazione emoglobinica (% Hb), il 58.3% era iperprotidemico e ipoalbuminemico, ed il 16.7% aveva trombocitopenia, linfopenia o linfocitosi, neutrofilia e incremento della creatinin-kinasi (CK). I parametri che si modificavano in corso ed al termine della terapia in maniera statisticamente significativa sono stati l'Hct e la % Hb (Athanasiou L.V., 2013).

Un lavoro di Aprile 2013, di Saridomichelakis e colleghi, ha valutato la funzionalità tiroidea in corso di Leishmaniosi, prima e dopo il trattamento leishmanicida. Questo perché in passato era stata avanzata l'ipotesi che l'ipotiroidismo potesse essere o un fattore predisponente per lo sviluppo della leishmaniosi "clinica" o una conseguenza di questa per distruzione del tessuto tiroideo in seguito ad infiltrazione di macrofagi parassitati. Gli autori hanno considerato un gruppo di 36 cani, sottoposti a indagine ematobiochimica e misurazione di T4, fT4 e TSH

prima dell'inizio della terapia, dopo 7-20 giorni e dopo 21-35 giorni. Ciò che concludono i ricercatori sulla base dei dati ottenuti è che l'ipotiroidismo, seppur segnalato in corso di Leishmaniosi canina non è né un fattore predisponente né una conseguenza della malattia (Saridomichelakis M.N., 2013).

Autori	Anno	N° casi studio + ctr	Ematologia	Biochimica	Analisi Urine
Koutinas et al.	1994	14	Anemia 13/14, trombocitopenia 4/10	Iperprotidemia 13/14, iperfosfatemia 4/10	100% proteinuria, 12/14 PS inadeguato
Ciaramella et al.	1997	150	60% anemia, 29.3% trombocitopenia, 24% leucocitosi neutrofilica	63.3% iperprotidemia, 68% ipoalbuminemia, 70.6% iperglobulinemia, 76% ↓ A/G, 24/150 insufficienza renale	n.d.
Koutinas et al.	1999	158	73.4% anemia normocromica normocitica	72.8% ipeprotidemia, 38.1% azotemico, 1.9% SN	71.5% proteinurico
Zatelli et al.	2003	41	n.d.	n.d.	95.1% proteinuria glomerulare non selettiva; 4.9% proteinuria mista
Costa et al.	2003	55	n.d.	30/49 ipoalbuminemico, 22/49 ipeprotidemico, 21/49 ipeglobulinemico, 3/11 ↑ creatinina, 2/11 ipercolesterolemico	6/11 proteinurico,
Cortadellas et al.	2006	105	n.d.	49.5% deficit funzionalità renale	82/105 proteinurico al dipstick 34/82 UPC>1
Geisweid et al.	2012	72	31% trombocitopenico, 30% anemico, 28.7% linfopenico	51% ipeprotidemico, 40% ipoalbuminemico, 36.8% iperglobulinemico, 31.6% iperazotemico	n.d.
Athnasiou et al.	2013	12	75% ↓ HCT, 66.7% ↓ Hb%, 16.7% trombocitopenia, linfopenia-linfocitosi	91.7% iperglobulinemia, 58.3% iperprotidemico e ipoalbuminemico.	n.d.

4.2 Revisione della letteratura umana

Anche in medicina umana sono diversi i lavori che analizzano le diverse alterazioni clinicopatologiche in corso di leishmaniosi.

Uno dei lavori meno recenti riguardo al danno renale in corso di leishmaniosi viscerale nell'uomo è del 1985, pubblicato da Dutra e colleghi, su 50 pazienti malati. Nel 51% dei casi vi era proteinuria e/o microematuria o piuria, nel 57% l'escrezione urinaria di proteine delle 24 ore risultava elevata. All'esame istopatologico si evidenziava un coinvolgimento tubulo-interstiziale per tutti i sette pazienti sottoposti a biopsia (Dutra M., 1985).

Nel 2003 Salgado e collaboratori in un gruppo di 11 pazienti con LV hanno individuato ematuria nel 63.3% dei soggetti analizzati, di questi il 45.4% presentava ematuria macroscopica, il 90.9% era proteinurico, l'81.5% microalbuminurico con incremento della *retinol-binding protein urinaria* (urRBP) nel 54.5%. Inoltre tutti i pazienti si presentavano iperglobulinemici e ipoalbuminemici, con incremento dei livelli di IgG nel 100%, IgM nel 45.4% e IgA nel 36.3% (Salgado Filho N., 2003).

Lima Verde e colleghi, nel 2007, hanno pubblicato i dati di uno studio in cui sono stati considerati 50 pazienti con la forma viscerale o *kala-azar*. Tutti avevano anemia con una differenza significativa tra il gruppo malato e il gruppo di controllo sano per la concentrazione di emoglobina, albumine, γ -globuline, urea, potassio e sodio. L'ipoalbuminemia era presente nel 98% dei pazienti, con riduzione del GFR in un terzo dei pazienti. Inoltre nel 68% delle persone era stato rilevato un deficit della capacità di concentrare le urine (Lima Verde F.A.A., 2007).

Daher e coautori, hanno analizzato un gruppo di 57 pazienti, il 26.3% (15/57) di questi aveva un danno renale acuto e tre soggetti sono deceduti (Daher EF E. L., 2008).

Sempre lo stesso gruppo di ricerca, nel 2009 ha pubblicato i dati di uno studio di confronto tra 55 pazienti con *kala-azar* e 20 pazienti sani come gruppo di controllo. Ciò che hanno riscontrato è una differenza statisticamente significativa nella concentrazione di albumine sieriche, più basse nel gruppo patologico, associata ad un incremento delle globuline. Inoltre, nei pazienti malati era presente proteinuria di cui il 17.1% erano albumine, il 48.3% γ -globuline, il 18% β -globuline, l'11.2% α 2-globuline e il 5.4% α 1-globuline. Ciò che di interessante hanno rilevato è che tutti i pazienti avevano livelli di β 2-microglobulina aumentati sia nel plasma che nelle urine, ma di questi però il 27.8% possedeva concentrazioni plasmatiche ancora potenzialmente all'interno della capacità di riassorbimento del tubulo, quindi il suo riscontro nelle urine può indicare la presenza di un danno tubulare. Inoltre nel

gruppo di studio il 29% aveva un incremento della kaliuresi, il 27.2% riduzione del riassorbimento tubulare di potassio e il 41.8% del magnesio. Inoltre, nel 34.5% dei pazienti si è osservata un'aumentata perdita di glucosio con le urine e anche di acido urico nel 60.2%. Nel 73% dei pazienti si evidenziava un incremento delle IgG sieriche ed il 70% anche delle IgG urinarie. La presenza di IgG nelle urine può essere la conseguenza di un "overflow", ovvero un'aumentata concentrazione plasmatica e quindi un'iperfiltrazione renale, oppure può essere dovuto ad un deficit di riassorbimento tubulare. In conclusione in questo studio sostengono che, come dimostrato in precedenza in corso di altre patologie in cui si ha un aumento delle IgG sieriche, ad esempio in corso di alcune neoplasie secernenti quali il plasmocitoma o il mieloma multiplo, le stesse immunoglobuline sono causa di danno tubulare con diversi meccanismi patogenetici (Lima Verde FAA, Lima Verde FA, 2009).

In 224 pazienti invece, Oliveira e colleghi hanno osservato nel 33.9% di questi un danno renale acuto (*acute kidney injury* - AKI) e di questi il 34.2% aveva la creatinina sierica > 1.4 mg/dl già al momento dell'ammissione, il 51.3% ha sviluppato AKI dopo il trattamento con amfotericina B, il 9.2% dopo l'inizio della terapia con composti antimoniali (Glucantime®) ed il 5.3% in seguito a complicazioni delle patologie concomitanti alla LV da cui erano affetti i pazienti. Inoltre hanno riscontrato una minor incidenza di insorgenza di danno renale acuto nel gruppo di pazienti sottoposti a terapia con Glucantime rispetto a quelli trattati con amfotericina B. Il 13.3% dei pazienti di questo studio è deceduto, con una percentuale del 30.3% nel gruppo AKI rispetto al 4.7% del gruppo non-AKI. Concludono infine che, come già supposto, la presenza o meno di coinvolgimento renale influenza la prognosi ed inoltre individuano dei fattori di rischio per questi pazienti, ovvero oliguria, ittero, dispnea e l'utilizzo dell'amfotericina B (Oliveira MJC, 2010).

Nello stesso anno Elnjomi e colleghi hanno pubblicato i dati di uno studio su 88 pazienti dei quali hanno valutato la presenza di microalbuminuria (MA), intesa come una quantità di albumine urinarie pari a 30-300 mg/gg, e della *retinol-binding protein* urinaria (urRBP) (Elnjomi NAA, 2010). Quest'ultima, da alcuni studi precedenti, si era dimostrata un buon marker di danno tubulo-interstiziale, perché è una proteina a basso peso molecolare (21 kDa) che normalmente viene riassorbita totalmente e catabolizzata dalle cellule tubulari attraverso un meccanismo di endocitosi mediato da uno dei recettori tubulari, la megalina. Elevati livelli di urRBP riflettono una disfunzione del tratto prossimale del tubulo e quando associata ad albuminuria si parla di proteinuria tubulare. Per tale motivo la misurazione di questa può svolgere un ruolo determinante nell'individuare danni renali prevalentemente localizzati al tubulo-interstizio (Ball S.T., 2003). Nel lavoro del 2010, quindi, hanno individuato MA nel

40% dei campioni tramite tecnica ELISA e nel 42% con il metodo immunoturbidimetrico, con creatinina ed urea nell'intervallo di riferimento per tutti i soggetti, mentre nessuno di questi aveva livelli rilevabili di urRBP, ad indicare un coinvolgimento principalmente glomerulare (Elnojomi NAA, 2010).

Nel 2011 Daher e colleghi prima, Oliveira e altri qualche mese più tardi, pubblicano dati simili ottenuti analizzando due diverse popolazioni. Il primo gruppo di ricerca ha considerato 14 pazienti con leishmaniosi viscerale trattati con Glucantime, sui quali hanno eseguito dei test per valutare la capacità di acidificare e concentrare le urine, hanno stimato la velocità di filtrazione glomerulare (*glomerular filtration rate* = GFR) ed hanno misurato la frazione di escrezione di sodio e potassio, oltre alla *clearance* dell'acqua libera. I risultati indicano che vi è un deficit della capacità di concentrare e acidificare le urine prima di iniziare il trattamento e alcune di queste alterazioni sono reversibili trattando con terapia leishmanicida. Infatti, la capacità di concentrare le urine viene recuperata, mentre quella di acidificare resta deficitaria, indicando quindi un danno tubulare parzialmente reversibile, verosimilmente dipendente da localizzazione, estensione del danno e dal tipo e dalla tempestività del trattamento (Daher EF R. N., 2011). Il secondo gruppo di ricerca, invece, ha considerato un gruppo di 37 pazienti con leishmaniosi cutanea non ancora trattati con Glucantime e 10 pazienti sani di controllo. Il 77% mostrava un'incapacità di concentrare ed il 40.5% di acidificare le urine, mentre 5 su 37 pazienti presentavano entrambi i deficit. Su 34 dei 37 pazienti inclusi nello studio, è stata misurata anche l'albumina urinaria ed il 35.3% si è rivelato essere microalbuminurico. In questo lavoro hanno inoltre misurato l'espressione dell'acquaporina 2 (AQP2) del tubulo collettore e del co-trasportatore Na-K-2Cl (NKCC2) tramite la valutazione degli esosomi urinari ed hanno riscontrato una più bassa espressione di AQP2 e più alta di NKCC2 nei pazienti malati a sostegno dell'ipotesi che vi sia un danno tubulare tale da determinare un'incapacità di concentrare le urine anche in pazienti in cui la forma è apparentemente solo cutanea. Perciò il coinvolgimento renale in seguito all'infezione può coesistere, con meccanismi diversi, alcuni di questi non ancora ben chiariti (de Oliveira RA, 2011).

Sempre Oliveira e altri colleghi, nel 2012 hanno valutato la funzionalità renale in 37 pazienti con la forma cutanea di leishmaniosi e trattati con Glucantime confrontandoli con 10 pazienti sani. I ricercatori hanno evidenziato nel 35% dei pazienti microalbuminuria, mentre post-trattamento la percentuale si riduceva all'8%. Nel 77% vi era l'incapacità di concentrare le urine, ma post-trattamento questo deficit era presente nell'88% dei soggetti mentre il deficit di acidificazione delle urine all'ammissione è stato rilevato nel 40% dei pazienti, mentre a fine terapia nel 16%. Ciò ad indicare che trattando il paziente con terapia leishmanicida alcune

alterazioni della funzionalità tubulare possono ridursi o risolversi, avanzano inoltre l'ipotesi che in pazienti in cui non è presente la forma viscerale, può esserci comunque un difetto di funzionalità renale legato all'attivazione umorale del soggetto (Oliveira RA, 2012). Tali dati sono comunque in contrasto con ciò che ha riportato Daher solo un anno prima, nel quale si evidenziava un recupero della capacità di concentrare, ma non di acidificare le urine.

In uno studio sui fattori associati alla letalità in corso di Leishmaniosi viscerale, Madalosso e coautori, includono 376 pazienti ed il 14.1% di questi va incontro a decesso, di cui il 69% dei pazienti presentava un'età superiore ai 60 anni di età. I fattori clinicopatologici associati ad un outcome sfavorevole in questo studio sono: trombocitopenia (piastrine, $PLT < 100,000 \text{ mm}^3$), ipoalbuminemia, iperbilirubinemia (bilirubina $> 2 \text{ g/dL}$), incremento AST e anemia grave ($Hb < 5 \text{ g/dL}$) (Madalosso G., 2012).

Uno studio recente di Liborio e collaboratori, ha preso in esame 146 pazienti pediatriche (sotto i 14 anni di età) in modo retrospettivo per valutare quale fosse l'incidenza del danno renale acuto e quali i fattori prognostici negativi per l'insorgenza di AKI. Il 45.9% dei pazienti era affetto da AKI, di cui il 59.7% già al momento dell'ammissione in ospedale, mentre il 40.3% lo ha sviluppato dopo l'inizio del trattamento. Il 44.8% dei pazienti con AKI ha avuto una remissione completa prima della dimissione, gli autori hanno inoltre riscontrato una maggior prevalenza di AKI nei pazienti più giovani con una differenza statisticamente significativa. Considerando la classificazione RIFLE pediatrica (pRIFLE), quindi la classificazione del danno renale acuto nell'uomo adattata al paziente pediatrico, il 67.2% era nello stadio R (*Risk*), il 31.3% nello stadio I (*Injury*) e l'1.5% nello stadio F (*Failure*). Il 3.3% dei bambini è deceduto. I fattori di rischio indipendenti individuati sono l'ipoalbuminemia, l'iperglobulinemia e le infezioni secondarie. Il decesso è avvenuto in tre casi in seguito a sepsi e in un caso per complicazioni emostatiche (Liborio AB, 2012).

Rocha e collaboratori, riportano uno studio retrospettivo su 432 pazienti giovani e adulti. Il 37% presenta AKI, con una maggior numero di pazienti nella classe R per i bambini, maggior numero invece nelle classi I ed F per gli adulti. I fattori di rischio individuati sono la presenza di ipokaliemia, leucopenia, l'utilizzo di amfotericina B e l'insorgenza di tremori negli adulti, mentre solo le infezioni secondarie nei bambini (Rocha NA, 2013).

In conclusione possiamo dire che in medicina veterinaria i rilievi clinicopatologici più frequentemente riportati sono: alterazione del profilo protidemico caratterizzata da iperprotidemia, ipoalbuminemia, iperglobulinemia e riduzione del rapporto A/G, anemia non rigenerativa, trombocitopenia, iperazotemia associata a peso specifico urinario inadeguato e

una proteinuria da lieve a moderata, fino alla comparsa di sindrome nefrosica. L'alterazione del profilo protidemico può avere diversi meccanismi patogenetici che spesso sono concomitanti, ovvero una risposta infiammatoria sistemica con incremento delle globuline e riduzione delle albumine, ipoalbuminemia secondaria alla presenza di una proteinuria moderata-grave o ipoalbuminemia associata a malnutrizione. L'anemia può anch'essa essere dovuta alla risposta infiammatoria concomitante alla nefropatia cronica che spesso accompagna la CanL, a sanguinamenti gastroenterici cronici legati all'infezione stessa o all'iperazotemia se presente, in questo caso si tratta di un'anemia sideropenica, oppure a un deficit di eritropoietina quando la nefropatia è in stadio avanzato. L'origine della trombocitopenia può essere multifattoriale, quindi dovuta ad un meccanismo immunomediato con distruzione periferica delle piastrine o dei precursori midollari, meccanismo che è alla base di danno anche in altri organi (rene, occhio, articolazioni); ad una ridotta produzione per soppressione midollare; ad un consumo secondario ad una coagulazione intravasale disseminata o, meno probabilmente, ad una perdita. L'iperazotemia è dovuta principalmente a un danno tubulo-interstiziale associato a coinvolgimento glomerulare con insorgenza di proteinuria a diversi stadi di gravità, come vedremo nel prossimo capitolo.

In medicina umana i rilievi più frequenti riportati sono l'iperprotidemia associata a ipoalbuminemia, iperglobulinemia e riduzione dell'A/G, anemia, microalbuminuria e deficit di concentrare e acidificare le urine. I meccanismi con cui sviluppano alterazioni del profilo protidemico ed ematologico sono simili a quelli che si instaurano nei nostri animali ed il diverso coinvolgimento renale si può ragionevolmente giustificare se si pensa che il danno a carico di quest'organo è principalmente tubulo-interstiziale nell'uomo rispetto al cane nel quale i rilievi istopatologici localizzano il danno più grave al glomerulo.

5. La proteinuria

Quando si parla di proteinuria, in termini generali, si intende la presenza di proteine nelle urine. Normalmente possono essere presenti albumine, mucoproteine e frammenti di immunoglobuline, ma solo quando la concentrazione di queste è abnorme si può parlare di proteinuria. Solitamente le proteine sieriche vengono trattenute dal filtro glomerulare nel circolo ematico attraverso un meccanismo di permselectività, che dipende da dimensioni molecolari, carica elettrica e configurazione sterica della proteina (D'amico G. and Bazzi C., 2003). Le proteine plasmatiche che, in condizioni fisiologiche, superano comunque questa barriera vengono riassorbite e metabolizzate dalle cellule tubulari, gli amminoacidi così ottenuti verranno recuperati a formare nuove proteine. La gran parte di questo lavoro è svolto dalle cellule che rivestono il tubulo contorto prossimale (Harley L. and Langston C., 2012) (Grauer G.F., 2011).

5.1 La struttura glomerulare

La barriera di filtrazione glomerulare è costituita da tre strati fondamentali: l'endotelio fenestrato, la membrana basale e i podociti, che rivestono la faccia viscerale dei capillari glomerulari (fig.18). L'**endotelio** fenestrato ha piccoli pori di 50-100 nm che prevengono il passaggio delle cellule ematiche dal circolo alla pre-urina, ciò che impedisce invece il passaggio della maggior parte delle proteine plasmatiche è la carica negativa fornita dai proteoglicani; queste sostanze contribuiscono ad una proprietà fondamentale del filtro glomerulare, ovvero la permselectività. La **membrana basale** (MBG) è una struttura trilaminare, spessa 100 nm, costituita da collagene tipo IV, proteoglicani, laminina, fibronectina e acqua. La MBG ha una conformazione a reticolo microfibroso di gel idratato che assicura una barriera di carica e dimensioni, grazie ai proteoglicani che sono responsabili della carica negativa, mentre il collagene tipo IV forma una maglia responsabile della selezione sulla base delle dimensioni delle molecole. I **podociti** invece presentano delle digitazioni principali da cui si staccano pedicelli secondari tra loro uniti da una struttura che viene definita *Slit Diaphragm*. I podociti (fig.19) sintetizzano la membrana basale e fagocitano le sostanze che restano intrappolate nel filtro glomerulare, mentre il rivestimento di

sialoglicoproteine che li avvolge fornisce la carica negativa (Chew D.J., 2011). I pori che si formano tra le interdigitazioni dei podociti sono di 4-14 nm.

Lo *Slit Diaphragm* (SD) è una struttura, simile ad una cerniera, di materiale elettrondenso membranaceo che è unito ai processi podocitari ed assume una conformazione a “zig-zag”. Diversi studi descrivono lo SD come una struttura rigida con diametro relativamente costante, composto da un complesso di proteine (Zhang A. and Huang S., 2012). Può essere diviso in tre parti:

- extracellulare: la parte delle proteine transmembrana extracellulare;
- transmembrana: la parte di proteine transmembrana e le proteine associate alla membrana dei podociti;
- intracellulare: parte delle proteine transmembrana poste nel citoplasma.

Le proteine principali costituenti lo SD sono: la nefrina, la NEPH1, l’actina, la podocina, la proteina CD2 associata, la P-caderina e l’integrina; ve ne sono anche altre transmembrana e di membrana, ma con un ruolo ancora da definire nei processi patologici (fig.20).

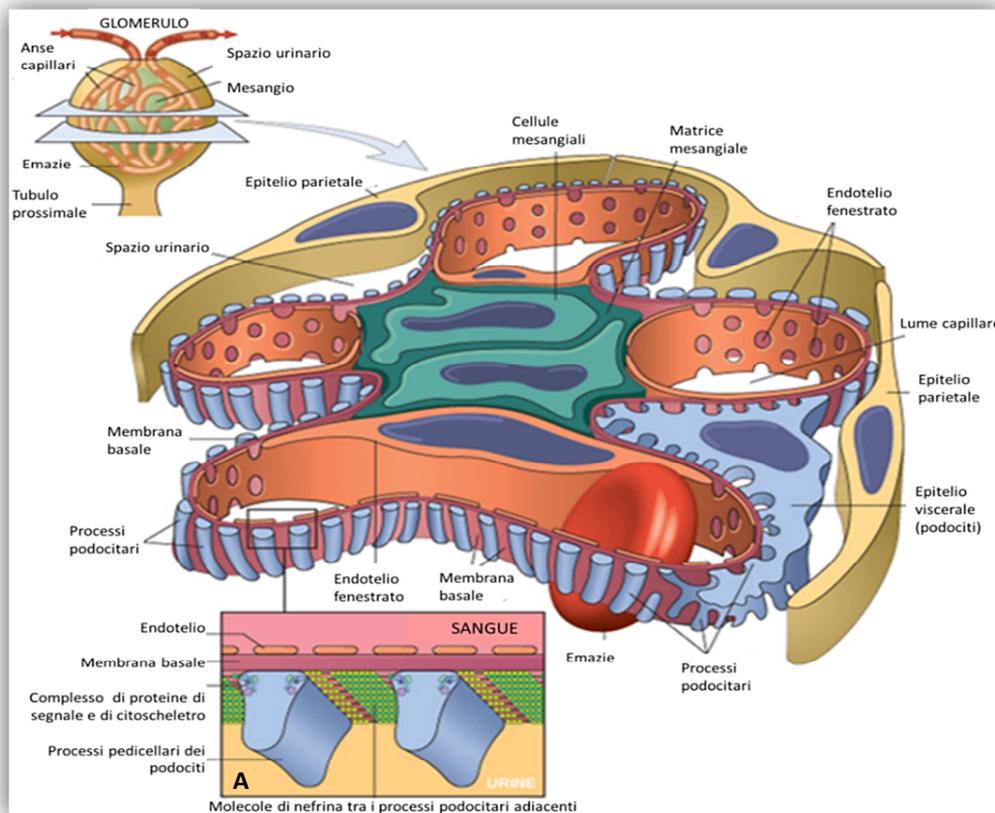


Figura 18 nell'immagine una riproduzione del glomerulo in sezione; A) a maggior ingrandimento la struttura dello *slit diaphragm* tra i podociti.

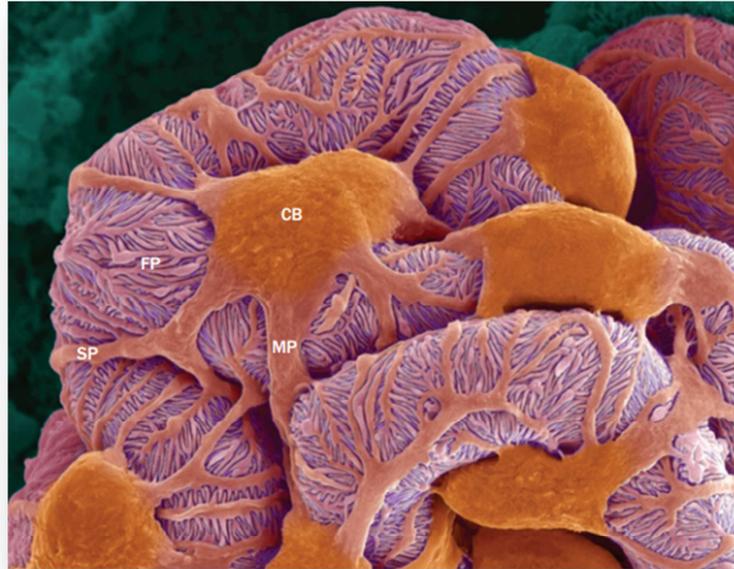


Figura 19 la scansione alla microscopia elettronica dei podociti nel glomerulo, mette in evidenza il corpo cellulare (*cell body* - CB), i processi podocitari principali (*major process* - MP) e quelli secondari (*secondary process* - SP) e infine le interdigitazioni più piccole (*foot process* - FP) tra i processi secondari modificata da (Welsh G.I. and Saleem M.A., 2012).

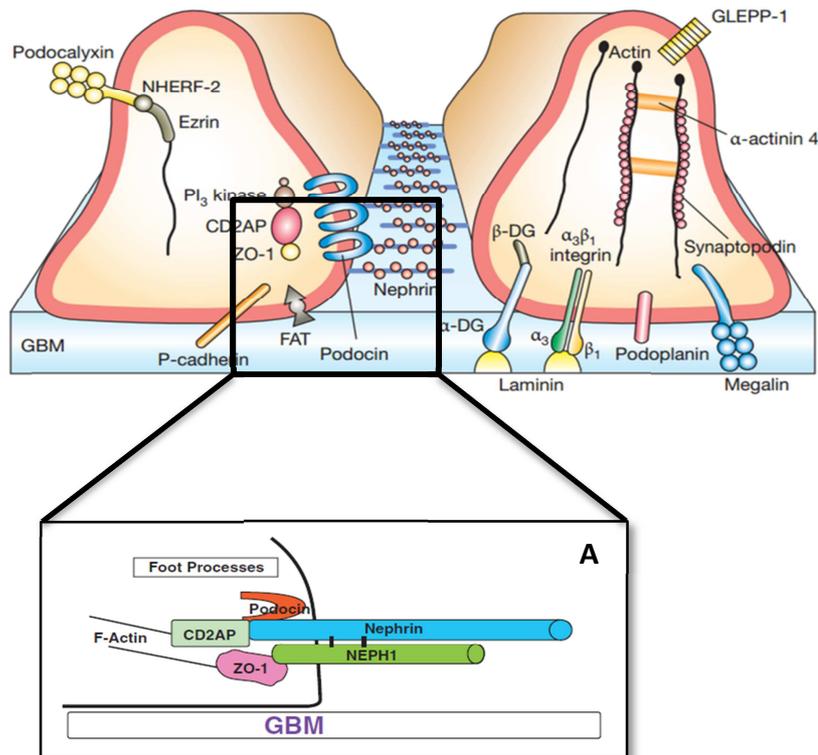


Figura 20 rappresentazione grafica dello *slit diaphragm* (National Kidney Foundation, 2008), A) modello schematico dell'organizzazione dello SD. La nefrina e la NEPH1 sono proteine transmembrana, la podocina che ha una struttura a U. La nefrina interagisce con la proteine CD2 associata (CD2AP), la podocina e la NEPH1. La podocina interagisce anche con la CD2AP, mentre la NEPH1 con nefrina e la zonula occludente (ZO1). L'α-actina 4 è una proteina intracitoplasmatica associata alla nefrina. GMB, glomerulare membrane basemente-membrana basale glomerulare (Kawachi H., 2006).

Diversi studi eseguiti per comprendere il reale funzionamento dello *Slit Diaphragm* hanno evidenziato come questo sia la vera prima barriera per il passaggio delle macromolecole, i filamenti che creano un ponte tra i processi podocitari hanno dimensioni da 40 a 140 Å in sezione trasversa e 70 Å in lunghezza (Kawachi H., 2006). La nefrina fa parte della superfamiglia delle immunoglobuline e mutazioni del gene deputato alla sua sintesi inducono lo sviluppo di forme di nefropatia proteino-disperdenti congenite, come la sindrome nefrosica *Finnish-type*, patologia molto grave che solitamente porta al decesso del bambino nei primi due anni di vita. La podocina fa parte della famiglia delle stomatine e svolge un ruolo fondamentale nel mantenere la struttura e la funzione del citoscheletro dello SD. La proteina CD2-associata (CD2AP) fa parte della superfamiglia delle immunoglobuline e anch'essa svolge un ruolo nel mantenere l'integrità dello SD (Zhang A. and Huang S., 2012). In uno studio condotto su topi in cui è stata soppressa l'espressione del gene per la CD2AP, è stato dimostrato come i soggetti nascano apparentemente normali, ma a circa due settimane di vita iniziano a comparire alterazioni strutturali del glomerulo renale con fusione dei podociti (tale modifica inizia focale per poi diffondersi), proliferazione delle cellule mesangiali e della matrice (Shaw A.S. and Miner J.H., 2001). La NEPH1 è una proteina transmembrana, la cui funzione sembra essere fortemente correlata alla nefrina, ed alterazioni dei geni che codificano per queste proteine inducono disfunzione dei podociti, che esitano in proteinuria grave associata ad un incremento della mortalità perinatale. L' α -actina 4 è una proteina intracellulare, connessa a nefrina e podocina, che mantiene la morfologia dei processi podocitari e regola il movimento del citoscheletro, modificando quindi le dimensioni dei pori dello SD, a seconda delle esigenze dell'organismo (Zhang A. and Huang S., 2012).

Alcuni autori considerano lo SD come una grossa ed estesa *tight junction* ed alcune nefropatie proteino-disperdenti possono venire considerate come patologie delle *tigh junction*, perché in alcune di queste la sola componente danneggiata, di tutte le strutture del glomerulo, è lo SD (Kawachi H., 2006). Oltre a cause congenite di alterazione morfologica e strutturale dello SD, vi sono cause acquisite, infatti questa struttura può venire danneggiata anche in seguito a risposte infiammatorie sistemiche, per azione delle citochine; meccanismi immunomediati, con deposito di immunocomplessi; oppure insulti secondari a ipoperfusione. Recentemente un lavoro pubblicato da Lu H. e colleghi nei topi, ha dimostrato che si riduce notevolmente l'espressione di alcune proteine dello SD e dei podociti, sia per l'ipossia che per la produzione dei radicali liberi dell'ossigeno (ROS) (Lu H., 2012). Ancora, altre cause riportate sono da ricondurre all'utilizzo di farmaci, un esempio è lo studio di Lan e collaboratori, di Marzo 2013, in cui gli autori segnalano la morfina come possibile causa di danno alla struttura dei

podociti con perdita dell'integrità dello SD e albuminuria. A livello podocitario sono presenti recettori mu (MOR) e kappa (KOR) e la morfina, soprattutto ad elevati dosaggi, interagendo con tali recettori induce la riduzione dell'espressione delle molecole dello SD, in parte questa azione si esplica in seguito alla produzione di ROS, indotta dalla stessa morfina (Lan X., 2013).

5.2 Il tubulo renale

Il tubulo renale è suddiviso idealmente in quattro porzioni principali: tubulo contorto prossimale, ansa di Henle, tubulo contorto distale e tubulo collettore. La parte prossimale è deputata al riassorbimento di gran parte dei soluti e dell'acqua ed anche al rimaneggiamento delle proteine escrete con l'ultrafiltrato. A questo livello vi sono diversi recettori tra cui cubilina e megalina deputate al recupero di proteine che per endocitosi entrano nelle cellule tubulari ed in seguito all'attivazione lisosomiale vengono metabolizzate ad amminoacidi, i quali vengono poi recuperati e riutilizzati per la sintesi di altre proteine. Tra le molecole proteiche che subiscono quotidianamente e in condizioni fisiologiche tale catabolismo troviamo i frammenti di immunoglobuline, principalmente catene leggere. Nell'uomo si è dimostrato che queste vengono prodotte in eccesso rispetto alle esigenze dell'organismo e normalmente si tratta di circa il 40% in più di catene leggere rispetto a quelle pesanti per ogni immunoglobulina prodotta, per un totale di 500 mg/gg di catene leggere in circolo, di cui 1-10 mg/gg eliminate con le urine, mentre la restante quota, quindi circa 490 mg/gg, sono recuperate dal tubulo contorto prossimale (Basnayake K., 2011). Da qui anche la maggior richiesta di ossigeno di queste cellule tubulari rispetto a quelle degli altri tratti e la maggior sensibilità in caso di ipoperfusione o ipossia del tessuto renale. L'ansa di Henle svolge un ruolo fondamentale nel riassorbimento di acqua, anche grazie all'ipertonicità della midollare nella quale è immersa ed ai vasa recta. Il tubulo contorto distale passa in mezzo alle arteriole del suo stesso glomerulo e le cellule epiteliali a contatto con le pareti delle arteriole formano la macula densa, mentre le cellule muscolari adiacenti all'arteriola afferente sono dette iuxtaglomerulari e secernono renina; questo insieme viene definito apparato iuxtaglomerulare. Il tubulo collettore partecipa alla composizione ed al volume finale delle urine. Il tubulo renale in tutto il suo decorso è ricoperto dalla proteina di *Tamm-Horsfall* o uromodulina, che svolge un ruolo nella difesa locale del parenchima renale e partecipa in alcune condizioni

patologiche alla formazione di cilindri endotubulari, che possono poi ritrovarsi nelle urine oppure determinare occlusione del tubulo.

5.3 Classificazione della proteinuria

In maniera accademica è possibile categorizzare la proteinuria in pre-renale, renale e post-renale. Un ulteriore modo di definirla è fisiologica (o funzionale) oppure patologica, quest'ultima si divide in: proteinuria da cause urinarie e proteinuria da cause extra-urinarie.

La proteinuria **pre-renale** viene anche definita “*overload* proteinuria”, perché conseguente ad un incremento della quota plasmatica di proteine e quindi anche di quelle che passano il filtro glomerulare, il quale ha mantenuto le sue capacità di permselectività, ma viene superata la capacità del tubulo di riassorbirle, per un processo di saturazione dei recettori, cubilina e megalina, deputati al recupero. Tra le proteine che possono venire rintracciate, in questo caso, nelle urine ci sono l'emoglobina, la mioglobina, monomeri e dimeri di catene leggere di immunoglobuline, come nel caso delle proteine di Bence-Jones in caso di neoplasie o discrasie plasmacellulari (Harley L. and Langston C., 2012).

La proteinuria **post-renale** è definita come la presenza di proteine che arrivano nelle urine dopo che queste sono passate dalla pelvi renale, quindi può essere ulteriormente suddivisa in urinaria se è dovuta a emorragie o processi essudativi delle vie escrettrici come la pelvi renale, gli ureteri, la vescica o l'uretra, inclusa la prostata nei maschi; oppure extra-urinaria se le proteine derivano da secrezioni, essudati o sangue dal tratto genitale o dai genitali esterni in seguito a contaminazione durante la raccolta delle urine (Lees G.E., 2005).

La proteinuria **renale** è dovuta ad un difetto nella normale capacità del rene di maneggiare le proteine plasmatiche e include le forme funzionali e quelle patologiche. La forma funzionale, detta anche fisiologica, è caratterizzata da una lieve-moderata proteinuria, transitoria, che può essere causata dal caldo, stress, convulsioni, congestione venosa, febbre o esercizio intenso. La proteinuria patologica è causata da lesioni strutturali e/o funzionali dei reni, indipendentemente dalla loro estensione e durata. Quest'ultimo tipo di proteinuria è suddivisibile in *glomerulare*, per danni che provocano un'alterazione o una perdita della permselectività del filtro glomerulare; *tubulare*, per un deficit della capacità del tubulo di riassorbire e catabolizzare le proteine ultrafiltrate (solitamente si tratta di proteine a basso peso molecolare o una piccola quota di quelle a peso molecolare medio); infine, *interstiziale*, per lesioni infiammatorie o processi patologici (come la nefrite interstiziale acuta) che determinano essudazione delle proteine nello spazio urinario dai capillari peritubulari (Lees

G.E., 2005). Può anche venire definita *mista* quando vi è più di una di queste componenti presente. La proteinuria glomerulare può essere *selettiva* quando le alterazioni del filtro renale sono moderate e consentono il passaggio di proteine con un ristretto intervallo di peso molecolare, tra 60 e 80 kDa, come l'albumina e la transferrina, fino a un massimo di 150 kDa; *non selettiva* quando le lesioni sono particolarmente estese e gravi consentendo perciò il passaggio anche di proteine ad alto peso molecolare ≥ 150 kDa. La proteinuria tubulare è caratterizzata da bande a un peso molecolare < 69 kDa con tracce di albumine. La proteinuria mista si caratterizza per la presenza della componente sia tubulare sia glomerulare con proteine a basso, moderato e alto peso molecolare; può venire differenziata in "incompleta" se presenti proteine da 23 kDa fino a oltre 150 kDa, "completa" se proteine da 14 kDa oltre i 150 kDa (Abate O., 2005).

La valutazione della proteinuria prevede tre step diagnostici fondamentali:

- **Localizzazione:** per fare questo è necessario raccogliere un'anamnesi il più completa possibile, svolgere un esame fisico diretto approfondito, compresa la misurazione della pressione arteriosa, eseguire un'analisi delle urine completa con l'esame colturale, esami ematobiochimici di screening per escludere una disproteidemia o altre cause di proteinuria non renale;
- **Persistenza:** è necessario ottenere almeno tre test positivi consecutivi a distanza di due settimane l'uno dall'altro per poter definire la proteinuria persistente, tenendo in considerazione che vi sono delle variazioni nei valori della proteinuria anche nel corso delle 24 ore giornaliere;
- **Entità:** utilizzo di metodi che valutano la proteinuria in modo quantitativo, per poterla monitorare anche nel corso della terapia e del *follow-up* del paziente. Tali metodi includono la valutazione del rapporto proteine urinarie-creatinina urinaria (UPC) e del rapporto albumine urinarie-creatinina urinaria (UAC) (Lees G.E., 2005).

Secondo la classificazione della società internazionale di nefrologia (*International Renal Interest Society- IRIS*) è possibile stadiare un paziente sulla base della proteinuria quando questa è stabile, come precedentemente descritto e le categorie sono **non proteinurico** (NP) quando l'UPC è inferiore a 0.2, **borderline proteinurico** (BP) quando UPC è tra 0.2 e 0.5, **proteinurico** (P) se l'UPC è maggiore di 0.5. Nel caso del BP si consiglia di monitorare l'animale entro due mesi, per riclassificarlo se possibile (IRIS, 2007).

5.4 Test diagnostici per la proteinuria

I test a nostra disposizione per valutare, quantificare e analizzare la proteinuria sono i seguenti:

- Metodo colorimetrico “*Dipstick*”;
- Metodo turbidimetrico con acido sulfosalicilico;

entrambi i test sono semi-quantitativi, mentre quelli quantitativi sono i seguenti:

- Rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC);
- Rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC).

Infine, per una valutazione qualitativa del tipo di proteine presenti nel campione alcuni laboratori, al momento solo a scopo di ricerca, eseguono l'elettroforesi su gel di poliacrilammide in presenza di sodio dodecil-solfato (SDS-PAGE) o su gel di agarosio (SDS-AGE).

Il metodo colorimetrico con *Dipstick* prevede l'interazione del reagente presente nel tampone con i gruppi amminici delle proteine, carichi negativamente, che legandosi ad esso ne modificano il colore, con un'intensità proporzionale alle cariche negative che si legano; ciò significa che il reagente può virare di colore anche in presenza di sostanza alcaline di natura non proteica, determinando risultati falsi positivi, così come nel caso di urine pigmentate o particolarmente concentrate (P.S.>1035). Risultati falsi negativi si possono avere nel caso di urine acide o ipostenuriche (P.S.<1008). Il *dipstick* è maggiormente sensibile alle albumine, perché le globuline hanno un minor numero di cariche negative ed anche le proteine di derivazione cellulare (cellule uroteliali, leucociti, etc.) interagiscono in maniera minima con il tampone (Stockham S.L. and Sott L.M., 2008) (Nabity M.B., 2011). La concentrazione minima di albumine che può rintracciare è di 30 mg/dl (Wamsley H. and Alleman R., 2007). Uno studio del 2010 di Zatelli e colleghi ha valutato 507 campioni di urine sottoposte ad un'analisi completa con il *dipstick*, il peso specifico (*urine specific gravity* - USG), il sedimento e la misurazione del rapporto proteine urinarie-creatinina urinaria (UPC) per verificare la congruità dei risultati tra *dipstick* e metodo quantitativo. Ciò che hanno concluso gli autori è che quando il *dipstick* dà risultato negativo indipendentemente dal peso specifico il valore predittivo negativo è elevato, circa il 97.6%, per cui è altamente probabile che il soggetto non sia proteinurico; mentre con un risultato di 100 mg/dl, anche in questo caso indipendentemente dall'USG, il valore predittivo positivo è alto, attorno a 93-99.4%, per cui molto probabilmente il cane è proteinurico e l'esecuzione dell'UPC permette solo di avere un dato più oggettivo. Infine, sottolineano che i problemi interpretativi sussistono con un

risultato di 30 mg/dl, in questi casi è imprescindibile l'interpretazione del risultato alla luce dell'USG: se è <1012 e il *dipstick* mostra una positività a 30 mg/dl è strettamente consigliata l'esecuzione dell'UPC oppure è necessario ripetere il test su un altro campione di urine, mentre con lo stesso valore di proteine al *dipstick* e USG > 1012 probabilmente il paziente è proteinurico (Zatelli A., Paltrinieri S., 2010). Un lavoro invece molto recente di Defontis e coautori ha dimostrato, come già era successo per la medicina umana, che la lettura del *dipstick* è più attendibile se fatta con il lettore ottico automatico, perché non soggetto all'errore dell'operatore, che viene influenzato nella lettura anche dalla luce ambientale (Defontis M., 2013).

Il metodo turbidimetrico di precipitazione delle proteine con acido sulfosalicilico (SSA) viene eseguito mescolando un egual volume di surnatante, ottenuto centrifugando il campione di urine, e di acido sulfosalicilico al 5% in una provetta e valutando l'entità della precipitazione proteica basandosi sul grado di torbidità della soluzione. E' un metodo altamente soggetto all'errore dell'operatore, può dare risultati falsi negativi se sono presenti, nel campione, agenti di contrasto radiografico, cefalosporine, penicilline, timolo e sulfisoxazolo. Risultati falsi negativi, invece, sono meno frequenti, in quanto la capacità detettiva del metodo è superiore a 5 mg/dl di proteine e può rintracciare proteine di Bence-Jones e globuline (Harley L. and Langston C., 2012).

La misurazione del rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC) è considerato il *gold standard* per valutare la proteinuria ed è un metodo quantitativo. Idealmente si dovrebbe fare su urine raccolte nelle 24 ore, come in medicina umana, ma non è attuabile nelle nostre realtà; per tale motivo è possibile raccogliere un campione di urine singolo oppure utilizzare un campione ottenuto da un pool di tre campioni raccolti in diversi momenti della giornata o in tre giorni differenti. Secondo la stadiazione IRIS i cani con $UPC < 0.2$ non sono considerati proteinurici, quelli con $UPC 0.2-0.5$ borderline proteinurici, quindi da rivalutare entro due mesi, infine se l'UPC è superiore a 0.5 viene considerato proteinurico. Quando l'UPC è maggiore di 2-2.5 a seconda dei testi, allora si parla di grave proteinuria, di origine glomerulare e si può definire anche proteinuria nefrosica.

Il rapporto albumine urinarie/creatinina urinaria (UAC) è considerato il *gold standard* in medicina umana per il monitoraggio delle nefropatie croniche perché sembra essere un marker più precoce rispetto all'UPC. Tali informazioni possono essere ragionevolmente riportate anche in medicina veterinaria, anche se per ora la letteratura è scarsa in tal senso. Nel cane il *cut-off* fisiologico dell'UAC sembra essere attorno a 0.024, sopra al quale si può parlare di albuminuria. Riprendendo la medicina umana, si può definire microalbuminuria un

valore di albumine urinarie tra 30 e 300 mg/dl, mentre se superiore a 300 mg/dl si parla di “*overt albuminuria*”.

L’SDS-PAGE è considerato il metodo *gold-standard* per l’analisi qualitativa delle proteine urinarie perché dopo il trattamento del campione con SDS tutte le proteine vengono denaturate ed assumono carica negativa. Per tale motivo l’unica caratteristica che influenza la migrazione è la dimensione e ciò permette di distinguere tra proteinuria glomerulare, tubulare o mista. Nonostante ciò, la specificità dell’SDS-PAGE è bassa ed anche la sua correlazione con il danno renale presente, ma allo stesso tempo la sensibilità è elevata nel localizzare la sede del danno. L’SDS-AGE viene preferita all’SDS-PAGE per due motivi principali: la tossicità del gel di poliacrilamide e perché quest’ultimo ha una scarsa capacità di separare le proteine ad alto peso molecolare (Giori L., 2011). Le bande elettroforetiche in un cane sano sono circa 15, possono venire suddivise in bande ad alto e basso peso molecolare usando come *cut-off* i 66 kDa delle albumine, le proteine a basso peso molecolare hanno un peso molecolare < 66 kDa e sono di origine tubulare (come la *retinol-binding protein*), quelle a medio peso molecolare tra 66 e 80 kDa, infine quelle ad alto hanno peso molecolare sono superiori agli 80 kDa ed hanno origine glomerulare; quando presenti più di uno di questi pattern si parla di proteinuria mista (Schaefer H., 2011). Tra le bande fisiologicamente presenti, ad alto peso molecolare, troviamo una banda che viene riferita alla proteina di *Tamm-Horsfall* (97 kDa), però non ci sono ancora studi che hanno caratterizzato tutte le bande per capire a quali proteine corrispondano con precisione.

5.5 Conseguenze e complicazioni della proteinuria

La proteinuria è stata dimostrata essere un fattore indipendente di progressione della malattia renale ed è associata a complicazioni principalmente cardiovascolari e metaboliche. Questa associazione viene avvalorata da numerosi studi che correlano l’entità della proteinuria con il peggioramento della funzionalità renale ed un miglioramento di questa dopo la riduzione della proteinuria. Tali informazioni sono ampiamente associate sia in medicina umana, che in medicina veterinaria. Uno studio a questo proposito è stato pubblicato da Jacob e colleghi nel 2005, prendendo in esame 45 cani con nefropatia cronica (*Chronic Kidney Disease – CKD*). In questi soggetti è stata dimostrata un’associazione tra la gravità della proteinuria e lo sviluppo di una sindrome uremica ed anche all’evento morte; inoltre il rischio relativo di

sviluppare una sindrome uremica era tre volte maggiore nei cani con UPC > 1 rispetto a quelli con UPC < 1. Il rischio relativo di sviluppare un evento avverso era di 1.5 volte più alto per ogni unità di incremento dell'UPC. Infine il peggioramento della funzionalità renale era molto più grave nei cani con UPC > 1 (Jacob F., 2005). Il progressivo deterioramento della funzionalità renale in seguito alla proteinuria è conseguenza di diversi meccanismi, come l'accumulo di componenti proteiche nel ciuffo glomerulare con stimolazione delle cellule mesangiali e deposito di matrice mesangiale. Recenti studi sperimentali in medicina umana hanno concluso che in corso di albuminuria, da lieve a grave, vi sono cellule progenitrici dei podociti che nel tentativo di riparare i danni, per ripristinare la normale struttura dello SD, iniziano a proliferare. Perché possano maturare, però, è necessaria la presenza di acido retinoico, che consente la differenziazione a podociti maturi con espressione di nefrina, podocina ed altre proteine citoscheletriche. L'albumina lega l'acido retinoico e quando questa viene persa attraverso il filtro glomerulare, viene perso anche acido retinoico con incremento delle sue concentrazioni nelle urine. I podociti che si sono formati restano in una fase immatura e si è avanzata l'ipotesi che le lesioni tipiche di alcune nefropatie come l'FSGS o la GNM siano l'esito di un tentativo del glomerulo di riparare il danno, tentativo però non è andato a buon fine per una carenza di acido retinoico. A dimostrazione di questo si è osservato che somministrando acido retinoico nei topi albuminurici i podociti riprendono a maturare fino ad arrivare allo stadio finale (Zhang J., 2012). A supporto di questa tesi vi è la maggior prevalenza di questo tipo di lesioni nei soggetti giovani in cui la componente di cellule progenitrici a livello glomerulare è maggiore e di conseguenza aumenta la probabilità che in seguito ad un insulto podocitario si instauri un meccanismo volto alla riparazione del danno (Romagnani P., 2013).

La proteinuria oltre che danni glomerulari può comportare un insulto tossico per le cellule tubulari che, nel tentativo di recuperare dalla pre-urina quante più proteine possibili, si danneggiano, soprattutto quando le proteine sono alterate nella loro struttura come nel caso delle iperparaprotidemie secondarie a discrasie plasmacellulari. Le cellule danneggiate inducono flogosi locale e dell'interstizio con fibrosi e morte cellulare tramite diversi meccanismi come occlusione tubulare, rottura lisosomiale, danno perossidativo e complemento-mediato con produzione di citochine, fattori di crescita, *transforming-growth factor-β* (*TGF-β*), *platelet-derived growth factor* (*PDGF*) ed endotelina (Grauer G.F., 2007) (Harley L. and Langston C., 2012). Queste citochine oltre a danneggiare ulteriormente le cellule tubulari inducono flogosi dell'interstizio, hanno attività chemiotattica per i macrofagi ed i linfociti T ed inducono la proliferazione dei fibroblasti con incremento della matrice

extracellulare e fibrosi. Inoltre si è visto che in presenza di proteinuria vengono sovraespressi i geni responsabili della sintesi di molecole vasoattive e pro-infiammatorie (Perico N., 2005). Quindi possiamo concludere che, indipendentemente dalla causa della proteinuria, la sua sola presenza determina un insulto flogogeno al parenchima renale che determina la progressione della malattia renale.

Le possibili complicazioni di una perdita proteica renale sono molteplici e sono inoltre potenziate quando questa perdita è elevata come nella sindrome nefrosica, quando l'UPC >2,5. Queste complicazioni sono principalmente: iperazotemia, ipoalbuminemia ed insorgenza di edemi periferici o raccolte cavarie, ipercoagulabilità con aumentato rischio trombotico, iperlipidemia, predisposizione alle infezioni secondarie, ipernatremia e ipertensione.

L'iperazotemia può insorgere in cani proteinurici o aggravarsi fino ad arrivare alla sindrome uremica per i meccanismi sopradescritti. L'ipoalbuminemia è principalmente legata alla perdita con le urine della componente proteica plasmatica, ma anche alla malnutrizione che spesso accompagna questi pazienti. L'ipertensione nell'uomo con SN viene attribuita ad una *up-regulation* del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAAS), alla ritenzione inappropriata di sodio e alla progressione della malattia glomerulare. L'ipoalbuminemia associata all'ipertensione spesso è alla base della formazione di edemi periferici o meno frequentemente di versamento addominale o toracico in soggetti con proteinuria nefrosica; un'altra concausa importante è la presenza di vasculite con incremento della permeabilità capillare che è presente in questi pazienti, in seguito alla risposta infiammatoria sistemica a cui sono soggetti. L'ipercoagulabilità è presente nel 10-50% degli uomini con SN, attraverso diversi meccanismi spesso concomitanti come l'incremento dell'attività di molte proteine della cascata coagulativa, riduzione delle concentrazioni di inibitori della coagulazione, iperattivazione piastrinica e alterata fibrinolisi. Tra le proteine ad attività antitrombotica c'è l'antitrombina la cui attività plasmatica si riduce in corso di proteinuria perché viene persa come accade per l'albumina. Le alterazioni patologiche renali più associate ad eventi tromboembolici sono la GNM, la GNMP e la MCD, che sono anche quelle che inducono una proteinuria più grave. I fattori predittivi per l'evento avverso di trombosi sono concentrazioni inferiori a 2.5 mg/dl di albumine sieriche, superiori a 10 g di albuminuria nelle 24h, grave iperfibrinogenemia, ipovolemia e concentrazioni di antitrombina < 75%. L'incidenza di questi eventi avversi nel cane ancora non è ben chiara, però si sa che i vasi maggiormente coinvolti sono quelli venosi, in particolare vasi venosi renali, polmonari e vene profonde come la cava. L'iperlipidemia sembra essere legata ad un'aumentata sintesi di trigliceridi e colesterolo, per

compensare la carenza di albumina e quindi la riduzione di osmolarità plasmatica, e per un aumentato catabolismo lipidico in soggetti tendenzialmente malnutriti. Queste anche in medicina umana sono ipotesi non ancora con un'evidenza scientifica. Nell'uomo è stato inoltre dimostrato che nei pazienti con SN, soprattutto se pediatrici, vi è un rischio 13 volte maggiore di sviluppare infezioni secondarie. Questo riscontro sembra essere correlato, oltre che con le alterazioni precedentemente descritte, anche con la perdita di IgG, fattori del complemento, transferrina, minerali come lo zinco e con la riduzione del numero di linfociti T (Klosterman E.S. and Pressler B.M., 2011).

6. Presentazione clinica dei cani con CanL

Le manifestazioni cliniche riscontrate più di frequente in corso di CanL sono lesioni cutanee di varia natura, linfoadenomegalia, calo dell'appetito, perdita di peso, intolleranza all'esercizio, letargia, splenomegalia, poliuria/polidipsia, lesioni oculari, epistassi, onicogriofosi, debolezza, vomito e diarrea.

Le lesioni cutanee sono presenti nel 56-90% dei cani malati, le presentazioni possono essere molteplici, come dermatite esfoliativa con alopecia, generalizzata o localizzata a faccia, orecchie e zampe; dermatite ulcerativa in corrispondenza delle prominenze ossee e delle giunzioni muco-cutanee, tartufo, polpastrelli e pinna auricolare; dermatite nodulare e infine dermatite mucocutanea proliferativa.

La linfoadenomegalia è spesso associata a questa malattia, i linfonodi possono anche raggiungere dimensioni 2-6 volte quelle fisiologiche tanto da mimare la presentazione clinica del linfoma.

Le lesioni oculari sono riportate nel 16-80.5% dei casi e si tratta principalmente di blefariti, congiuntiviti, cheratocongiuntiviti ed uveiti.

Altri segni clinici riportati sono vomito, diarrea, poliuria/polidipsia, perdita di peso e inappetenza che sono spesso conseguenza della nefropatia che si sviluppa in questi pazienti; frequentemente il cane ha una riduzione delle masse muscolari, diretta conseguenza della presenza di una grave proteinuria.

Alcuni soggetti possono presentarsi anche con zoppia secondaria ad una poliartrite solitamente immunomediata, oppure difficoltà deambulatorie di origine neurologica meno

frequentemente per la formazione di granulomi nel canale vertebrale. Sono riportati inoltre segni clinici di meningite, pancreatite, miosite, colite, coagulazione intravasale disseminata, trombosi e tamponamento cardiaco, verosimilmente secondario a coagulopatie (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012).

7. Diagnosi della CanL

Come per qualunque altra patologia dei nostri animali domestici sono fondamentali i dati anamnestici, ad esempio riguardo alle profilassi e allo stile di vita del cane, i viaggi in aree endemiche, i reperti clinici riscontrati durante l'esame fisico e le alterazioni clinicopatologiche compatibili con la CanL.

Per ottenere una diagnosi eziologica le possibilità sono molteplici, ma spesso è necessario eseguire più di una delle indagini a nostra disposizione, tra queste troviamo:

- ▲ Ricerca sierologica degli anticorpi anti-leishmania;
- ▲ Identificazione diretta degli amastigoti;
- ▲ Ricerca del DNA associato al kinetoplasto del parassita.

La ricerca sierologica è importante perché stabilendo il titolo anticorpale è possibile fare diagnosi e stabilire una prognosi, ma ha lo svantaggio di non assicurare la presenza del parassita, ma solo della risposta anticorpale in seguito al contatto dell'organismo con esso. Questo tipo di ricerca può essere di tipo qualitativo e quantitativo. Nel primo caso si tratta di test rapidi che si possono eseguire in ambulatorio, però il risultato può essere solo positivo o negativo senza un'indicazione dell'entità della risposta anticorpale, ed inoltre si possono ottenere risultati falsi negativi e quelli positivi richiedono comunque un ulteriore accertamento riguardo l'entità del titolo anticorpale. Nel caso della ricerca quantitativa, si tratta di tecniche IFI o ELISA, ed è possibile individuare il livello di anticorpi dell'animale e se vi è una presentazione clinica e/o clinico-patologica compatibile con la malattia permette di fare diagnosi. Gli svantaggi di questi test sono che le performance e l'accuratezza dipendono dal laboratorio, sono operatori dipendenti ed è difficile standardizzare le tecniche rendendo i risultati comparabili tra laboratori diversi. Infine il riscontro di bassi livelli anticorpali richiede accertamenti ulteriori.

L'esame citologico ha il vantaggio di permettere la visualizzazione diretta del parassita e nel caso di positività si ha una diagnosi con un esame rapido e non invasivo. I tessuti dai quali è possibile eseguirlo sono il tessuto linfonodale tramite agoaspirazione o agoinfissione, le lesioni cutanee, se presenti, per scarificazione oppure il midollo osseo con agoaspirazione. Purtroppo, anche se la specificità è del 100%, ha una bassa sensibilità e in caso di mancata identificazione diretta degli amastigoti è necessario eseguire una ricerca molecolare del DNA del parassita; inoltre non fornisce informazioni sullo stato attuale della risposta del sistema immunitario dell'animale.

La PCR permette di rintracciare anche piccole quantità di DNA del protozoo, ha elevata sensibilità e specificità e con tecnica *Real-time* è possibile quantificare la carica parassitaria del soggetto. Sono segnalati casi di falsi positivi in seguito a contaminazione del campione, ogni laboratorio ha diverse tecniche e standardizzazioni di queste, ed i risultati tra laboratori possono differire anche per i materiali utilizzati per l'amplificazione come i *primers*. Si è visto però che utilizzando sequenze per l'amplificazione del DNA del kinetoplasto incrementa la sensibilità del test perché vi sono molte più copie rispetto a quelle del DNA del parassita (Lachaud L., 2004). La diagnostica molecolare comunque non rivela lo stato immunologico del paziente, ma l'infezione e non la malattia (Solano-Gallego L. M. G., 2011) (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012). I tessuti su cui si può eseguire sono quello linfonodale, midollo osseo, *buffy-coat*, milza, tessuto cutaneo. Quest'ultimo è quello che ha maggior tasso di positività (Almeida ABPF, 2013).

8. Trattamento della CanL

La leishmaniosi canina è più resistente rispetto a quella dell'uomo, infatti raramente il cane eradica l'infezione. Frequenti sono le recidive cliniche che richiedono un ulteriore ciclo di terapia, ma molti cani riescono a non manifestare mai la malattia clinica.

I farmaci a nostra disposizione per il trattamento di questa patologia sono principalmente: composti antimoniali pentavalenti, ovvero il meglumine antimoniato (Glucantime®), l'allopurinolo, la miltefosina oppure associazioni di Glucantime e allopurinolo o miltefosina e allopurinolo. Vi sono riportati in letteratura anche trattamenti a base di amfotericina B, ketoconazolo, metronidazolo associato a spiramicina, marbofloxacin, ma queste, ad

eccezione dell'amfotericina, sono presenti solo a livello aneddottico. Altre come l'aminosidina e la pentamidina sono altresì riportate, ma se ne sconsiglia l'utilizzo per gli effetti collaterali (Baneth D. and Solano-Gallego, 2012).

Il Glucantime è il composto antimoniale maggiormente utilizzato nel cane, inibisce la glicolisi e l'ossidazione degli acidi grassi in maniera selettiva nel parassita. Il 94-95% degli uomini ad un dosaggio di 60 mg/kg/gg ottiene la remissione clinica e la cura parassitologica. Questo principio attivo ha un'emivita breve, di circa 21 minuti se somministrato per via endovenosa, 42 per via intramuscolare e 122 per via sottocutanea. In circa 6-9 ore l'80-95% viene eliminato attraverso il rene. Non permette, nel cane, l'eliminazione dell'infezione e la recidiva può insorgere in un periodo di tempo che va da qualche mese a 1-2 anni, anche in dipendenza dello stato immunitario dell'animale o se insorgono comorbidità. La recidiva è più probabile se il trattamento non viene eseguito per almeno 4 settimane. Gli effetti collaterali possono essere locali, come dolore e tumefazione nel punto di inoculo, o sistemici, più frequentemente di natura gastroenterica (vomito e diarrea), febbre e disappetenza fino ad anoressia (Oliva G., 2010). Non ci sono grosse evidenze scientifiche che vi siano danni renali in seguito alla somministrazione di Glucantime, anche se uno studio del 2009 di Bianciardi e colleghi ha valutato campioni biotici di tessuto renale prima e dopo la somministrazione di questo farmaco in 4 cani sani e hanno evidenziato la comparsa di lesioni tubulari con cellule necrotiche, presenti anche nel lume tubulare, edema interstiziale con infiltrato di mononucleati senza danno glomerulare (Bianciardi P., 2009). Il dosaggio più comunemente riportato è di 75-100 mg/kg/die, unica somministrazione o diviso in due somministrazioni, per 4 settimane-8 settimane, per via sottocutanea (Solano-Gallego L. M. G., 2011).

L'allopurinolo è un analogo strutturale dell'ipoxantina che inibisce l'attività della xantina ossidasi, che è un enzima che catalizza la produzione dall'ipoxantina di xantina e da questa di acido urico. La tossicità deriva dall'incapacità del parassita di produrre purine, per cui le assimila dall'ospite e quando fagocita l'allopurinolo si formano derivati tossici, come la 4-amino-pirazolo-pirimidina, che determinano la morte dell'amastigote. Nell'uomo è scarsa l'efficacia come monoterapia, molto probabilmente la bassa attività è legata alla trasformazione non sufficiente in quantità dell'allopurinolo in oxipurinolo, mentre è ampiamente utilizzata l'associazione allopurinolo con Glucantime perché ha permesso di ridurre le dosi di quest'ultimo, riducendone così gli effetti collaterali. Anche in medicina veterinaria l'allopurinolo viene utilizzato in associazione con i composti antimoniali per il primo mese, poi questi ultimi vengono sospesi e l'allopurinolo viene mantenuto per mesi in alcuni casi a vita, se non insorgono effetti collaterali come la formazione di calcoli di xantina.

Il dosaggio utilizzato è di 10 mg/kg ogni 12 ore per mesi, per via orale. Sono descritti anche dosaggi da 5 a 20 mg/kg ogni 12 ore (Oliva G., 2010). In uno studio del 2009 su 40 cani, Pevlaki e colleghi, hanno dimostrato che i cani a cui veniva somministrato allopurinolo rispetto a quelli con il placebo la proteinuria non compariva o se già presente non aumentava d'entità, in alcuni addirittura scompariva; inoltre le lesioni a livello glomerulare non subivano modifiche, mentre si riduceva l'infiammazione tubulo-interstiziale (Plevraki K., 2006). Uno studio retrospettivo di Torres e altri, pubblicato nel 2011, ha dimostrato come il trattamento con composti antimoniali associato ad allopurinolo permetta di ottenere una riduzione delle proteine totali, del titolo anticorpale ed un incremento del rapporto A/G associati ad un miglioramento clinico dei pazienti, senza insorgenza di recidive nei cani malati (Torres M., 2011). Un altro studio molto recente pubblicato da Paradies e collaboratori ha analizzato un gruppo di 24 cani, suddivisi in 4 gruppi in base alla terapia antileishmanicida eseguita. In un gruppo è stato somministrato solo Glucantime a 50 mg/kg ogni 12 ore, in un altro Glucantime associato ad allopurinolo, in un altro ancora allopurinolo come monoterapia e nell'ultimo Glucantime a 37.5 mg/kg ogni 6 ore. Ciò che hanno dimostrato è che la combinazione allopurinolo con Glucantime è la scelta migliore perché vi erano più remissioni cliniche e clinicopatologiche entro un periodo di uno-tre mesi, senza recidive entro un anno, che era il termine fissato per lo studio nel seguire il *follow-up* dei cani, e inoltre, i cani trattati con l'associazione Glucantime-allopurinolo hanno presentato un periodo senza sintomi clinici della durata di 16-65 mesi (Paradies P., 2012).

La miltefosina è un alchilfosfolipide nato come farmaco anti-tumorale e più tardi utilizzato come antileishmanicida, la sua azione consiste nel bloccare la sintesi della membrana cellulare e di bloccare i meccanismi di trasmissione del segnale del parassita, provocandone la morte. Nell'uomo si è visto che l'utilizzo di questa molecola induce la cura parassitaria nel 91-95% dei pazienti, ad un dosaggio di 100-150 mg/gg per 28 giorni. Nel cane l'efficacia è stata dimostrata se somministrato per via orale, però ci sono ancora pochi studi a riguardo e come per il Glucantime ci sono protocolli che ne prevedono la somministrazione come monoterapia, altri in associazione all'allopurinolo. Nel primo caso è riportata una maggior incidenza di recidive, mentre nel secondo caso l'efficacia risulta potenziata. Sembra però che il trattamento con la miltefosina determini la selezione di leishmanie resistenti e quindi in caso di recidiva è sconsigliato utilizzare per i cicli successivi di terapia sempre la miltefosina. Non permette la cura parassitologica nel cane, ma riduce l'entità del carico parassitario (Oliva G., 2010). Uno studio del 2009 a proposito dell'efficacia del farmaco ha dimostrato che l'associazione con allopurinolo riduce in maniera sensibile la carica parassitaria soprattutto

con il primo ciclo di terapia, ma che un eventuale secondo ciclo non determina la scomparsa del parassita dall'organismo verosimilmente per la comparsa di resistenza negli organismi rimasti (Manna L. V. F., 2009). Un altro studio che riporta dati sovrapponibili è stato pubblicato sempre nello stesso anno dal gruppo di Mirò (Mirò G., 2009). Gli effetti collaterali sono solitamente vomito e diarrea a carattere autolimitante (Oliva G., 2010).

L'aminosidina è un aminoglicoside con attività anti-protozoaria dovuta al blocco dell'unione delle subunità ribosomiali con impedita sintesi proteica associata ad un'alterazione del processo di respirazione dell'amastigote. Nell'uomo si raggiunge la cura parassitologica al dosaggio di 11 mg/kg in un'unica somministrazione giornaliera, per 21 giorni nel 95% dei casi. Anche questo principio attivo può venire utilizzato da solo o in associazione al meglumine antimoniate. Può avere effetti tossici renali e vestibolari. Athanasiou e colleghi nel 2013 hanno pubblicato i dati ottenuti con un trial clinico su cani con CanL naturale trattati con aminosidina ed hanno effettivamente registrato una riduzione del titolo anticorpale, delle concentrazioni plasmatiche di globuline con incremento delle albumine e del rapporto A/G ed il miglioramento di altri dati clinicopatologici quali anemia, linfopenia, iperprotidemia (Athanasiou L.V., 2013).

L'amfotericina B è un macrolide polienico, con attività principalmente antifungina, per la sua interazione con gli steroli delle membrane fungine, soprattutto con l'ergosterolo. La sua azione si esprime anche sugli amastigoti perché hanno una membrana particolarmente ricca in steroli. Il dosaggio è di 0.5 mg/kg a giorni alterni per 4 settimane per ottenere la cura parassitologica nel 97% delle persone, ma ha una notevole tossicità renale con gravi deficit funzionali associati a febbre, vomito e anoressia. Ne esiste una forma liposomiale che sembra dare buoni risultati nell'immediato, che vengono però seguiti da una rapida recidiva nel cane. La WHO ne ha sconsigliato l'utilizzo nel cane (Oliva G., 2010).

Vi sono altre terapie riportate in letteratura, che non hanno avuto molto seguito come l'utilizzo di metronidazolo associato a spiramicina, perché in vitro il metronidazolo sembra avere attività leishmanicida (Oliva G., 2010). Vi è uno studio di Pennisi e colleghi del 2005 in cui viene confrontato l'utilizzo di questa combinazione con quella Glucantime-allopurinolo e sembra che il numero di cani che hanno avuto una remissione clinica e clinicopatologica non sia sensibilmente diversa tra i due gruppi (Pennisi MG, 2005).

La marbofloxacina è un fluorochinolone di terza generazione sviluppato per uso veterinario, che agisce bloccando la DNA girasi dei batteri. In vitro si è visto che sembra bloccare la replicazione del parassita attraverso il TNF- α e l'ossido nitrico (NO). Pochi studi esistono a supporto del trattamento di cani con CanL con marbofloxacina, tra questi troviamo quello di

Rougier e coautori del 2008, in cani malati che se trattati per 28 giorni a 2 mg/kg giorno, sembrano mostrare un miglioramento della sintomatologia clinica con riduzione anche del numero di amastigoti presenti (Rougier S, 2008).

Il domperidone è un antagonista dei recettori D2 della dopamina con attività procinetica gastrica ed antiemetica. L'effetto antidopaminergico esita nel rilascio di serotonina che porta alla produzione di prolattina che viene classificata come una citochina pro-infiammatoria derivata dai linfociti, ma il meccanismo con cui agisce contro la Leishmania è sconosciuto. Il dosaggio è di 1 mg/kg ogni 12 ore per un mese (Oliva G., 2010).

9. Prognosi e monitoraggio

Il gruppo LeishVet ha proposto un sistema di stadiazione dei pazienti con CanL, sulla base dei rilievi clinici, clinico-patologici e dello stato sierologico dei soggetti per poter associare ai diversi stadi protocolli terapeutici e prognosi differenti (tab.2) (Solano-Gallego L. M. G., 2011).

La risposta del soggetto alla terapia dipende strettamente dallo stato clinicopatologico con cui si è presentato e dalla sua soggettiva risposta alla terapia e può andare da scarsa a molto buona. I cani che hanno un deficit della funzionalità renale hanno tempi di recupero più lunghi e di durata inferiore rispetto a quelli senza compromissione renale. In letteratura ci sono diversi studi che riportano un tempo di remissione clinica entro il primo mese di terapia, però ci sono alcuni soggetti che impiegano molto più tempo ad ottenerla, altri invece non riescono a raggiungerla mai. La durata del trattamento con allopurinolo dipende dalla gravità della malattia e dalla risposta del soggetto e del protozoo; alcuni cani non raggiungono mai un punto nella loro storia clinica in cui si può sospendere l'allopurinolo, altri invece raggiungono uno stato clinico che permette la sospensione, come ad esempio dati clinicopatologici completi (esame emocromocitometrico, biochimica clinica e analisi delle urine completa) che indicano una remissione completa del soggetto associati a test sierologici negativi o al limite della capacità della tecnica usata di rintracciare titoli anticorpali. Inoltre ancora lo devono sospendere ad esempio quando insorgono complicazioni legate all'utilizzo del farmaco, come cristalluria di xantina fino a uroliti di xantina. In questo caso a seconda della condizione clinica del cane e della gestione dell'infezione si decide se ridurre la dose di farmaco o se arrivare a sospenderlo

Lo stesso gruppo di lavoro ha fornito delle linee guida per il monitoraggio clinicopatologico e sierologico di questi pazienti (tab.3). Tutto ciò considerando che se il paziente rientra all'interno di uno dei 4 stadi IRIS, si suggerisce di eseguire un monitoraggio anche tenendo conto delle linee guida dell'IRIS.

Stadio clinico	Sierologia	Segni clinici	Reperti clinicopatologici	Terapia	Prognosi
I (lieve)	Titoli anticorpali negativi o bassi	Lievi, linfoadenomegalia periferica, dermatite papulare	Assenti Profilo funzionalità renale nella norma: creatinina < 1.4 mg/dl, UPC<0.5	A+G A+M G A M	Buona
II (moderato)	Da bassi ad alti titoli anticorpali	Oltre a quelli del I° stadio Dermatite esfoliativa, onicogrifosi, ulcerazioni cutanee, mucocutanee, dei cuscinetti e del tartufo, anoressia, febbre, perdita di peso, epistassi	Lieve anemia non rigenerativa, iperglobulinemia, ipoalbuminemia, sindrome da iperviscosità Sottostadio A: profilo funzionalità renale nella norma Sottostadio B: UPC 0.5-1	A+G A+M	Da buona a riservata
III (grave)	Da medi ad alti titoli anticorpali	Oltre a quelli di I° e II° stadio Lesioni da IMC: uveiti, artriti, vasculiti, GN	Oltre a quelle dello stadio II CKD stadio IRIS I con UPC>1 o CKD stadio IRIS II (sCr1.4-2 mg/dl)	A+G A+M Terapia per CKD secondo linee guida IRIS	Da riservata a infausta
IV (molto grave)	Da medi ad alti titoli anticorpali	Oltre a quelli dello stadio III Tromboembolismo polmonare, SN, ERSD	Oltre a quelle dello stadio III CKD stadio IRIS III (sCr 2-5 mg/dl) e IV (sCr>5 mg/dl). SN con UPC>5	A Terapia CKD secondo linee guida IRIS	Infausta

Tabella 2 modificata da (Solano-Gallego L. M. G., 2011). Nella tabella la stadiazione riportata del gruppo LeishVet. A=allopurinolo, G=glucantime, M=miltefosine, SN=sindrome nefrosica, GN=glomerulonefrite, CKD=chronic kidney disease, ESRD=end stage renal disease, UPC=urine protein to creatinin ratio, sCr=serum Creatinine.

Parametri	Frequenza
Storia clinica ed esame fisico completo	Dopo il primo mese di trattamento e poi ogni 3-4 mesi durante il primo anno.
Valutazione clinicopatologica di screening: CBC completo, profilo biochimico, elettroforesi sierica se possibile, analisi delle urine completa inclusa l'UPC	In seguito se il cane ha una remissione completa con il trattamento si consiglia di rivalutarlo ogni 6-12 mesi.
Sierologia	Non prima dei 6 mesi dopo l'inizio del trattamento poi ogni 6-12 mesi dopo la fine del trattamento.
PCR Real Time	Come per la sierologia, però la reale utilità di ripetere questa tecnica di diagnostica molecolare ogni 6-12 mesi è ancora da definire.

Tabella 3 modificata da (Solano-Gallego L. M. G., 2011). Parametri ematobiochimici e sierologici di cui il gruppo LeishVet consiglia il monitoraggio in cani affetti da CanL.

Lavoro Sperimentale

10. Obiettivi

L'obiettivo del presente studio sperimentale è stato quello di valutare la leishmaniosi canina dal punto di vista clinico e clinico-patologico, analizzando i dati ottenuti all'ammissione (riguardanti segnalamento, anamnesi, sintomatologia clinica e parametri di laboratorio) per identificare in termini di frequenza percentuale la prevalenza di tali dati nella nostra realtà clinica. Successivamente, delle alterazioni clinico-patologiche riscontrate si è valutata la progressione confrontando i dati dell'ammissione con quelli ricavati nei successivi nove gruppi di *follow up* (30, 60, 90, 120, 150, 180, 360, 540, 720 giorni dalla diagnosi/inizio terapia). Inoltre sono stati messi in relazione, mediante l'utilizzo della regressione logistica, i dati clinico-patologici con l'*outcome* di ciascun paziente, al fine di ricavare le variabili risultate statisticamente significative in funzione dell'*odds ratio* (rapporto di rischio). Un secondo obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la progressione del danno glomerulare e della nefropatia valutando i valori dell'UPC (*rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria*), dell'UAC (*rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria*) e della creatinina sierica ottenuti da ciascun paziente in funzione dell'*outcome* e dei trattamenti per la leishmaniosi effettuati.

11. Materiali e Metodi

11.1 Criteri d'inclusione e selezione dei pazienti

Questo studio clinico si è basato su una coorte di pazienti afferenti al dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna nel periodo compreso fra Gennaio 2001 e Febbraio 2013. I pazienti in esame, per essere selezionati dovevano presentare una positività sierologica per *Leishmania spp.* superiore o uguale a 1:40 mediante la metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI) e anamnesi, segni clinici e/o clinico-patologici riferibili a leishmaniosi. Tali pazienti dovevano presentare inoltre almeno uno dei seguenti criteri:

titolo IFI *Leishmania spp.* $\geq 1:320$;

visualizzazione diretta delle forme amastigote di *Leishmania spp.* mediante esame citologico da linfonodo, midollo osseo o cute;

positività alla *Polimerase Chain Reaction* (PCR) per DNA di *Leishmania spp.*

I pazienti inclusi in questo studio sono stati selezionati anche sulla base della disponibilità di cartelle cliniche presentanti dati clinici e clinico-patologici contenenti i risultati di esami emocromocitometrico e biochimica sierica, analisi urinaria e biochimica urinaria con proteinuria e albuminuria, parametri coagulativi (ATIII, d-dimeri, fibrinogeno), elettroforesi sierica e proteine di fase acuta (CRP).

I soggetti sono stati definiti come proteinurici (P) se presentavano un valore di UPC $\geq 0,5$ e non proteinurici (NP) se presentavano un valore di UPC $< 0,5$ in accordo con la letteratura (IRIS, 2009a). I soggetti non proteinurici (NP) sono stati ulteriormente suddivisi in soggetti albuminurici (A) se presentavano UAC $\geq 0,024$ e non albuminurici (NA) se presentavano UAC $< 0,024$.

I pazienti che presentavano l'UPC all'ammissione sono stati ulteriormente suddivisi nelle tre categorie della sottostadiazione IRIS per la proteinuria:

non proteinurici (NP) con UPC $\leq 0,2$;

borderline proteinurici (BP) con $0,2 < \text{UPC} < 0,4$;

proteinurici (P) con UPC $\geq 0,5$.

Infine, i soggetti proteinurici (P) sono stati suddivisi in base ad un valore soglia di UPC corrispondente a 2,5 in: affetti da proteinuria nefrosica (NRP, UPC $\geq 2,5$) e affetti da proteinuria non nefrosica (nonNRP, UPC $< 2,5$).

Il decorso dei soggetti affetti da leishmaniosi inclusi nella popolazione di studio, è stato suddiviso in nove categorie di follow up, sulla base del tempo trascorso dalla diagnosi/inizio del trattamento, riportate di seguito:

Giorno 0 che corrisponde all'ammissione o diagnosi/inizio del trattamento;

Giorno 30 che corrisponde a 30 ± 15 giorni;

Giorno 60 che corrisponde a 60 ± 15 giorni;

Giorno 90 che corrisponde a 90 ± 15 giorni;

Giorno 120 che corrisponde a 120 ± 15 giorni;

Giorno 150 che corrisponde a 150 ± 15 giorni;

Giorno 180 che corrisponde a 180 ± 15 giorni;

Giorno 360 che corrisponde a 360 ± 90 giorni;

Giorno 540 che corrisponde a 540 ± 90 giorni;

Giorno 720 che corrisponde a 720 ± 90 giorni.

Dei soggetti inclusi nello studio sono stati presi in considerazione il tipo e la durata del trattamento effettuato. Di conseguenza, i soggetti sono stati suddivisi nelle quattro categorie seguenti:

nessun trattamento effettuato;

trattamento effettuato con *Glucantime* o *Glucantime + Allopurinolo*;

trattamento effettuato con *Milteforan* o *Milteforan + Allopurinolo*;

qualsiasi altro trattamento effettuato contro la leishmaniosi (es: *Metronidazolo*, *Allopurinolo*, ecc...).

I soggetti in terapia, sono stati ulteriormente suddivisi in due categorie in base all'esecuzione di un trattamento antiproteinurico con ACE-inibitori:

nessun trattamento con ACE-inibitori effettuato;

trattamento effettuato con ACE-inibitori (*Enalapril*, *Benazepril*, ecc..).

Dei pazienti inclusi in questo studio, è stata riportata l'eventuale comparsa di recidiva, il numero di recidive per ogni paziente ed il tempo trascorso dalla diagnosi/inizio della terapia in cui la recidiva è comparsa. Per i soggetti che hanno recidivato è stata descritta la terapia effettuata prima e dopo la recidiva. Una volta identificata la recidiva ed iniziato il trattamento, il paziente recidivante è stato considerato come un nuovo caso ed il suo *follow up* è ripartito dal gruppo 0.

I pazienti della popolazione di studio affetti da leishmaniosi complicata da sindrome nefrosica dovevano presentare:

UPC > 2,5;

albumina sierica < 2,5 g/dl;

colesterolemia > 350 mg/dl;

comparsa di edemi o versamenti.

11.2 Determinazioni

I soggetti inclusi nello studio, dispongono di:

esame emocromocitometrico comprendente: valore ematocrito (Hct), emoglobina totale (Hb), eritrociti (RBC), volume corpuscolare medio (MCV), concentrazione di emoglobina corpuscolare media (MCHC), leucociti totali (WBC), piastrine (PLT);

profilo biochimico sierico comprendente: creatinina, urea, colesterolo, aspartato aminotransferasi (AST), alanina aminotransferasi (ALT), fosfatasi alcalina (SAP), proteine totali (PT), albumina (ALB), rapporto albumine/globuline (A/G), bilirubina totale, fosforo (P), calcio (Ca), potassio (K), cloro (Cl), sodio (Na), proteina C reattiva (CRP), ferro totale (Fe), transferrina (TIBC);

profilo coagulativo comprendente: fibrinogeno, antitrombina III (ATIII), d-dimeri (D-D);
elettroforesi sierica comprendente: α 1-globuline, α 2-globuline, β 1-globuline, β 2-globuline, γ -globuline;
esame chimico-fisico urinario comprendente: peso specifico (USG), pH, proteine urinarie determinate mediante *dipstick*, sedimento urinario;
analisi biochimica urinaria comprendente: proteine urinarie (uPT), creatinina urinaria (uCrea), albumina urinaria (uAlb), rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC), rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC).

11.3 Metodica di prelievo, processazione e stoccaggio dei campioni

I prelievi di sangue sono stati eseguiti attraverso sistema a vuoto Sarstedt® e VACUTEST® in modo da poter disporre di:

1 aliquota di sangue in K₃EDTA;

1 o più aliquote di sangue senza anticoagulante, con gel separatore, in modo da ottenere il siero;

1 aliquota di sangue con Na-citrato.

I prelievi di urina sono stati eseguiti per minzione spontanea, cateterismo vescicale e cistocentesi eco-guidata.

I campioni ottenuti in K₃EDTA sono stati processati entro un'ora dal prelievo per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico tramite i conta globuli automatici Hematology Self Cell Counter modello Baker System 9120⁺_{AX}, Abbot CELL-DYN 3500 R e Siemens ADVIA® 2120 che si sono succeduti nel periodo di tempo oggetto dello studio presso il laboratorio del dipartimento delle Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna. I campioni in K₃EDTA sono stati sottoposti ad agitazione tramite Vortex (Reamix 2789) prima delle determinazioni analitiche.

I parametri valutati sono stati: eritrociti (RBC/mm³), valore ematocrito (Hct %), emoglobina totale (Hgb gr%), volume corpuscolare medio (MCV fl), contenuto medio di emoglobina (MCH pgr), concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC gr%), 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 × g.

Il siero è stato utilizzato per l'esecuzione del 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 precedentemente validate per il cane.

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.

11.4 Determinazioni specialistiche oggetto dello studio

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 ed albumina sieriche.

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*

<i>Reagente R1</i>	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
<i>Reagente R2</i>	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
<i>Multicalibratore</i>	Calibratore allestito presso il nostro laboratorio	
<i>Controllo</i>	Controlli allestiti presso il nostro laboratorio	

Tabella 4 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 un'interferenza significativa del 10%.

Lipidi: concentrazioni di lipidi (Intralipid®) aggiunti di 1000 mg/dl portano a un'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 (600-800 nm) 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 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Reagente R2	Verde di bromocresolo 0,2mmol/l Conservante	Conservazione: 2-25 °C 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

Tabella 5 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 40 mg/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 470 nm. 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 600 nm. 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 °C 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 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni

Tabella 6 Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione delle proteine totali urinarie.

➤ *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 0,3 mmol/l.

Glucosio 277 mmol/l.

Acido urico 18 mmol/l.

Rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC)

L'UPC è stato calcolato attraverso la formula seguente:

$$uPT(\text{mg/dl}) / uCrea(\text{mg/dl}) = \text{UPC}.$$

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*

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

Tabella 7 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.

➤ *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	Idrossido 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

Tabella 8 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 40 mg/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: 7 gg
Fibrinogeno Controllo, livello basso	Fibrinogeno umano liof. 1,1 g/l	Conservazione: 2-6°C Stabilità: 7gg

Tabella 9 Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione del fibrinogeno

➤ *Principio del test:*

L'aggiunta di Ammoniosolfato, EDTA e Guanidina cloridrato determina la precipitazione del Fibrinogeno presente all'interno del campione di plasma citrato. L'analizzatore misura tale

variazione turbidimetrica dopo aver valutato il cosiddetto **bianco campione** al fine di evitare le interferenze da bilirubina, emoglobina o chilomicroni.

➤ *Linearità:*

La metodica è lineare da 0 a 9,0 g/l. I campioni contenenti valori superiori devono essere diluiti (1+2) con il **Diluente Fibrinogeno** e rivalutati.

➤ *Altri dati:*

Temperatura 25 °C.

Lunghezza d'onda 340 nm.

Antitrombina III

L'attività della **Antitrombina III** è stata determinata attraverso una metodica di tipo cromogenico (*Antitrombina III*, Roche Diagnostics GmbH) automatizzata sull'analizzatore *OLYMPUS AU 400*.

In questa sperimentazione, l'attività di AT III nel cane è stata espressa in percentuale rispetto ad un plasma di controllo umano.

➤ *Reagenti e Controllo di Qualità:*

<p><i>Reagente R1</i> <i>Reattivo Trombina</i></p>	<p>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</p>	<p>Conservazione: 2-8 °C Stabilità: 28 gg refrigerato sull'analizzatore</p>
<p><i>Reagente R2</i> <i>Reattivo Starter</i> <i>(substrato cromogeno)</i></p>	<p>MeOCO-gli-pro-arg-pNA•AcOH 1,8 mmol/l</p>	<p>Conservazione: 2-8 °C Stabilità: 28 gg refrigerato sull'analizzatore</p>
<p><i>PreciChrom I/II</i> <i>(controllo basso,</i> <i>controllo alto)</i></p>	<p>Plasma citrato umano liofilizzato a concentrazione nota di AT III (basso 41%, alto 84%)</p>	<p>Stabilità (ricostituito):</p> <ul style="list-style-type: none"> • 8 ore a 25 °C • 5 gg a +4 °C

- 28 gg a -20 °C

Tabella 10 Reagenti e controlli di qualità per la determinazione dell'antitrombina 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

Tabella 11 Calibrazione per la determinazione dell'antitrombina III.

➤ *Principio del test:*

$ATIII + Eparina \rightarrow (ATIII-Eparina) + Trombina_{in\ eccesso} \rightarrow$
 $\rightarrow (ATIII-Eparina-Trombina) + Trombina_{residua} \rightarrow$
 $\rightarrow Trombina_{residua} + substrato\ cromogeno \rightarrow p\text{-nitroanilina(cromogeno)}$

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 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	Siero umano liofilizzato a	Conservazione: 2-8 °C

I/II (controllo basso, controllo alto)	concentrazione nota di D-dimero (basso 0,88 µg/dl, alto 4,19 µg/dl)	Stabilità (ricostituito): <ul style="list-style-type: none"> • 1gg a 15-25 °C • 14gg a 2-8 °C
---	---	---

Tabella 12 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

Tabella 13 Calibrazioni per la determinazione dei D-Dimeri.

➤ *Principio del test:*

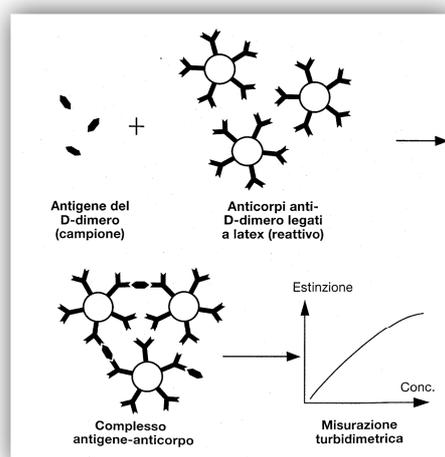


Figura 21 Principio del test immunoturbidimetrico al lattice per la determinazione dei D-Dimeri.

➤ *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.

Elettroforesi sierica

L'elettroforesi sierica è stata eseguita in gel di agarosio utilizzando il kit Hydragel PROTEIN(E) della Sebia, applicato su strumento per elettroforesi Hydrasys, Sebia (Sebia, Milano).

Metodica di immunofluorescenza indiretta (IFI)

Per la metodica di immunofluorescenza indiretta ci si è avvalsi del kit FLUO LEISHMANIA (Agrolabo s.p.a.) disponibile presso il Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (SEPAC VET).

Citologia

Per la colorazione citologica dei preparati ottenuti da linfonodi, cute, midollo osseo e milza è stata utilizzata la colorazione *May-GrünWald-Giemsa* (Merk®) per citologia.

Analisi statistica

Per l'analisi statistica questa sperimentazione si è avvalsa del software per statistica medica MedCalc® 12.4.0.0. I parametri laboratoristici dell'ammissione sono stati espressi mediante l'impiego di tabelle di statistica descrittiva ed i parametri risultati di maggiore interesse per la diagnosi di leishmaniosi sono stati rappresentati graficamente per mezzo di grafici *box-and-whiskers* che suddividono la popolazione in quattro quartili, rappresentano la mediana come linea centrale all'interno del box ed i valori di massimo e minimo come linee estreme.

I dati dell'ammissione e dei nove gruppi di follow up sono stati successivamente confrontati mediante l'utilizzo del *Kruskal-Wallis test* ed i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per $P < 0,05$.

Per l'analisi di sopravvivenza, sono stati presi come *endpoint* 360 e 720 giorni ed è stata eseguita un'analisi univariata dei singoli parametri laboratoristici mediante *cox proportional-hazard regression*, al fine di ricavare l'*hazard ratio* di ciascun dato clinico-patologico. I risultati statisticamente significativi ($P < 0,05$) a quest'ultima analisi sono stati valutati contemporaneamente nell'analisi multivariata mediante *regressione logistica* con metodo *Stepwise* che inserisce le variabili con $P < 0,05$ e rimuove quelle con $P > 0,1$ al fine di ricavare l'*odds ratio* delle variabili statisticamente significative. La variabile risultata statisticamente significativa all'analisi multivariata è stata rappresentata graficamente mediante una curva di ROC (*receiver operating characteristic*).

Con i dati di UPC, UAC e creatinina sierica ottenuti all'ammissione e nei diversi gruppi di *follow up* è stata effettuata un'interpolazione dati. In seguito, si è impiegato il *Friedman test* per dati non parametrici che ha permesso di evidenziare la progressione dei tre parametri valutati nei diversi gruppi di *follow up*. I risultati sono stati considerati significativi per $P < 0,05$ e sono stati rappresentati mediante l'impiego di grafici *box-and-whiskers*. Infine, è stata valutata la progressione dell'UPC, dell'UAC e della creatinina sierica nei diversi gruppi di *follow up* in funzione dell'*outcome* e dei trattamenti per la leishmaniosi effettuati. I risultati sono stati rappresentati graficamente mediante l'impiego di *clustered multiple variables graphs* a barre e a linee orizzontali, indicanti rispettivamente i valori mediani ed i valori medi.

12.RISULTATI

12.1 Popolazione selezionata e dati epidemiologici

Nel periodo oggetto dello studio (Gennaio 2001 – Febbraio 2013) sono stati portati a visita 10302 cani. I pazienti che sono stati inclusi come affetti da leishmaniosi sono 167, pertanto la prevalenza complessiva stimata risulta essere del 1,6%. Dei pazienti inclusi nello studio, 17/167 pazienti (10,2%) hanno recidivato. In 1/167 (0,6%) pazienti la recidiva si è presentata tre volte ed in 1/167 (0,6%) pazienti la recidiva si è presentata due volte. Comprendendo anche le recidive sono stati riconosciuti 187 soggetti trattati.

Il titolo anticorpale all'immunofluorescenza indiretta (IFI) era disponibile per 144/167 (86,2%) pazienti (Tabella 14 - Figura 22).

<i>Parametro</i>	<i>Numero pazienti</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore minimo</i>	<i>Valore massimo</i>
Titolo Ab	144	866	467	1280	40	1280

Tabella 14 Titolo anticorpale all'immunofluorescenza indiretta (IFI) nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi.

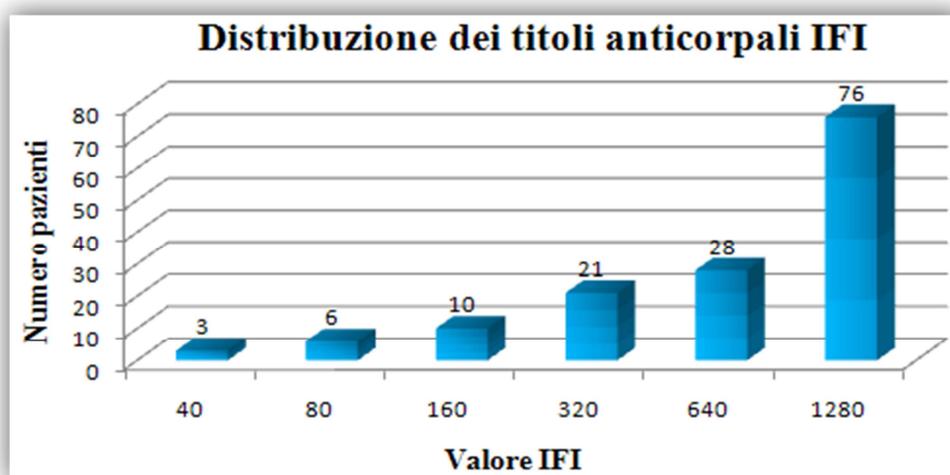


Figura 22 Distribuzione dei titoli anticorpali (144/167) all'immunofluorescenza indiretta (IFI) nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi.

Un esame citologico che ha permesso di mettere in evidenza la presenza delle forme amastigote di *Leishmania spp.* era disponibile per 48/167 (28,7%) pazienti e la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) positiva per leishmaniosi era disponibile per 2/167 (1,2%) pazienti.

La popolazione si presenta eterogenea per età, sesso e razza. Le età dei pazienti in cui è stata diagnosticata la leishmaniosi sono riportate in **Tabella 15** e rappresentate graficamente in **Figura 23**.

<i>Parametro</i>	<i>Numero pazienti</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore minimo</i>	<i>Valore massimo</i>
Età (mesi)	167	67	38	60	6	168

Tabella 15 Età della popolazione di studio in corso di leishmaniosi.

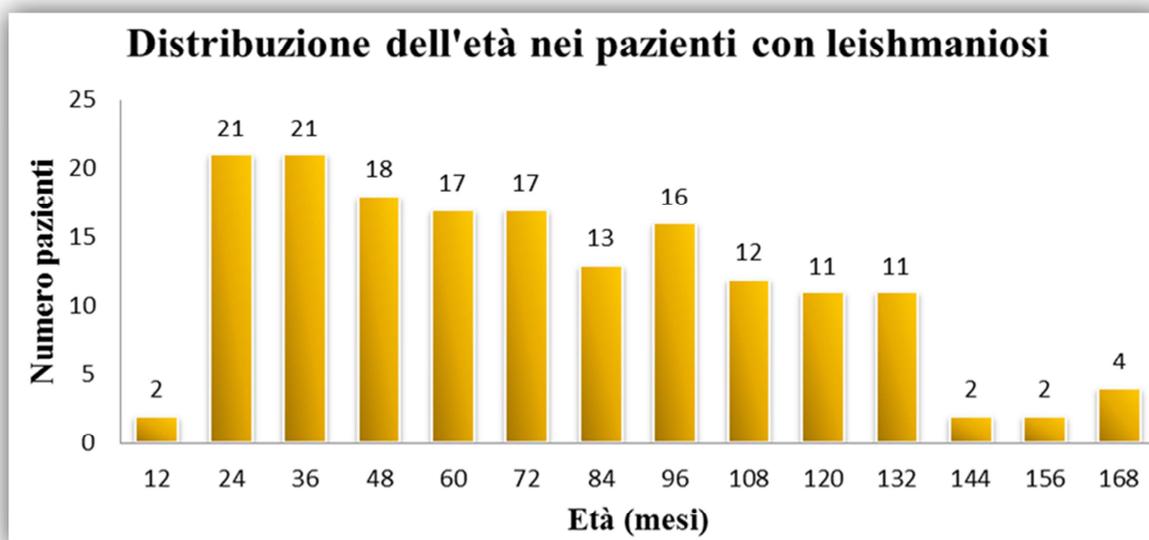


Figura 23 Distribuzione dell'età nella popolazione di studio (167 pazienti) in corso di leishmaniosi.

Dei casi inclusi nello studio, 114/167 (68,3%) erano maschi di cui 5 castrati; le femmine erano 53/167 (31,7%) di cui 14 sterilizzate (**Figura 24**).

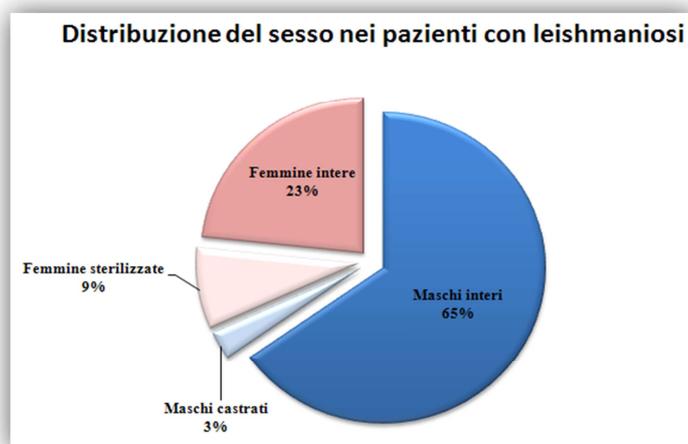


Figura 24 Distribuzione del sesso nella popolazione di studio (167 pazienti) in corso di leishmaniosi.

Le razze maggiormente rappresentate sono state: Boxer, Dobermann Pinscher, Labrador, Pastore Tedesco, American Staffordshire, Setter Inglese con un prevalenza variabile dal 3% al 5%. Le razze con una prevalenza inferiore al 3% sono state accorpate nel gruppo “altre razze” che rappresenta il 31% della popolazione, mentre la grande maggioranza della popolazione su cui si è basato questo studio era composta da meticci (45%) (**Figura 25**).



Figura 25 Distribuzione e frequenza delle razze nella popolazione di studio (167 pazienti) in corso di leishmaniosi.

12.2 Distribuzione e frequenza dei segni clinici

I segni clinici più frequentemente riscontrati nei soggetti inclusi nello studio sono stati: dermatopatia (nel 49% dei pazienti), linfoadenomegalia (nel 20% dei pazienti), dimagrimento (nel 17% dei pazienti), poliuria/polidipsia (nel 16% dei pazienti), anoressia/disoressia (nel 12% dei pazienti), depressione del sensorio/abbattimento (nel 12% dei pazienti), segni gastroenterici (vomito o diarrea) (nel 11% dei pazienti), astenia/debolezza (riluttanza al movimento) (nel 10% dei pazienti), pallore delle mucose (nel 5% dei pazienti), segni oculari (nel 4% dei pazienti), epato-splenomegalia (nel 4% dei pazienti), epistassi (nel 3% dei pazienti), zoppia (nel 2% dei pazienti), ulcere mucosali (nel 1% dei pazienti) ed onicogrifosi (nel 1% dei pazienti). L'1% dei soggetti si è dimostrato asintomatico (**Figura 26**).

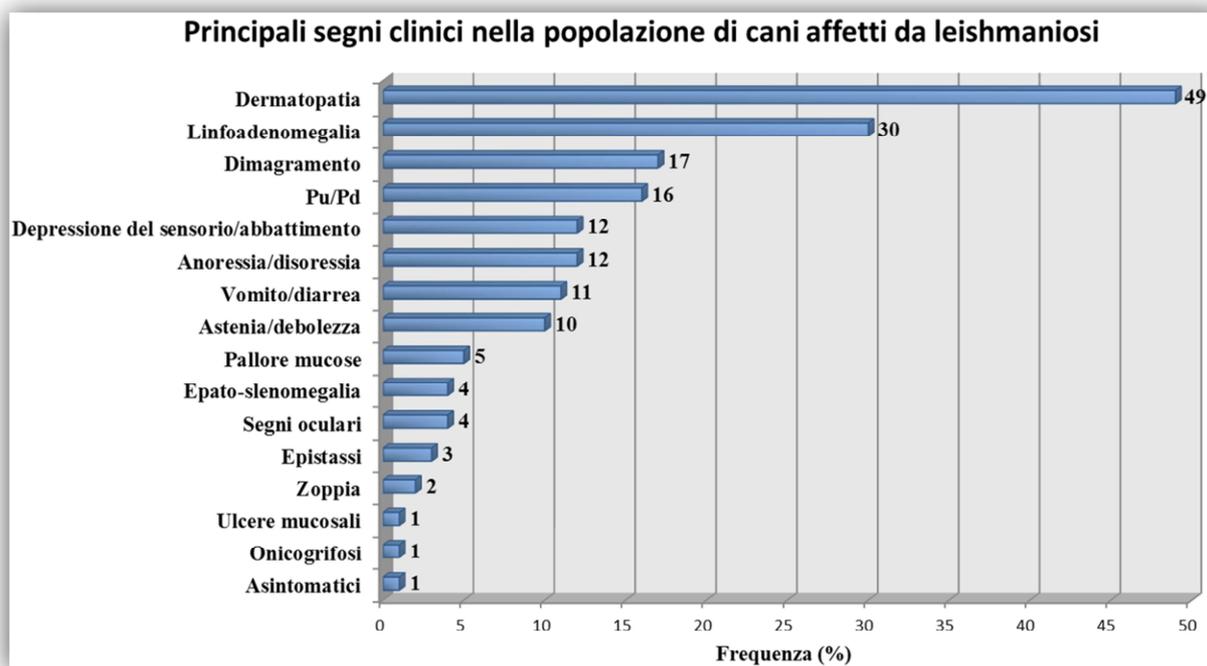


Figura 26 Principali segni clinici espressi in termini di frequenza percentuale nella popolazione di studio (167 pazienti) in corso di Leishmaniosi.

12.3 Risultati dati clinico-patologici all'ammissione

Nella popolazione di studio inclusa come affetta da leishmaniosi, le indagini clinico-patologiche eseguite all'ammissione vengono riportate in tabelle come statistica descrittiva. Quest'ultime sono distinte in: esame emocromocitometrico (**Tabella 16**), profilo biochimico sierico (**Tabella 17**), analisi urinaria (comprendente esame chimico-fisico delle urine e biochimica urinaria) (**Tabella 18**), profilo coagulativo (**Tabella 19**) ed elettroforesi sierica (**Tabella 20**). Le recidive (20 totali) sono state considerate come nuovi casi ed il giorno della diagnosi di recidiva è stato considerato come l'ammissione del nuovo caso.

<i>Parametro</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore minimo</i>	<i>Valore massimo</i>	<i>Intervallo di riferimento</i>
Hct (%)	187	35,2	10,4	35,8	11,2	58	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	187	12,2	3,5	12,3	3,9	20,1	12 - 18
RBC (RBC/mm³)	187	5300766	1530734	5490000	1570000	8680000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	187	66,0	5,8	66,5	20,5	83,2	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	187	34,8	1,9	35,1	28,3	39,7	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm³)	187	10965	7092	9550	1000	50000	6000 - 17000
PLT (PLT/mm³)	187	226416	127572	221000	1800	742000	160000 - 500000

Tabella 16 Risultati di alcuni parametri selezionati dall'esame emocromocitometrico all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (Hct: ematocrito; Hb: emoglobina; RBC: eritrociti; MCV: volume corpuscolare medio; MCHC: concentrazione emoglobinica corpuscolare media; WBC: leucociti; PLT: piastrine).

<i>Parametro</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore minimo</i>	<i>Valore massimo</i>	<i>Intervallo di riferimento</i>
Creatinina (mg/dl)	187	2,01	2,33	1,03	0,31	14,41	0,65 - 1,35
Urea (mg/dl)	187	85,84	110,22	40	8	790	18 - 55
Fosforo (mg/dl)	175	6,14	5,25	4,4	1,8	37	2,6 - 4,9
Colesterolo (mg/dl)	170	228	93	216	84	676	140 - 350
Proteine totali (g/dl)	187	7,79	1,93	7,38	3,86	15,17	5,60 - 7,90
Albumina (g/dl)	187	2,33	0,68	2,3	0,85	4,06	2,80 - 3,70
Globuline (g/dl)	187	5,34	2,21	4,80	0	14,22	N.D.
A/G	187	0,51	0,27	0,45	0,07	1,29	0,60 - 1,30
CRP (mg/dl)	46	3,49	4,86	1,90	0,01	27,06	0 - 0,5
Ferro (µg/dl)	89	92	44	82	28	253	50 - 230
TIBC (µg/dl)	88	276	77	273	101	513	240 - 440
ALT (U/l)	187	64	107	38	3	1006	20 - 55
AST (U/l)	187	59	59	41	17	431	20 - 42
SAP (U/l)	187	217	703	95	11	9456	42 - 180
BIL (mg/dl)	167	0,28	0,62	0,19	0,01	7,07	0,07 - 0,34
Sodio (mEq/l)	187	145	4	145	135	171	143 - 154
Potassio (mEq/l)	187	4,6	0,7	4,5	3,1	8,8	3,9 - 5,3
Cloro (mEq/l)	108	111	5	111	86	121	108 - 118
Calcio (mg/dl)	169	9,8	1,2	9,9	5,2	12,7	9,0 - 11,8

Tabella 17 Risultati di alcuni parametri selezionati dal profilo biochimico sierico all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (A/G: rapporto albumina/globuline; CRP: proteina C-reattiva; TIBC: transferrina; ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartato aminotransferasi; SAP: fosfatasi alcalina; BIL: bilirubina totale; N.D.: non disponibile).

<i>Parametro</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione e standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore Minimo</i>	<i>Valore Massimo</i>	<i>Intervallo di riferimento</i>
USG	164	1028	14	1025	1004	1064	N.D.
pH	163	6,3	1,02	6	5	9	N.D.
uPT dipstick (mg/dl)	165	152,42	206,41	30	0	500	0
uPT (mg/dl)	115	291,40	381,922	116,25	4,9	2407,6	N.D.
uCrea (mg/dl)	115	137,96	89,92	118,54	5,96	418,39	N.D.
UPC	115	3,6	5,6	1,4	0,1	29,9	0 - 0,4
uAlb (mg/dl)	93	124,54	232,23	22,6	0,02	2004,8	0-3
UAC	93	1,45	2,34	0,30	0,01	13,674	0 - 0,024

Tabella 18 Risultati di alcuni parametri selezionati dall'analisi urinaria all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (USG: *urine specific gravity*; uPT: *proteine totali urinarie*; uCrea: *creatinina urinaria*; uAlb: *albumina urinaria*; UPC: *urine protein to creatinine ratio*; UAC: *urine albumin to creatinine ratio*; N.D.: non disponibile).

<i>Parametro</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore minimo</i>	<i>Valore massimo</i>	<i>Intervallo di riferimento</i>
Fibrinogeno (g/l)	48	4,53	1,71	4,25	0,57	8,98	1,45 - 3,85
D-Dimeri (µg/ml)	60	1,14	4,55	0,28	0,01	34,61	0 - 0,26
Antitrombina III (%)	60	91	22	91	45	148	105 - 166

Tabella 19 Risultati di alcuni parametri selezionati dal profilo coagulativo all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi.

<i>Parametro</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Media</i>	<i>Deviazione standard</i>	<i>Mediana</i>	<i>Valore minimo</i>	<i>Valore massimo</i>	<i>Intervallo di riferimento</i>
Proteine totali (g/dl)	93	8,38	2,12	7,90	4,74	15,70	5,60 - 7,90
Albumina (g/dl)	93	1,94	1,05	1,89	0,16	4,05	2,80 - 3,70
Albumina (%)	93	25,81	15,98	23,60	1,50	56,20	N.D.
α-1 globuline (g/dl)	93	0,37	0,28	0,29	0,09	1,47	0,10 - 0,35
α-1 globuline (%)	93	4,49	3,36	3,40	0,74	18,70	N.D.
α-2 globuline (g/dl)	93	1,02	0,35	1,05	0,00	1,72	0,40 - 0,95
α-2 globuline (%)	90	13,29	4,49	13,40	0,96	22,70	N.D.
β-1 globuline (g/dl)	93	0,84	0,46	0,70	0,17	3,32	0,63 - 1,05
β-1 globuline (%)	93	10,30	5,65	8,90	2,10	42,10	N.D.
β-2 globuline (g/dl)	93	0,88	0,87	0,74	0,00	7,10	0,35 - 0,80
β-2 globuline (%)	85	11,33	7,76	9,40	3,60	66,70	N.D.
γ-globuline (g/dl)	93	3,23	2,62	2,70	0,00	10,77	0,42 - 0,78
γ-globuline (%)	90	35,98	21,13	32,10	4,60	77,60	N.D.

Tabella 20 Risultati dei parametri dell'elettroforesi sierica all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (N.D.: non disponibile).

Di seguito vengono rappresentati, in grafici *box-and-whisker*, alcuni parametri clinico-patologici dell'ammissione risultati essere di maggiore interesse per la diagnosi di leishmaniosi e l'evidenziazione delle complicazioni associate come la sindrome nefrosica.

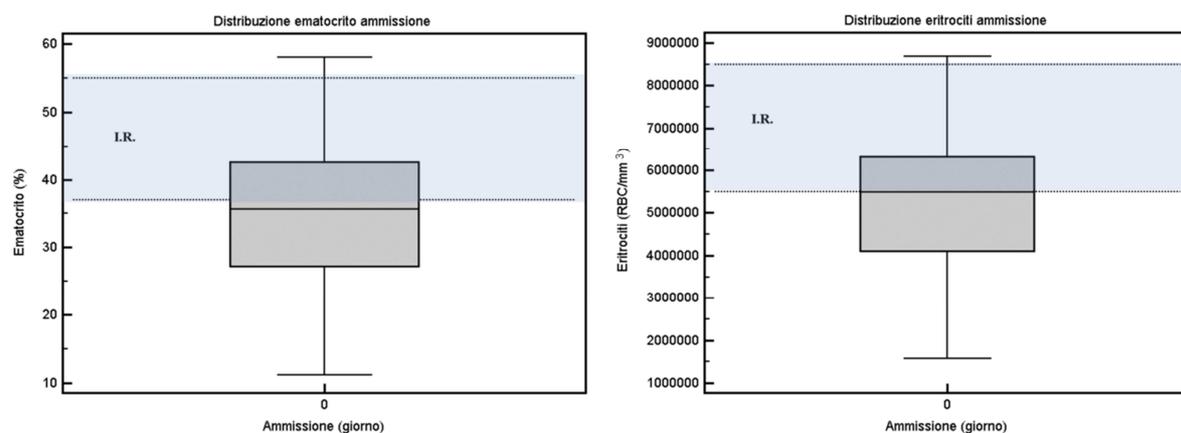


Figura 27 Distribuzione dei valori dell'ematocrito e degli eritrociti all'ammissione nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

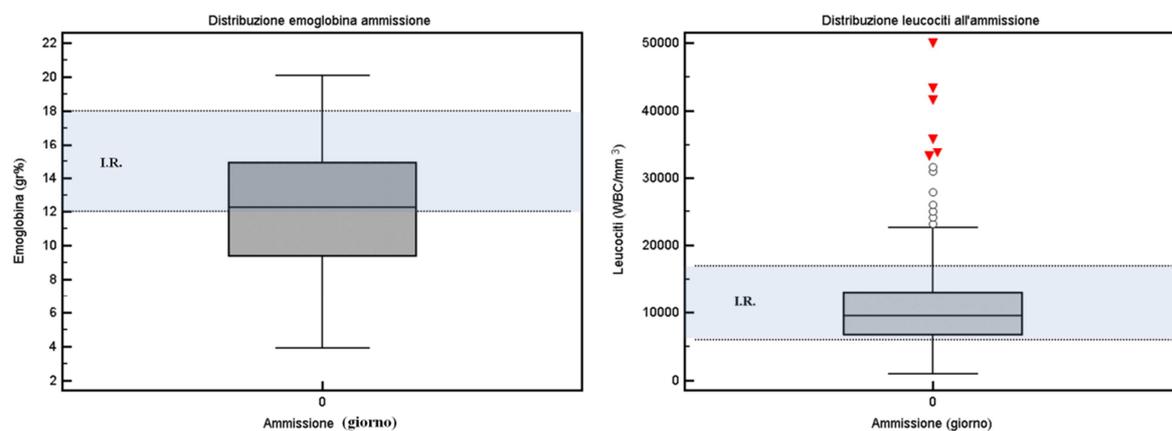


Figura 28 Distribuzione dei valori di emoglobina e leucociti all'ammissione nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

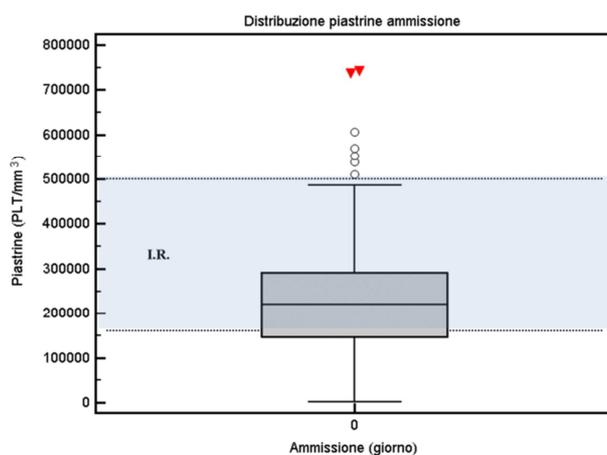


Figura 29 Distribuzione dei valori delle piastrine all'ammissione nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

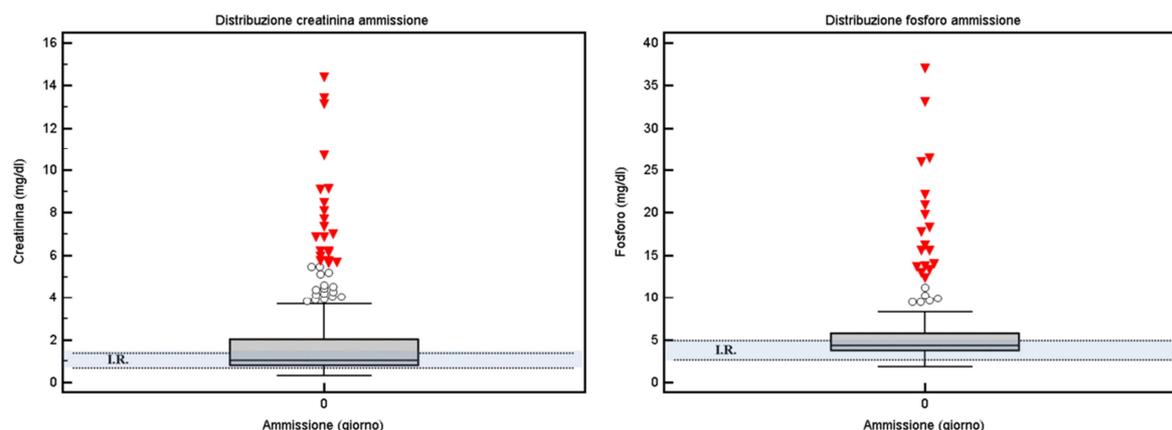


Figura 30 Distribuzione dei valori di creatinina (187 casi) e fosforo (175 casi) all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

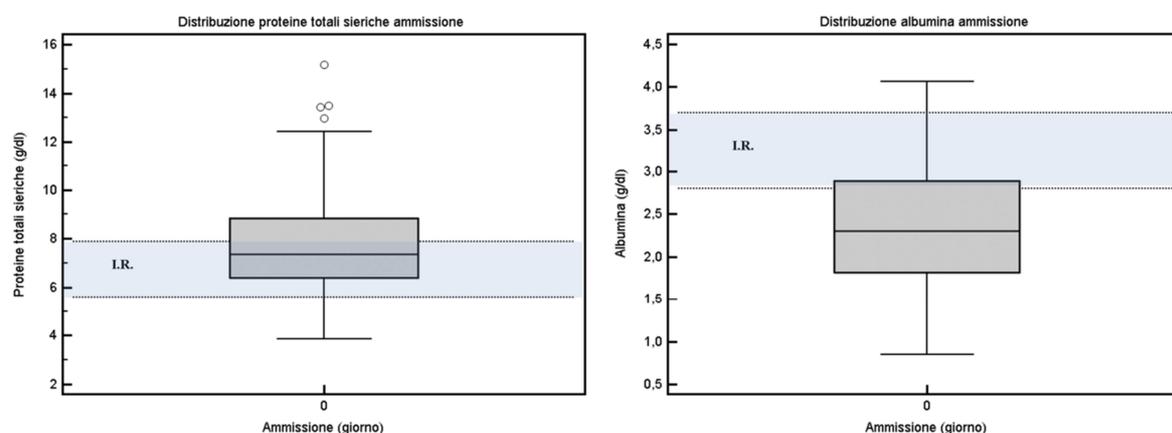


Figura 31 Distribuzione dei valori di proteine totali ed albumina sieriche all'ammissione nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

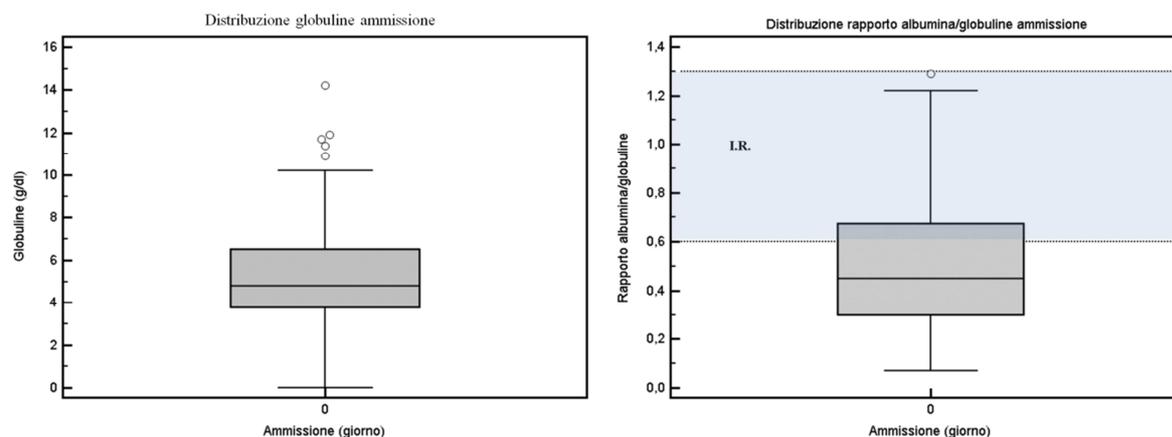


Figura 32 Distribuzione dei valori di globuline e del rapporto albumina/globuline all'ammissione nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

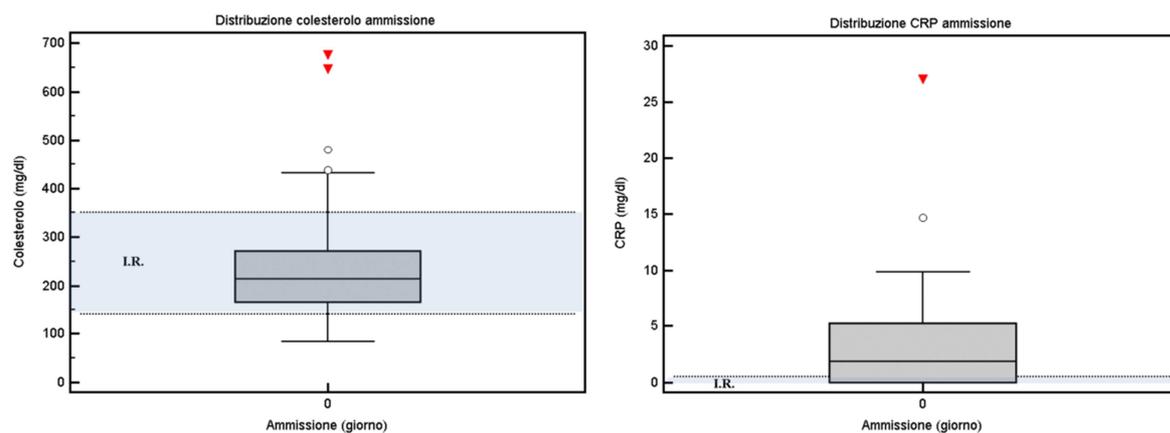


Figura 33 Distribuzione dei valori di colesterolo (170 casi) e proteina C reattiva (46 casi) all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

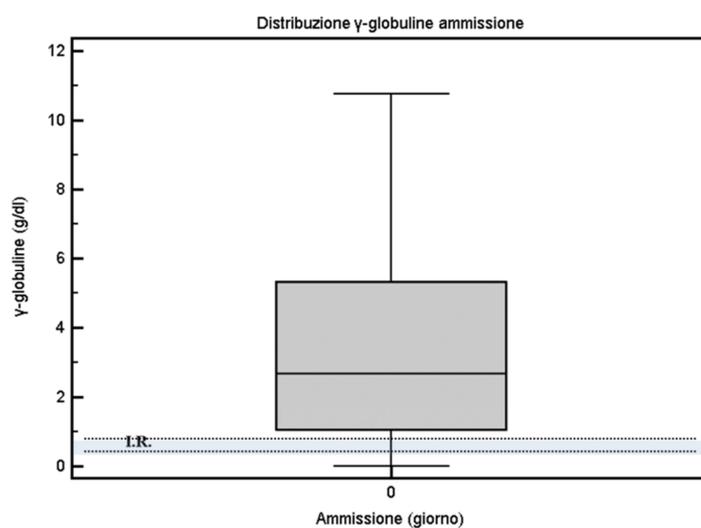


Figura 34 Distribuzione dei valori di γ -globuline (93 casi) all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

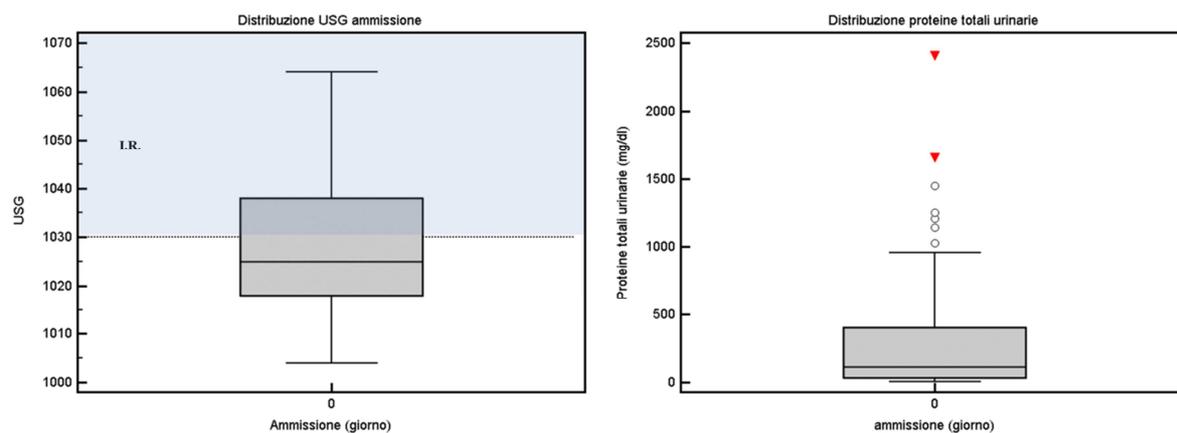


Figura 35 Distribuzione dei valori di peso specifico (164 casi) e proteine totali urinarie alla biochimica (115 casi) all'ammissione nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; USG: *Urine Specific Gravity*).

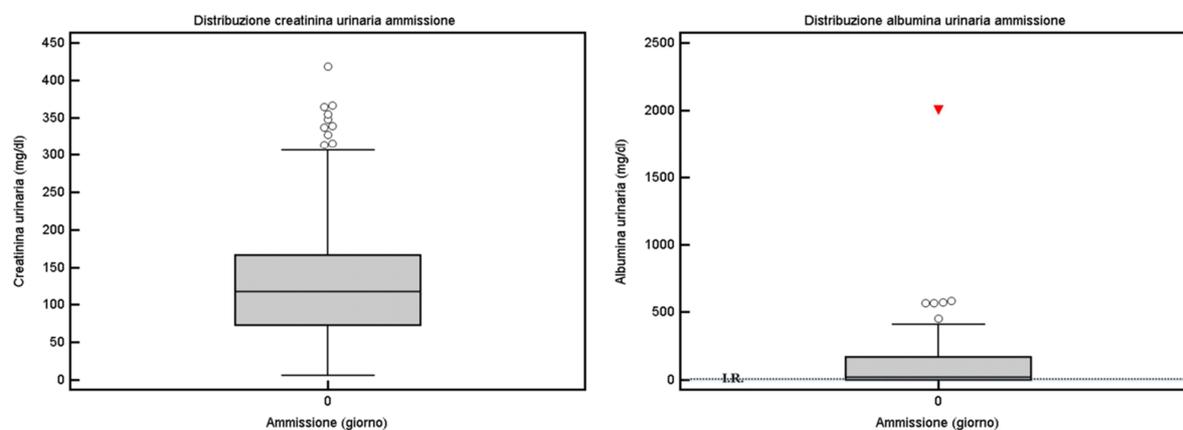


Figura 36 Distribuzione dei valori di creatinina ed albumina urinarie all'ammissione nella popolazione di studio (115 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

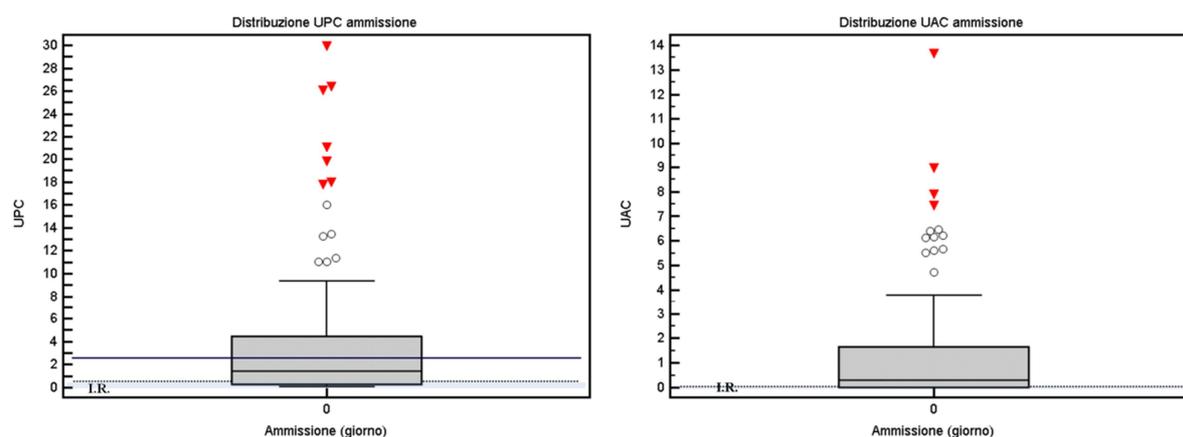


Figura 37 Distribuzione dei valori di UPC e UAC all'ammissione nella popolazione di studio (115 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; la linea blu indica il valore *cut off* di UPC per definire una proteinuria nel range nefrosico).

Utilizzando i risultati dei dati clinico-patologici, è stata stimata la frequenza delle principali e più importanti alterazioni rilevate nella popolazione inclusa in questo studio. Il riepilogo di questi dati è riportato in **Tabella 21** e rappresentato graficamente in **Figura 38**.

<i>Alterazione clinico-patologica</i>	<i>Numero parametri</i>	<i>Numero alterazioni</i>	<i>Frequenza (%) alterazioni</i>	<i>Valore medio dell'alterazione</i>	<i>Mediana dell'alterazione</i>
Aumento UAC (> 0,024)	93	73	78	2,04	1,132
Iperglobulinemia (> 0,78 g/dl)	93	70	75	3,88	3,03
Aumento UPC (≥ 0,5)	115	80	70	5,6	3,4
Ipoalbuminemia (< 2,8 g/dl)	187	124	66	2,02	2,09
Proteinuria al dipstick (> 0 mg/dl)	165	109	66	214,86	100
Riduzione A/G (< 0,6)	187	120	64	0,35	0,33
Aumento CRP (> 0,5 mg/dl)	46	26	57	5,59	4,45
USG inadeguato (< 1030)	164	88	54	1019,1	1020
Riduzione ATIII (< 105%)	60	31	52	81,26	85
Aumento AST (> 42 U/l)	187	81	43	85,74	64
Iperproteidemia (> 7,9 g/dl)	187	79	42	9,8	9,47
Anemia (riduzione Hb) (< 12 gr%)	187	76	41	9,28	9,4
Aumento D-Dimeri (> 0,26 µg/ml)	60	23	38	2,66	0,62
Riduzione TIBC (µg/dl)	88	28	32	189,89	197
Iperfosfatemia (> 4,9 mg/dl)	175	48	27	9,75	6,3
Iponatremia (< 143 mEq/l)	187	47	25	140,11	140
Aumento ALT (> 55 U/l)	187	42	22	143,4	84
Iperazotemia (> 1,35 mg/dl)	187	42	22	4,19	3,05
Piastrinopenia (< 160000 PLT/mm ³)	187	40	21	88078	90650
Ipoferremia (< 50 µg/dl)	89	14	16	38,71	37
Leucopenia (< 6000 WBC/mm ³)	187	26	14	4537,69	4900

Tabella 21 Riepilogo della principali alterazioni clinico-patologiche rilevate nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (UAC: *urine albumin to creatinine ratio*; UPC: *urine protein to creatinine ratio*; A/G: rapporto albumina/globuline; CRP: proteina C-reattiva; USG: urine specific gravity; ATIII: antitrombina III; AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi; Hb: emoglobina; TIBC: transferrina).

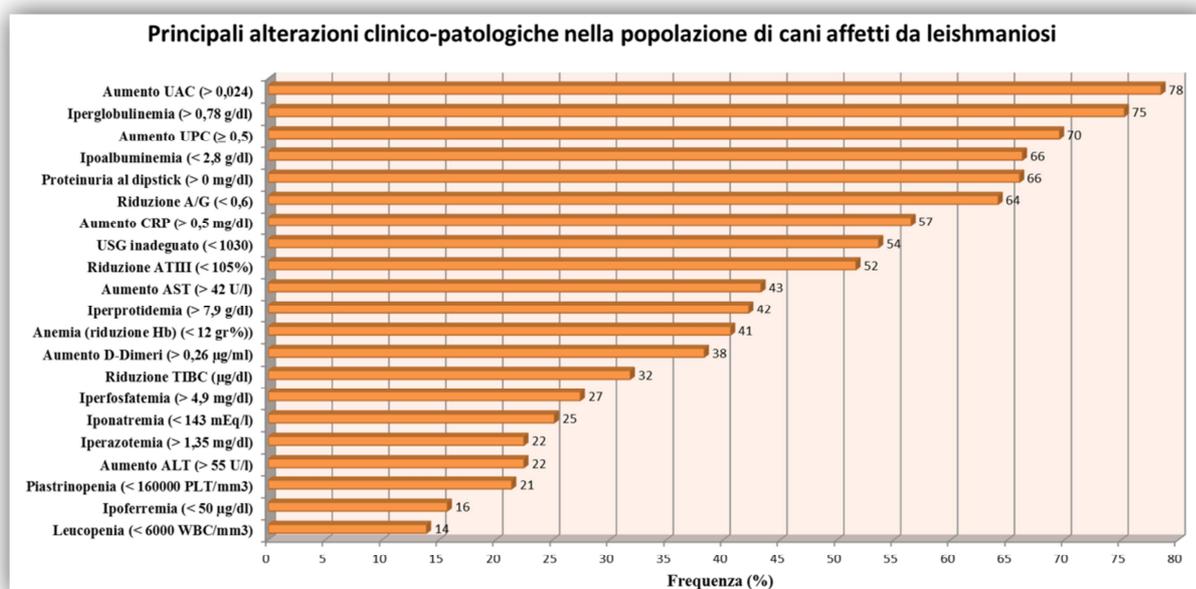


Figura 38 Principali alterazioni clinico-patologiche espresse in termini di frequenza percentuale rilevate nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (UAC: *urine albumin to creatinine ratio*; UPC: *urine protein to creatinine ratio*; A/G: rapporto albumina/globuline; CRP: proteina C-reattiva; USG: *urine specific gravity*; ATIII: antitrombina III; AST: aspartato aminotransferasi; ALT: alanina aminotransferasi; Hb: emoglobina; TIBC: transferrina).

12.4 Suddivisione e classificazione della popolazione di studio

I pazienti presentanti l'UPC all'ammissione, corrispondente al momento della diagnosi, erano 115/167 (68,9%). I pazienti proteinurici all'ammissione ($UPC \geq 0,5$) erano 72/115 (62,6%). I pazienti non proteinurici all'ammissione ($UPC < 0,5$) erano 43/115 (37,4%) e di quest'ultimi, 11/115 (9,6%) si sono dimostrati albuminurici ($UAC \geq 0,024$) e 26/115 (22,6%) non albuminurici ($UAC < 0,024$) (Tabella 22 - Figura 39).

<i>Categoria</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Frequenza (%)</i>
Proteinurici ($UPC \geq 0,5$)	72	62,6
Non proteinurici e albuminurici ($UPC < 0,5$ e $UAC > 0,024$)	10	27,0
Non proteinurici e non albuminurici ($UPC < 0,5$ e $UAC \leq 0,024$)	27	73,0

Tabella 22 Classificazione pazienti proteinurici ($UPC \geq 0,5$) e non proteinurici ($UPC < 0,5$), distinti in albuminurici ($UAC \geq 0,024$) e non albuminurici, all'ammissione ($UAC < 0,024$) nella popolazione di studio (115/167 pazienti) in corso di leishmaniosi.

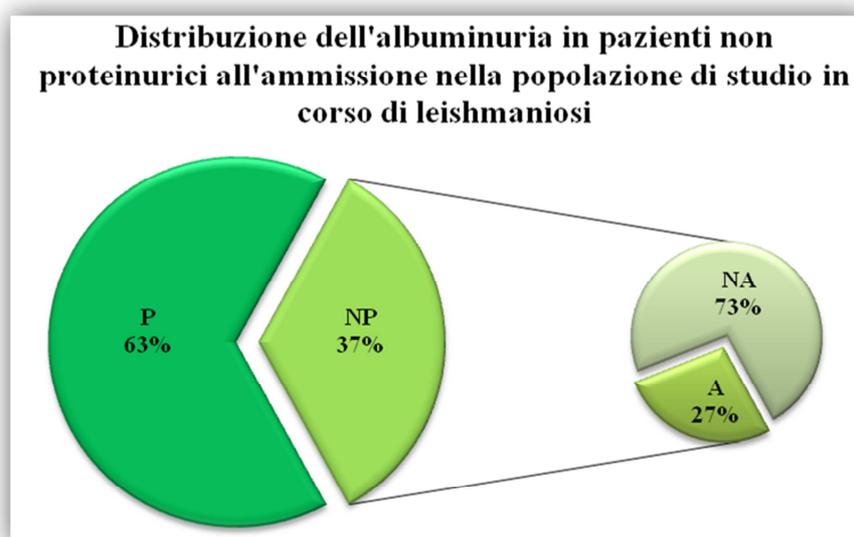


Figura 39 Distribuzione, in termini di frequenza percentuale, dei pazienti proteinurici e non proteinurici, suddivisi in albuminurici e non albuminurici, all'ammissione nella popolazione di studio (115/167 pazienti) in corso di leishmaniosi (P: proteinurici con $UPC \geq 0,5$; NP: non proteinurici con $UPC < 0,5$; A: pazienti albuminurici con $UAC \geq 0,024$; NA: pazienti non albuminurici con $UAC < 0,024$).

Secondo la sottostadiazione IRIS per la proteinuria: i pazienti proteinurici (P) con $UPC \geq 0,5$ erano 72/115 (62,6%), i pazienti con proteinuria borderline (BP) con $0,2 < UPC < 0,5$ erano 15/115 (13,1%) ed i pazienti non proteinurici (NP) con $UPC \leq 0,2$ erano 28/115 (24,3%) (Tabella 23 - Figura 20).

Categoria IRIS	Numero pazienti	Frequenza (%)
P ($UPC \geq 0,5$)	72	62,6
BP ($0,2 < UPC < 0,5$)	15	13,1
NP ($UPC \leq 0,2$)	28	24,3

Tabella 23 Classificazione IRIS (*International Renal Interest Society*) della proteinuria all'ammissione nella popolazione di studio (115/167 pazienti) in corso di leishmaniosi (P: proteinurico; BP: borderline proteinurico; NP: non proteinurico).

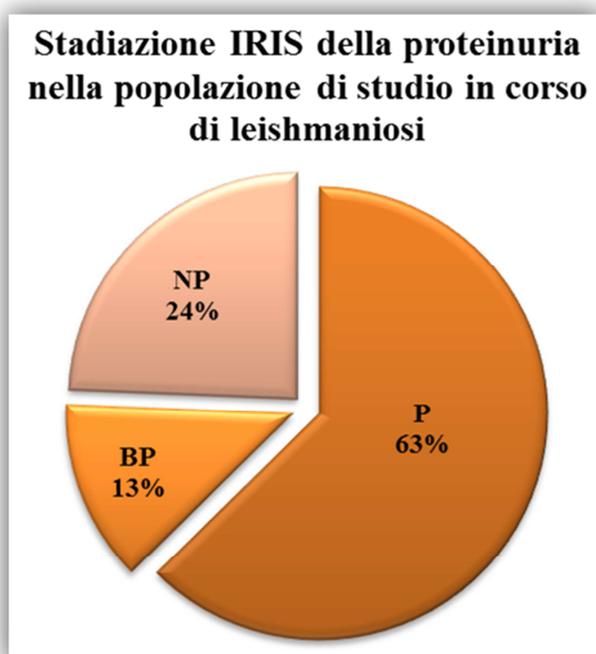


Figura 40 Distribuzione, in termini di frequenza percentuale, delle categorie IRIS (*International Renal Interest Society*) sulla stadiazione della proteinuria all'ammissione nella popolazione di studio (115/167 pazienti) in corso di leishmaniosi (NP: non proteinurici con $UPC \leq 0,2$; BP: borderline proteinurici con $0,2 < UPC < 0,5$; P: proteinurici con $UPC \geq 0,5$).

Inoltre, i pazienti con proteinuria nel range nefrosico all'ammissione ($UPC \geq 2,5$) erano 44/115 (38,3%), mentre quelli con proteinuria non nefrosica all'ammissione ($UPC < 2,5$) erano 71/115 (61,7%) (Tabella 24 - Figura 21).

<i>Categoria</i>	<i>Numero pazienti</i>	<i>Frequenza (%)</i>
NRP (UPC \geq 2,5)	44	38,3
nonNRP (UPC $<$ 2,5)	71	61,7

Tabella 24 Suddivisione pazienti proteinurici (UPC \geq 0,5) in pazienti con proteinuria nel range nefrosico (NRP) e proteinuria non nel range nefrosico (nonNRP) all'ammissione nella popolazione di studio (115/167 pazienti) in corso di leishmaniosi.

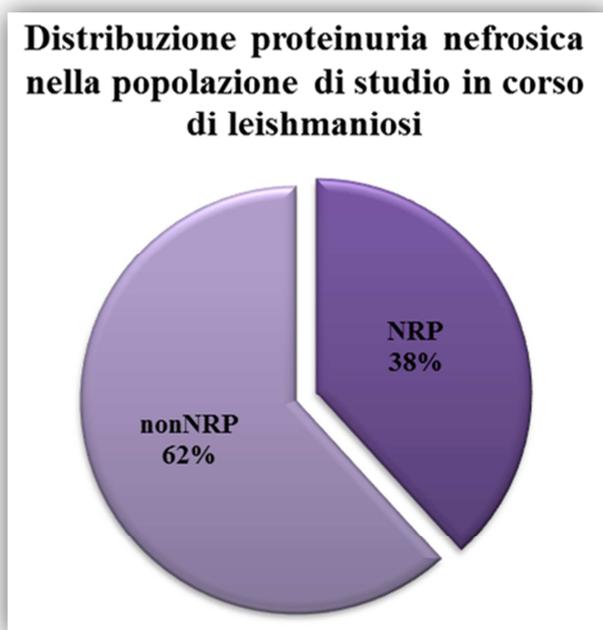


Figura 41 Distribuzione, in termini di frequenza percentuale, della proteinuria nefrosica all'ammissione nella popolazione di studio (115/167 pazienti) in corso di leishmaniosi (NRP: proteinuria nel range nefrosico con UPC \geq 2,5; nonNRP: proteinuria nel range non nefrosico con UPC $<$ 2,5).

Nei 187 casi di leishmaniosi diagnosticata nella popolazione di studio (167 pazienti e 20 recidive), la descrizione del trattamento effettuato era disponibile per 126 casi. Il tipo di trattamento effettuato nella popolazione inclusa in questo studio sono rappresentate in **Tabella 25** e **Figura 42**.

<i>Trattamento</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Frequenza (%)</i>
Nessun trattamento	5	3
Glucantime	56	30
Milteforan	23	12
Altre terapie	42	22
Non noto	61	33

Tabella 25 Trattamenti effettuati nella popolazione di studio (167 pazienti + 20 recidive) in corso di leishmaniosi.

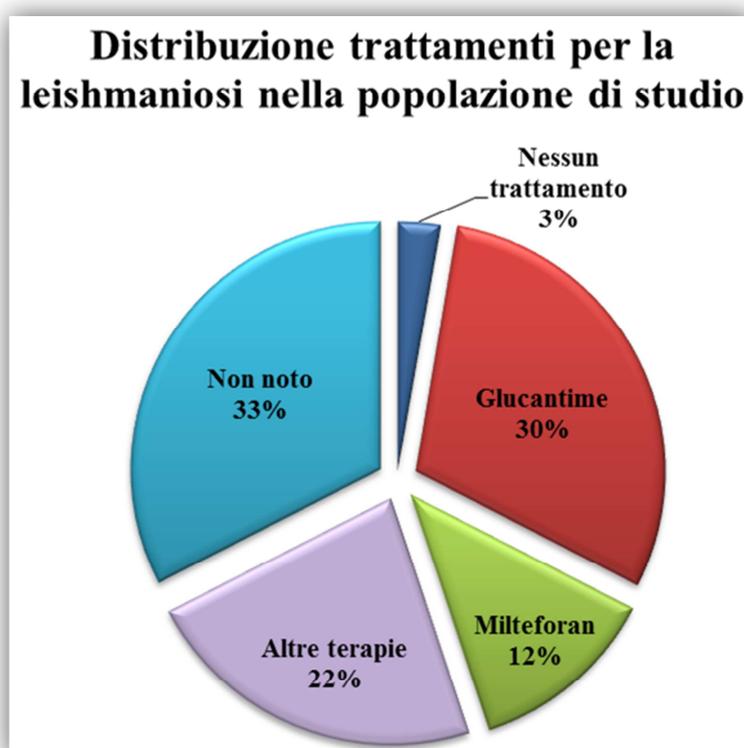


Figura 42 Distribuzione, in termini di frequenza percentuale, dei trattamenti effettuati (126 conosciuti) nella popolazione di studio (167 pazienti + 20 recidive) in corso di leishmaniosi.

La descrizione dell'impiego o non di ACE-inibitori per il trattamento della proteinuria era disponibile per 104 pazienti della popolazione inclusa in questo studio. Il numero di animali sottoposti ad una terapia antiproteinurica è descritta in **Tabella 26** e **Figura 43**.

<i>Trattamento antiproteinurico</i>	<i>Numero casi</i>	<i>Frequenza (%)</i>
In terapia	45	24
Non in terapia	59	32
Non noto	83	44

Tabella 26 Pazienti sottoposti a terapia antiproteinurica con ACE-inibitore (104 conosciuti) nella popolazione di studio (167 pazienti + 20 recidive) in corso di leishmaniosi.

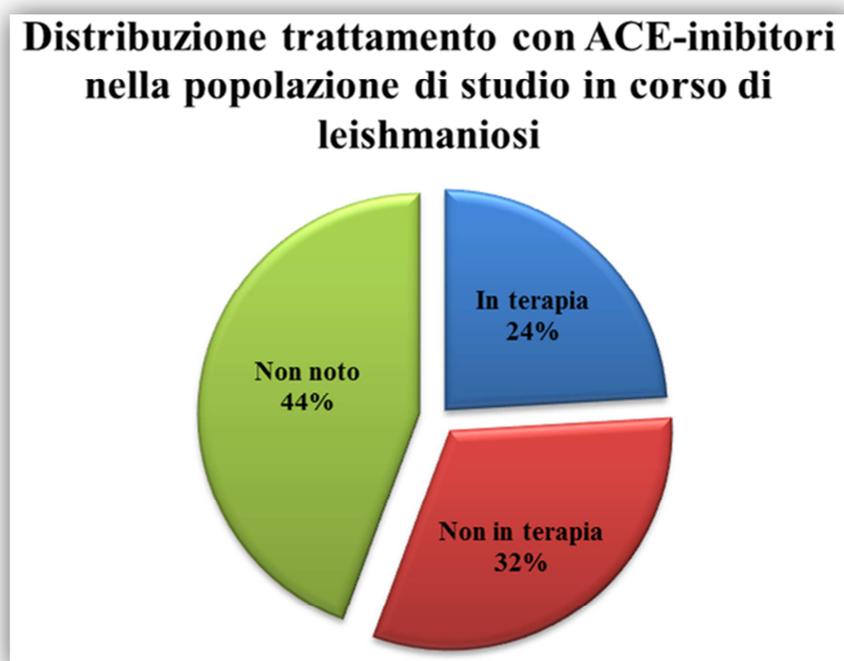


Figura 43 Distribuzione, in termini di frequenza percentuale, dell'impiego di ACE-inibitori (104 conosciuti) per il trattamento della proteinuria nella popolazione di studio (167 pazienti + 20 recidive) in corso di leishmaniosi.

12.5 Risultati dati clinico-patologici del follow up

Il follow up nelle nove categorie di tempo non era disponibile per tutti i casi, ma il numero di casi e la rispettiva frequenza percentuale per ogni gruppo di follow up è riportato in **Tabella 27**.

Gruppo	Numero casi	Frequenza (%)
0	187	100
30	66	35
60	45	24
90	45	24
120	28	15
150	26	14
180	44	24
360	50	27
540	37	20
720	25	13

Tabella 27 Disponibilità del follow up nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (167 pazienti e 20 recidive).

La distribuzione dei parametri clinico-patologici dell'ammissione e delle nove gruppi di follow up sono riportati come statistica descrittiva in tabelle distinte in: esame emocromocitometrico (**Tabella 28**), profilo biochimico sierico (**Tabella 29**), analisi urinaria (comprendente esame chimico-fisico delle urine e biochimica urinaria) (**Tabella 30**), profilo coagulativo (**Tabella 31**) ed elettroforesi sierica (**Tabella 32**). Le recidive (20 totali) sono state considerate come nuovi casi ed il giorno della diagnosi di recidiva è stato considerato come l'ammissione del nuovo caso.

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento
Gruppo 0							
Hct (%)	187	35,2	10,4	35,8	11,2	58	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	187	12,2	3,5	12,3	3,9	20,1	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	187	5300766	1530734	5490000	1570000	8680000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	187	66,0	5,8	66,5	20,5	83,2	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	187	34,8	1,9	35,1	28,3	39,7	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	187	10965	7092	9550	1000	50000	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	187	226416	127572	221000	1800	742000	160000 - 500000
Gruppo 30							
Hct (%)	66	31,9	9,9	32,1	13,7	52,3	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	67	11,1	3,5	11,3	5,1	18,9	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	67	4792388	1557664	4720000	2040000	7990000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	67	67,5	4,0	67,2	57,2	76,4	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	67	34,8	1,9	35,1	30,6	38,7	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	67	12392	8239	9200	2800	38040	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	67	276128	146960	267000	11000	663000	160000 - 500000
Gruppo 60							
Hct (%)	40	37,4	8,8	39,1	12,3	52,9	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	40	12,9	3,0	13,4	4,2	19,1	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	40	5621750	1402103	5920000	1730000	7820000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	40	67,4	4,0	67,3	60,6	77,3	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	40	34,4	2,0	34,8	30,8	36,9	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	39	11438	7368	8990	4600	37880	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	40	333973	191425	269500	19000	779000	160000 - 500000
Gruppo 90							
Hct (%)	35	40,6	6,6	41,2	26	53,3	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	35	14,0	2,2	14	9,6	19,4	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	35	6078857	985521	6210000	3750000	8130000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	35	66,8	3,0	66,9	60,7	71,9	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	35	34,7	1,7	35	29,1	38,5	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	35	10640	7720	8400	4200	46400	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	35	225754	125380	208000	26400	698000	160000 - 500000
Gruppo 120							
Hct (%)	27	39,3	9,7	40,3	19,1	56,2	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	27	13,2	3,4	13,6	6,2	19,4	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	27	5884815	1638922	6130000	2640000	9390000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	27	67,5	4,3	67,7	59,9	76,8	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	27	33,6	1,8	33,4	30,6	37,6	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	27	13003	11929	8700	4300	62700	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	27	304000	115147	271000	105000	632000	160000 - 500000
Gruppo 150							
Hct (%)	14	40,8	7,8	44,0	24,2	50,2	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	14	14,5	2,8	14,8	9,3	18,2	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	14	6346429	1226581	6750000	3560000	7760000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	14	64,4	3,9	64,7	57	71,5	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	14	35,5	2,4	35,6	31,6	39,8	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	14	8421	3043	7350	4700	16600	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	14	245143	87641	241500	104000	495000	160000 - 500000
Gruppo 180							
Hct (%)	46	41,9	7,4	43,2	25,1	58	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	46	14,4	2,6	15,0	7,8	19,2	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	46	6190435	1139060	6265000	3400000	8590000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	46	68	4,1	67,9	58,6	82,2	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	46	33,7	3,6	34,5	15,8	37,4	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	46	11822	10350	8500	4600	56700	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	46	274348	97893	271500	35000	550000	160000 - 500000
Gruppo 360							
Hct (%)	70	39,1	11,9	43,9	11	56,2	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	70	13,4	4,1	14,7	3,8	19,4	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	70	5755143	1775155	6275000	1540000	8250000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	70	68,3	4,3	68,1	58,6	81,3	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	70	34,1	2,4	34,2	21	40,3	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	70	8748	3620	8305	990	20090	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	71	254615	102599	263000	39000	482000	160000 - 500000
Gruppo 540							
Hct (%)	42	42,1	10,3	43,4	11	60,6	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	42	14,5	3,7	15,1	3,4	22	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	42	6137619	1617820	6320000	1400000	9170000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	42	68,7	4,0	68,2	60,1	78,4	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	42	34,3	1,9	34,7	29,1	37,7	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	42	9790	5488	8585	2840	33900	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	42	253160	103845	245000	55000	617000	160000 - 500000
Gruppo 720							
Hct (%)	28	44,2	8,0	46,9	21,1	55,6	37,0 - 55,0
Hb (gr%)	28	15,0	2,5	15,9	7,1	18,6	12 - 18
RBC (RBC/mm ³)	28	6488929	1108430	6820000	3260000	8000000	5500000 - 8500000
MCV (fL)	28	68,1	3,3	68,2	63,1	76	60,0 - 77,0
MCHC (gr%)	28	34,1	1,6	34,1	31	37,5	32,0 - 38,0
WBC (WBC/mm ³)	28	10787	6081	9200	5300	27200	6000 - 17000
PLT (PLT/mm ³)	28	268914	110432	244500	58000	644000	160000 - 500000

Tabella 28 Risultati di alcuni parametri selezionati dall'esame emocromocitometrico all'ammissione e nei nove gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (Hct: ematocrito; Hb: emoglobina; RBC: eritrociti; MCV: volume corpuscolare medio; MCHC: concentrazione emoglobinica corpuscolare media; WBC: leucociti; PLT: piastrine).

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento	Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento	
Gruppo 0	Creatinina (mg/dl)	187	2,01	2,33	1,03	0,31	14,41	0,65 - 1,35	Creatinina (mg/dl)	46	1,27	0,79	1,07	0,67	4,63	0,65 - 1,35
	Urea (mg/dl)	187	85,84	110,22	40	8	790	18 - 55	Urea (mg/dl)	42	59,88	58,75	38	14	255	18 - 55
	Fosforo (mg/dl)	175	6,14	5,25	4,4	1,8	37	2,6 - 4,9	Fosforo (mg/dl)	18	3,9	1,0	3,8	1,7	5,7	2,6 - 4,9
	Colesferolo (mg/dl)	170	228	93	216	84	676	140 - 350	Colesferolo (mg/dl)	18	270	85	250	115	465	140 - 350
	Proteine totali (g/dl)	187	7,79	1,93	7,38	3,86	15,17	5,60 - 7,90	Proteine totali (g/dl)	45	7,31	1,25	7,19	3,83	10,61	5,60 - 7,90
	Albumina (g/dl)	187	2,33	0,68	2,3	0,85	4,06	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)	44	2,75	0,55	2,86	1,43	3,87	2,80 - 3,70
	Globuline (g/dl)	187	5,34	2,21	4,80	0	14,22	N.D.	Globuline (g/dl)	43	4,49	1,31	4,2	2,4	8,33	N.D.
	A/G	187	0,51	0,27	0,45	0,07	1,29	0,60 - 1,30	A/G	43	0,68	0,24	0,69	0,27	1,17	0,60 - 1,30
	CRP (mg/dl)	46	3,49	4,86	1,90	0,01	27,06	0 - 0,5	CRP (mg/dl)	7	0,96	0,80	1,2	0,01	1,95	0 - 0,5
	Ferro (µg/dl)	89	92	44	82	28	253	50 - 230	Ferro (µg/dl)	3	99	21	89	85	123	50 - 230
	TIBC (µg/dl)	88	276	77	273	101	513	240 - 440	TIBC (µg/dl)	3	311	30	307	283	343	240 - 440
	ALT (U/l)	187	64	107	38	3	1006	20 - 55	ALT (U/l)	43	55	104	31	10	704	20 - 55
	AST (U/l)	187	59	59	41	17	431	20 - 42	AST (U/l)	43	33	13	28	15	71	20 - 42
	SAP (U/l)	187	217	703	95	11	9456	42 - 180	SAP (U/l)	40	116	92	80	25	412	42 - 180
	BIL (mg/dl)	167	0,28	0,62	0,19	0,01	7,07	0,07 - 0,34	BIL (mg/dl)	19	0,19	0,07	0,17	0,05	0,34	0,07 - 0,34
	Sodio (mEq/l)	187	145	4	145	135	171	143 - 154	Sodio (mEq/l)	43	145	4	146	130	153	143 - 154
	Potassio (mEq/l)	187	4,6	0,7	4,5	3,1	8,8	3,9 - 5,3	Potassio (mEq/l)	44	4,5	0,5	4,4	3,8	6,3	3,9 - 5,3
	Cloro (mEq/l)	108	111	5	111	86	121	108 - 118	Cloro (mEq/l)	6	111	4	110	107	116	108 - 118
Calcio (mg/dl)	169	9,8	1,2	9,9	5,2	12,7	9,0 - 11,8	Calcio (mg/dl)	19	9,9	1,5	10,3	4,3	11,4	9,0 - 11,8	
Gruppo 30	Creatinina (mg/dl)	79	2,00	2,05	1,17	0,49	11,11	0,65 - 1,35	Creatinina (mg/dl)	27	1,28	1,54	0,99	0,6	8,91	0,65 - 1,35
	Urea (mg/dl)	65	102,15	112,76	49	18	509	18 - 55	Urea (mg/dl)	26	55,69	61,87	37	18	299	18 - 55
	Fosforo (mg/dl)	31	6,2	3,9	4,9	2,8	17,7	2,6 - 4,9	Fosforo (mg/dl)	13	4,5	1,2	4,5	2,4	6,3	2,6 - 4,9
	Colesferolo (mg/dl)	26	225	96	194	125	557	140 - 350	Colesferolo (mg/dl)	12	297	98	281	184	480	140 - 350
	Proteine totali (g/dl)	67	7,42	1,93	7,18	3,6	12,18	5,60 - 7,90	Proteine totali (g/dl)	28	6,97	1,29	7,04	3,34	9,3	5,60 - 7,90
	Albumina (g/dl)	73	2,32	0,54	2,2	1,23	3,65	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)	26	2,65	0,53	2,68	1,33	3,44	2,80 - 3,70
	Globuline (g/dl)	67	4,94	1,99	4,45	0	10,6	N.D.	Globuline (g/dl)	26	4,29	1,05	4,22	1,88	5,99	N.D.
	A/G	66	0,54	0,23	0,52	0,15	1,17	0,60 - 1,30	A/G	26	0,65	0,20	0,62	0,33	1,11	0,60 - 1,30
	CRP (mg/dl)	8	2,15	2,45	1,15	0,01	6,76	0 - 0,5	CRP (mg/dl)	3	3,38	5,52	0,38	0,01	9,75	0 - 0,5
	Ferro (µg/dl)	8	83	44	88	26	147	50 - 230	Ferro (µg/dl)	1	139		139	139	139	50 - 230
	TIBC (µg/dl)	8	280	52	259	231	368	240 - 440	TIBC (µg/dl)	1	366		366	366	366	240 - 440
	ALT (U/l)	66	75	103	41	11	564	20 - 55	ALT (U/l)	26	64	106	40	14	571	20 - 55
	AST (U/l)	66	40	22	33	13	137	20 - 42	AST (U/l)	26	41	36	31,5	20	191	20 - 42
	SAP (U/l)	60	152	275	97	21	2145	42 - 180	SAP (U/l)	26	159	132	123,5	43	602	42 - 180
	BIL (mg/dl)	24	0,22	0,09	0,19	0,13	0,47	0,07 - 0,34	BIL (mg/dl)	12	0,15	0,03	0,15	0,11	0,19	0,07 - 0,34
	Sodio (mEq/l)	59	144	3	144	137	154	143 - 154	Sodio (mEq/l)	26	146	4	146	140	159	143 - 154
	Potassio (mEq/l)	59	4,6	0,6	4,5	3,6	7,3	3,9 - 5,3	Potassio (mEq/l)	26	4,6	0,9	4,5	3	8	3,9 - 5,3
	Cloro (mEq/l)	8	109	5	110	102	115	108 - 118	Cloro (mEq/l)	5	112	2	112	108	114	108 - 118
Calcio (mg/dl)	25	9,6	0,9	9,8	7,6	11,9	9,0 - 11,8	Calcio (mg/dl)	10	10,0	0,6	10	9	11,3	9,0 - 11,8	
Gruppo 60	Creatinina (mg/dl)	44	1,33	0,78	1,04	0,6	3,56	0,65 - 1,35	Creatinina (mg/dl)	16	1,5	1,09	1,09	0,93	5,11	0,65 - 1,35
	Urea (mg/dl)	39	74,10	89,98	38	8	413	18 - 55	Urea (mg/dl)	15	56,47	41,41	41	15	179	18 - 55
	Fosforo (mg/dl)	17	4,7	1,4	4,3	2,4	7,1	2,6 - 4,9	Fosforo (mg/dl)	8	4,3	1,4	4	2,8	7,1	2,6 - 4,9
	Colesferolo (mg/dl)	17	304	180	256	120	666	140 - 350	Colesferolo (mg/dl)	7	255	66	251	166	350	140 - 350
	Proteine totali (g/dl)	40	6,94	1,44	6,88	3,94	12,18	5,60 - 7,90	Proteine totali (g/dl)	17	6,96	1,29	6,68	3,91	10,31	5,60 - 7,90
	Albumina (g/dl)	40	2,56	0,55	2,6	1,16	3,71	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)	16	2,72	0,69	2,75	1,36	4,28	2,80 - 3,70
	Globuline (g/dl)	40	4,39	1,52	3,98	2,54	11,02	N.D.	Globuline (g/dl)	16	4,02	0,92	4,04	2,24	6,07	N.D.
	A/G	40	0,63	0,19	0,62	0,11	1,06	0,60 - 1,30	A/G	16	0,71	0,24	0,73	0,22	1,09	0,60 - 1,30
	CRP (mg/dl)	4	0,52	0,91	0,1	0,01	1,88	0 - 0,5	CRP (mg/dl)	3	0,12	0,18	0,01	0,01	0,33	0 - 0,5
	Ferro (µg/dl)	3	92	106	39	22	214	50 - 230	Ferro (µg/dl)	3	107	40	97	73	151	50 - 230
	TIBC (µg/dl)	3	315	169	365	127	453	240 - 440	TIBC (µg/dl)	2	335	57	335	295	375	240 - 440
	ALT (U/l)	40	112	260	38,5	16	1584	20 - 55	ALT (U/l)	15	45	26	45	19	110	20 - 55
	AST (U/l)	40	42	23	35	15	140	20 - 42	AST (U/l)	15	30	10	26	19	50	20 - 42
	SAP (U/l)	36	416	1218	126	23	7093	42 - 180	SAP (U/l)	13	119	59	110	51	247	42 - 180
	BIL (mg/dl)	16	0,19	0,06	0,18	0,11	0,29	0,07 - 0,34	BIL (mg/dl)	7	0,20	0,08	0,19	0,08	0,35	0,07 - 0,34
	Sodio (mEq/l)	40	145	3	146	133	152	143 - 154	Sodio (mEq/l)	14	145	2	145	140	146	143 - 154
	Potassio (mEq/l)	40	4,6	0,4	4,6	3,9	5,9	3,9 - 5,3	Potassio (mEq/l)	14	4,8	0,7	4,51	4,1	6,4	3,9 - 5,3
	Cloro (mEq/l)	5	113	7	116	101	119	108 - 118	Cloro (mEq/l)	2	116	1	116	115	116	108 - 118
Calcio (mg/dl)	15	10	0,8	9,9	8	10,9	9,0 - 11,8	Calcio (mg/dl)	7	10,0	0,5	10,2	8,9	10,5	9,0 - 11,8	

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento
Gruppo 180							
Creatinina (mg/dl)	47	1,25	0,76	1,05	0,46	4,48	0,65 - 1,35
Urea (mg/dl)	44	61,89	84,68	40	10	436	18 - 55
Fosforo (mg/dl)	20	4,6	3,0	3,7	2,9	16,7	2,6 - 4,9
Colesterolo (mg/dl)	19	259	89	251	134	424	140 - 350
Proteine totali (g/dl)	46	6,85	1,51	6,68	3,48	11,48	5,60 - 7,90
Albumina (g/dl)	45	2,88	0,61	3,01	1,28	3,59	2,80 - 3,70
Globuline (g/dl)	45	3,96	1,61	3,53	2,19	9,99	N.D.
A/G	45	0,80	0,25	0,84	0,14	1,23	0,60 - 1,30
CRP (mg/dl)	14	0,08	0,20	0,01	0,01	0,77	0 - 0,5
Ferro (µg/dl)	3	105	59	138	37	139	50 - 230
TIBC (µg/dl)	3	224	46	216	183	273	240 - 440
ALT (U/l)	44	66	85	39	14	489	20 - 55
AST (U/l)	44	39	38	29	19	251	20 - 42
SAP (U/l)	44	104	83	76	21	358	42 - 180
BIL (mg/dl)	19	0,19	0,06	0,17	0,1	0,33	0,07 - 0,34
Sodio (mEq/l)	45	146	3	146	137	154	143 - 154
Potassio (mEq/l)	45	4,5	0,5	4,4	3,5	5,6	3,9 - 5,3
Cloro (mEq/l)	8	114	4	115	109	119	108 - 118
Calcio (mg/dl)	19	10,0	0,8	10	8,2	11,4	9,0 - 11,8
Gruppo 360							
Creatinina (mg/dl)	72	1,79	1,61	1,12	0,6	8,95	0,65 - 1,35
Urea (mg/dl)	67	70,13	78,49	35	17	352	18 - 55
Fosforo (mg/dl)	39	4,7	2,6	3,7	2,2	14,3	2,6 - 4,9
Colesterolo (mg/dl)	35	263	114	229	102	659	140 - 350
Proteine totali (g/dl)	69	6,8	1,28	6,53	3,89	11,89	5,60 - 7,90
Albumina (g/dl)	70	2,86	0,55	2,99	1,55	4,48	2,80 - 3,70
Globuline (g/dl)	69	3,93	1,42	3,58	2,22	9,55	N.D.
A/G	69	0,81	0,27	0,84	0,18	1,51	0,60 - 1,30
CRP (mg/dl)	19	1,45	2,35	0,1	0,01	7,45	0 - 0,5
Ferro (µg/dl)	8	103	70	83	41	252	50 - 230
TIBC (µg/dl)	7	347	82	346	232	464	240 - 440
ALT (U/l)	66	49	44	39	13	307	20 - 55
AST (U/l)	64	35	15	33	14	122	20 - 42
SAP (U/l)	65	119	117	77	17	644	42 - 180
BIL (mg/dl)	36	0,19	0,05	0,19	0,05	0,29	0,07 - 0,34
Sodio (mEq/l)	66	146	3	146	137	152	143 - 154
Potassio (mEq/l)	66	4,6	0,4	4,5	3,9	5,9	3,9 - 5,3
Cloro (mEq/l)	19	112	4	113	101	117	108 - 118
Calcio (mg/dl)	35	10,0	0,6	10	8,7	12,3	9,0 - 11,8
Gruppo 540							
Creatinina (mg/dl)	42	2,17	3,05	1,08	0,76	16,4	0,65 - 1,35
Urea (mg/dl)	40	72,1	108,50	36,5	18	606	18 - 55
Fosforo (mg/dl)	22	5,1	4,0	3,7	2,5	17,2	2,6 - 4,9
Colesterolo (mg/dl)	22	286	102	278	141	502	140 - 350
Proteine totali (g/dl)	42	6,73	1,18	6,48	4,14	9,74	5,60 - 7,90
Albumina (g/dl)	41	2,84	0,54	2,86	1,45	3,71	2,80 - 3,70
Globuline (g/dl)	40	3,85	1,19	3,58	2,45	6,91	N.D.
A/G	40	0,81	0,27	0,8	0,35	1,37	0,60 - 1,30
CRP (mg/dl)	8	0,75	1,82	0,02	0,01	5,22	0 - 0,5
Ferro (µg/dl)	1	80		80	80	80	50 - 230
TIBC (µg/dl)	1	259		259	259	259	240 - 440
ALT (U/l)	40	40	19	37	7	90	20 - 55
AST (U/l)	40	41	58	29	18	395	20 - 42
SAP (U/l)	39	146	343	69	16	2173	42 - 180
BIL (mg/dl)	21	0,20	0,05	0,19	0,12	0,35	0,07 - 0,34
Sodio (mEq/l)	38	146	3	146	140	151	143 - 154
Potassio (mEq/l)	38	4,7	1,1	4,5	3,8	9,8	3,9 - 5,3
Cloro (mEq/l)	8	115	4	117	108	120	108 - 118
Calcio (mg/dl)	21	10,0	0,7	10,2	8,3	11,4	9,0 - 11,8
Gruppo 720							
Creatinina (mg/dl)	26	2,14	2,66	1,15	0,66	10,23	0,65 - 1,35
Urea (mg/dl)	26	94,85	131	41	21	497	18 - 55
Fosforo (mg/dl)	11	6,1	4,6	4,3	3,2	18,1	2,6 - 4,9
Colesterolo (mg/dl)	11	285	84	282	175	407	140 - 350
Proteine totali (g/dl)	27	6,29	0,92	6,27	4,31	7,8	5,60 - 7,90
Albumina (g/dl)	28	2,85	0,49	2,90	1,4	3,79	2,80 - 3,70
Globuline (g/dl)	27	3,44	0,72	3,26	2,21	5,28	N.D.
A/G	27	0,86	0,19	0,89	0,34	1,15	0,60 - 1,30
CRP (mg/dl)	7	1,85	3,35	0,23	0,01	9,23	0 - 0,5
Ferro (µg/dl)	3	115	49	140	58	147	50 - 230
TIBC (µg/dl)	3	330	77	353	244	392	240 - 440
ALT (U/l)	26	51	28	44	24	160	20 - 55
AST (U/l)	26	40	16	38	20	87	20 - 42
SAP (U/l)	26	337	852	83	18	3364	42 - 180
BIL (mg/dl)	11	0,21	0,10	0,18	0,08	0,36	0,07 - 0,34
Sodio (mEq/l)	26	147	5	147	137	162	143 - 154
Potassio (mEq/l)	26	4,6	0,4	4,5	3,6	5,7	3,9 - 5,3
Cloro (mEq/l)	5	113	3	114	109	116	108 - 118
Calcio (mg/dl)	11	10,2	0,88	9,9	9,2	12,4	9,0 - 11,8

Tabella 29 Risultati di alcuni parametri selezionati dal profilo biochimico sierico all'ammissione e nei nove gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (A/G: rapporto albumina/globuline; CRP: proteina C-reattiva; TIBC: transferrina; ALT: alanina aminotransferasi; AST: aspartato aminotransferasi; SAP: fosfatasi alcalina; BIL: bilirubina totale; N.D.: non disponibile).

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore Minimo	Valore Massimo	Intervallo di riferimento	Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore Minimo	Valore Massimo	Intervallo di riferimento		
Gruppo 0	USG	164	1028	14	1025	1004	1064	N.D.	Gruppo 150	USG	18	1037	18	1040	1006	1064	N.D.
	pH	163	6,3	1,02	6	5	9	N.D.		pH	18	6,1	0,9	6	5	8	N.D.
	uPT dipstick (mg/dl)	165	152,42	206,41	30	0	500	0		uPT dipstick (mg/dl)	18	32	40	30	0	100	0
	uPT (mg/dl)	115	291,40	381,922	116,25	4,9	2407,6	N.D.		uPT (mg/dl)	11	277,93	554,70	41,2	14,4	1858,6	N.D.
	UCrea (mg/dl)	115	137,96	89,92	118,54	5,96	418,39	N.D.		UCrea (mg/dl)	11	190,73	83,85	198,22	65,49	286,29	N.D.
	UPC	115	3,6	5,6	1,4	0,1	29,9	0 - 0,4		UPC	11	1,4	2,7	0,3	0,1	9,4	0 - 0,4
	uAlb (mg/dl)	93	124,54	232,23	22,6	0,02	2004,8	0 - 3		uAlb (mg/dl)	9	159,37	360,29	10,3	0,31	1110,18	0 - 3
UAC	93	1,45	2,34	0,30	0,01	13,674	0 - 0,024	UAC	9	0,867	1,806	0,093	0,001	5,601	0 - 0,024		
Gruppo 30	USG	42	1024	12	1020	1008	1050	N.D.	Gruppo 180	USG	31	1031	14	1030	1005	1066	N.D.
	pH	41	5,9	0,9	5,5	5	8,5	N.D.		pH	32	6,0	1,0	6	5	8,5	N.D.
	uPT dipstick (mg/dl)	42	101	154	30	0	500	0		uPT dipstick (mg/dl)	32	64	146	0	0	500	0
	uPT (mg/dl)	31	291,572	431,70	130,4	0,2	1763,22	N.D.		uPT (mg/dl)	23	233	452,82	36,8	2,4	1844,8	N.D.
	UCrea (mg/dl)	31	127,058	70,1195	119	18,02	284,39	N.D.		UCrea (mg/dl)	23	180,14	90,18	170,48	9,4	352,35	N.D.
	UPC	31	2,3	2,8	0,9	0,1	9,2	0 - 0,4		UPC	23	2,3	5,5	0,3	0,1	22,9	0 - 0,4
	uAlb (mg/dl)	18	119,951	180,9924	53,35	0,17	724,7	0 - 3		uAlb (mg/dl)	18	144,91	317,99	13,94	0,2	1270,41	0 - 3
UAC	18	1,416	1,689	0,399	0,002	4,405	0 - 0,024	UAC	18	1,432	3,046	0,101	0,003	10,769	0 - 0,024		
Gruppo 60	USG	31	1028	13	1026	1008	1064	N.D.	Gruppo 360	USG	50	1032	15	1029	1010	1076	N.D.
	pH	31	6,0	0,8	6	5	8	N.D.		pH	50	6,2	1,1	6	5	9	N.D.
	uPT dipstick (mg/dl)	31	80	145	30	0	500	0		uPT dipstick (mg/dl)	50	49	100	30	0	500	0
	uPT (mg/dl)	26	260,981	358,2546	72,85	11	1480	N.D.		uPT (mg/dl)	39	194,21	307,72	72,8	3,5	1331,6	N.D.
	UCrea (mg/dl)	26	134,502	78,68	120,17	29,9	303,99	N.D.		UCrea (mg/dl)	39	169,50	94,86	154,48	22,3	431,98	N.D.
	UPC	26	2,3	2,7	0,8	0,1	9,8	0 - 0,4		UPC	39	2,4	6,1	0,5	0,1	31,5	0 - 0,4
	uAlb (mg/dl)	21	139,698	247,7392	18,61	0,13	1058	0 - 3		uAlb (mg/dl)	38	106,34	228,80	20,84	0,14	1244	0 - 3
UAC	21	1,219	1,678	0,103	0,001	5,854	0 - 0,024	UAC	38	1,314	3,841	0,123	0,001	20,951	0 - 0,024		
Gruppo 90	USG	25	1029	14	1024	1012	1060	N.D.	Gruppo 540	USG	25	1031	13	1032	1010	1062	N.D.
	pH	25	6,4	1,0	6,5	5	9	N.D.		pH	26	6,2	1,1	6	5	9	N.D.
	uPT dipstick (mg/dl)	25	56	100	30	0	500	0		uPT dipstick (mg/dl)	26	37	98	0	0	500	0
	uPT (mg/dl)	20	226,51	399,652	86,15	7,9	1399,3	N.D.		uPT (mg/dl)	21	119,91	164,72	40	6,9	636,6	N.D.
	UCrea (mg/dl)	20	123,955	74,15	123,97	15,3	275	N.D.		UCrea (mg/dl)	21	172,30	99,03	149,2	59,12	445	N.D.
	UPC	20	2,6	3,6	0,6	0,1	11,7	0 - 0,4		UPC	20	1,1	1,6	0,2	0,1	5,7	0 - 0,4
	uAlb (mg/dl)	14	122,489	208,1421	25,36	0,3	758,3	0 - 3		uAlb (mg/dl)	19	64,78	147,99	3,25	0,21	630	0 - 3
UAC	13	1,756	2,612	0,153	0,003	7,265	0 - 0,024	UAC	19	0,621	1,365	0,022	0,001	5,611	0 - 0,024		
Gruppo 120	USG	25	1030	11	1030	1013	1050	N.D.	Gruppo 720	USG	26	1029	13	1026	1012	1058	N.D.
	pH	25	6,2	0,9	6	5	8	N.D.		pH	26	6,1	1,1	6	5	9	N.D.
	uPT dipstick (mg/dl)	25	132	191	30	0	500	0		uPT dipstick (mg/dl)	26	49	135	0	0	500	0
	uPT (mg/dl)	22	375,12	382,81	402,5	13,4	1384	N.D.		uPT (mg/dl)	16	78,32	143,38	25,1	6,1	564,7	N.D.
	UCrea (mg/dl)	22	142,94	70,77	115	33,3	283,69	N.D.		UCrea (mg/dl)	16	173,36	102,31	151,88	23,22	347,43	N.D.
	UPC	22	3,5	5,3	2,2	0,1	24,5	0 - 0,4		UPC	16	0,7	1,2	0,2	0,1	3,6	0 - 0,4
	uAlb (mg/dl)	18	181,94	224,17	65,67	0,34	655	0 - 3		uAlb (mg/dl)	14	35,51	106,09	1,4	0,1	397,7	0 - 3
UAC	18	1,249	1,587	0,717	0,001	6,149	0 - 0,024	UAC	13	0,281	0,718	0,01	0,002	2,498	0 - 0,024		

Tabella 30 Risultati di alcuni parametri selezionati dall'analisi urinaria all'ammissione e nelle nove categorie di follow up nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (USG: urine specific gravity; uPT: proteine totali urinarie; uCrea: creatinina urinaria; uAlb: albumina urinaria; UPC: urine protein to creatinine ratio; UAC: urine albumin to creatinine ratio; N.D.: non disponibile).

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento	Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento		
Giorno 0	Fibrinogeno (g/l)	48	4,53	1,71	4,25	0,57	8,98	1,45 - 3,85	Giorno 150	Fibrinogeno (g/l)	3	5,09	2,47	4,67	2,85	7,74	1,45 - 3,85
	D-Dimeri (µg/ml)	60	1,14	4,55	0,28	0,01	34,61	0 - 0,26		D-Dimeri (µg/ml)	6	1,72	3,34	0,40	0,04	8,51	0 - 0,26
	Antitrombina III (%)	60	91	22	91	45	148	105 - 166		Antitrombina III (%)	3	105	32	98	77	140	105 - 166
Giorno 30	Fibrinogeno (g/l)	17	5,17	1,92	5,16	1,85	7,98	1,45 - 3,85	Giorno 180	Fibrinogeno (g/l)	6	4,16	2,12	3,49	2,58	8,28	1,45 - 3,85
	D-Dimeri (µg/ml)	22	0,27	0,24	0,26	0,01	1,03	0 - 0,26		D-Dimeri (µg/ml)	7	1,08	2,43	0,06	0,03	6,58	0 - 0,26
	Antitrombina III (%)	19	96	20	98	59	134	105 - 166		Antitrombina III (%)	5	118	21	115	87	141	105 - 166
Giorno 60	Fibrinogeno (g/l)	3	3,63	2,28	4,51	1,05	5,34	1,45 - 3,85	Giorno 360	Fibrinogeno (g/l)	4	3,9	2,19	2,95	2,56	7,15	1,45 - 3,85
	D-Dimeri (µg/ml)	4	0,30	0,22	0,25	0,1	0,59	0 - 0,26		D-Dimeri (µg/ml)	7	1,15	1,85	0,36	0,03	5,14	0 - 0,26
	Antitrombina III (%)	3	101	25	87	85	130	105 - 166		Antitrombina III (%)	6	99	28	94	71	130	105 - 166
Giorno 90	Fibrinogeno (g/l)	2	5,35	1,77	5,35	4,09	6,6	1,45 - 3,85	Giorno 720	Fibrinogeno (g/l)	2	5,34	2,0365	5,34	3,9	6,78	1,45 - 3,85
	D-Dimeri (µg/ml)	7	0,24	0,15	0,28	0,06	0,43	0 - 0,26		D-Dimeri (µg/ml)	3	5,01	8,1148	0,38	0,27	14,38	0 - 0,26
	Antitrombina III (%)	6	120	28	130	74	144	105 - 166		Antitrombina III (%)	2	72,5	10,6066	72,5	65	80	105 - 166
Giorno 120	Fibrinogeno (g/l)	2	5,60	1,04	5,60	4,86	6,33	1,45 - 3,85									
	D-Dimeri (µg/ml)	3	0,49	0,26	0,53	0,21	0,72	0 - 0,26									
	Antitrombina III (%)	2	88	17	88	76	100	105 - 166									

Tabella 31 Risultati di alcuni parametri selezionati dal profilo coagulativo all'ammissione e nelle nove categorie di follow up nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (nel gruppo follow up giorno 540 non era disponibile nessun profilo coagulativo; N.D.: non disponibile).

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento	Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento		
Giorno 0	Proteine totali (g/dl)	93	8,38	2,12	7,90	4,74	15,70	5,60 - 7,90	Giorno 90	Proteine totali (g/dl)	9	7,92	1,18	8,02	6,14	9,50	5,60 - 7,90
	Albumina (g/dl)	93	1,94	1,05	1,89	0,16	4,05	2,80 - 3,70		Albumina (g/dl)	9	38,55	13,48	41,50	14,70	57,60	2,80 - 3,70
	Albumina (%)	93	25,81	15,98	23,60	1,50	56,20	N.D.		Albumina (%)	9	2,95	0,85	3,08	1,33	3,85	N.D.
	α-1 globuline (g/dl)	93	0,37	0,28	0,29	0,09	1,47	0,10 - 0,35		α-1 globuline (g/dl)	9	3,41	1,00	3,00	2,30	5,00	0,10 - 0,35
	α-1 globuline (%)	93	4,49	3,36	3,40	0,74	18,70	N.D.		α-1 globuline (%)	9	0,27	0,07	0,26	0,15	0,38	N.D.
	α-2 globuline (g/dl)	93	1,02	0,35	1,05	0,00	1,72	0,40 - 0,95		α-2 globuline (g/dl)	9	13,70	3,68	14,40	9,30	18,80	0,40 - 0,95
	α-2 globuline (%)	90	13,29	4,49	13,40	0,96	22,70	N.D.		α-2 globuline (%)	9	1,07	0,26	0,94	0,74	1,42	N.D.
	β-1 globuline (g/dl)	93	0,84	0,46	0,70	0,17	3,32	0,63 - 1,05		β-1 globuline (g/dl)	9	7,20	1,78	7,68	4,10	8,80	0,63 - 1,05
	β-1 globuline (%)	93	10,30	5,65	8,90	2,10	42,10	N.D.		β-1 globuline (%)	9	0,57	0,15	0,61	0,29	0,73	N.D.
	β-2 globuline (g/dl)	93	0,88	0,87	0,74	0,00	7,10	0,35 - 0,80		β-2 globuline (g/dl)	9	9,48	1,13	9,90	7,00	10,80	0,35 - 0,80
	β-2 globuline (%)	85	11,33	7,76	9,40	3,60	66,70	N.D.		β-2 globuline (%)	9	0,75	0,11	0,75	0,59	0,90	N.D.
	γ-globuline (g/dl)	93	3,23	2,62	2,70	0,00	10,77	0,42 - 0,78		γ-globuline (g/dl)	9	27,68	16,24	24,52	8,00	55,10	0,42 - 0,78
	γ-globuline (%)	90	35,98	21,13	32,10	4,60	77,60	N.D.		γ-globuline (%)	9	2,32	1,58	2,10	0,52	5,00	N.D.
	Giorno 30	Proteine totali (g/dl)	10	7,81	1,47	7,43	5,94	10,25		5,60 - 7,90	Giorno 120	Proteine totali (g/dl)	6	7,26	1,14	7,30	5,33
Albumina (g/dl)		10	31,43	11,70	33,90	7,20	43,70	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)	6		35,77	6,67	38,00	25,40	43,50	2,80 - 3,70
Albumina (%)		10	2,37	0,89	2,28	0,73	3,56	N.D.	Albumina (%)	6		2,55	0,39	2,64	2,08	3,05	N.D.
α-1 globuline (g/dl)		10	4,04	2,41	2,95	2,30	9,10	0,10 - 0,35	α-1 globuline (g/dl)	6		4,03	2,25	4,00	0,80	7,70	0,10 - 0,35
α-1 globuline (%)		10	0,31	0,16	0,25	0,14	0,64	N.D.	α-1 globuline (%)	6		0,30	0,18	0,32	0,06	0,58	N.D.
α-2 globuline (g/dl)		10	15,97	4,38	16,40	9,00	22,30	0,40 - 0,95	α-2 globuline (g/dl)	6		16,75	2,87	15,95	14,40	22,40	0,40 - 0,95
α-2 globuline (%)		10	1,21	0,26	1,16	0,76	1,66	N.D.	α-2 globuline (%)	6		1,19	0,07	1,21	1,07	1,26	N.D.
β-1 globuline (g/dl)		10	9,35	3,21	8,85	5,40	15,40	0,63 - 1,05	β-1 globuline (g/dl)	6		9,77	2,36	9,05	7,40	13,90	0,63 - 1,05
β-1 globuline (%)		10	0,71	0,19	0,69	0,50	1,10	N.D.	β-1 globuline (%)	6		0,70	0,13	0,70	0,51	0,90	N.D.
β-2 globuline (g/dl)		10	10,63	5,21	9,50	5,80	23,70	0,35 - 0,80	β-2 globuline (g/dl)	6		11,75	3,38	12,30	7,80	15,50	0,35 - 0,80
β-2 globuline (%)		10	0,85	0,48	0,68	0,42	1,90	N.D.	β-2 globuline (%)	6		0,87	0,32	0,95	0,44	1,27	N.D.
γ-globuline (g/dl)		10	28,58	14,98	26,55	9,80	61,50	0,42 - 0,78	γ-globuline (g/dl)	6		21,93	9,09	22,35	12,10	32,40	0,42 - 0,78
γ-globuline (%)		10	2,37	1,73	1,80	0,78	6,23	N.D.	γ-globuline (%)	6		1,65	0,84	1,63	0,69	2,76	N.D.
Giorno 60		Proteine totali (g/dl)	4	8,06	1,93	7,23	6,84	10,93	5,60 - 7,90	Giorno 150		Proteine totali (g/dl)	6	7,67	1,50	7,04	6,51
	Albumina (g/dl)	4	31,25	17,33	35,20	6,90	47,70	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)		6	33,31	15,24	37,15	15,00	50,10	2,80 - 3,70
	Albumina (%)	4	2,28	1,09	2,51	0,75	3,35	N.D.	Albumina (%)		6	2,47	1,12	2,44	1,13	4,26	N.D.
	α-1 globuline (g/dl)	4	5,03	2,81	5,15	1,60	8,20	0,10 - 0,35	α-1 globuline (g/dl)		6	4,50	3,33	3,39	1,10	9,80	0,10 - 0,35
	α-1 globuline (%)	4	0,38	0,19	0,36	0,17	0,61	N.D.	α-1 globuline (%)		6	0,32	0,20	0,26	0,08	0,64	N.D.
	α-2 globuline (g/dl)	4	16,00	5,92	14,55	11,10	23,80	0,40 - 0,95	α-2 globuline (g/dl)		6	13,33	3,17	12,62	10,00	18,30	0,40 - 0,95
	α-2 globuline (%)	4	1,25	0,39	1,20	0,82	1,77	N.D.	α-2 globuline (%)		6	1,00	0,18	1,04	0,70	1,21	N.D.
	β-1 globuline (g/dl)	4	7,70	1,95	7,55	5,50	10,20	0,63 - 1,05	β-1 globuline (g/dl)		6	9,77	4,59	7,40	6,20	15,80	0,63 - 1,05
	β-1 globuline (%)	4	0,60	0,08	0,60	0,51	0,70	N.D.	β-1 globuline (%)		6	0,72	0,26	0,66	0,41	1,04	N.D.
	β-2 globuline (g/dl)	4	10,23	3,08	10,55	6,90	12,90	0,35 - 0,80	β-2 globuline (g/dl)		6	11,39	6,34	9,86	5,70	23,70	0,35 - 0,80
	β-2 globuline (%)	4	0,80	0,20	0,90	0,51	0,91	N.D.	β-2 globuline (%)		6	0,85	0,46	0,71	0,53	1,76	N.D.
	γ-globuline (g/dl)	4	29,80	24,59	18,15	16,30	66,60	0,42 - 0,78	γ-globuline (g/dl)		6	27,73	18,76	19,50	10,80	59,90	0,42 - 0,78
	γ-globuline (%)	4	2,76	3,02	1,31	1,13	7,28	N.D.	γ-globuline (%)		6	2,31	2,05	1,46	0,70	6,18	N.D.

Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento	Parametro	Numero casi	Media	Deviazione standard	Mediana	Valore minimo	Valore massimo	Intervallo di riferimento	
Giorno 180	Proteine totali (g/dl)	12	7,01	1,79	6,88	4,51	11,42	5,60 - 7,90	Proteine totali (g/dl)	5	6,94	1,38	6,79	5,55	9,18	5,60 - 7,90
	Albumina (g/dl)	12	45,03	15,84	51,05	1,20	57,20	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)	5	36,92	11,67	36,00	26,10	54,90	2,80 - 3,70
	Albumina (%)	12	2,94	1,02	3,18	0,14	3,87	N.D.	Albumina (%)	5	2,52	0,70	2,52	1,45	3,38	N.D.
	α-1 globuline (g/dl)	12	3,07	0,98	3,21	0,80	4,10	0,10 - 0,35	α-1 globuline (g/dl)	5	3,94	2,06	3,70	1,90	7,00	0,10 - 0,35
	α-1 globuline (%)	12	0,20	0,05	0,20	0,09	0,29	N.D.	α-1 globuline (%)	5	0,26	0,11	0,25	0,14	0,39	N.D.
	α-2 globuline (g/dl)	12	14,97	5,73	14,40	1,60	23,20	0,40 - 0,95	α-2 globuline (g/dl)	5	16,74	4,14	18,00	9,80	20,50	0,40 - 0,95
	α-2 globuline (%)	12	1,00	0,46	0,96	0,18	2,16	N.D.	α-2 globuline (%)	5	1,12	0,16	1,14	0,90	1,32	N.D.
	β-1 globuline (g/dl)	12	8,26	3,86	7,20	3,80	18,30	0,63 - 1,05	β-1 globuline (g/dl)	5	10,16	4,72	11,90	4,20	15,40	0,63 - 1,05
	β-1 globuline (%)	12	0,55	0,23	0,43	0,37	1,09	N.D.	β-1 globuline (%)	5	0,68	0,29	0,72	0,39	1,05	N.D.
	β-2 globuline (g/dl)	11	8,18	2,22	8,10	5,00	12,50	0,35 - 0,80	β-2 globuline (g/dl)	5	9,94	2,43	9,90	6,60	12,90	0,35 - 0,80
	β-2 globuline (%)	12	0,53	0,22	0,54	0,00	0,87	N.D.	β-2 globuline (%)	5	0,71	0,30	0,55	0,45	1,18	N.D.
	γ-globuline (g/dl)	12	21,10	21,06	15,40	9,10	86,10	0,42 - 0,78	γ-globuline (g/dl)	5	22,30	12,85	16,90	11,20	43,90	0,42 - 0,78
γ-globuline (%)	12	1,77	2,59	0,94	0,53	9,83	N.D.	γ-globuline (%)	5	1,66	1,35	1,18	0,69	4,03	N.D.	
Giorno 360	Proteine totali (g/dl)	10	8,01	2,00	7,39	6,08	11,89	5,60 - 7,90	Proteine totali (g/dl)	5	6,52	0,98	6,27	5,20	7,80	5,60 - 7,90
	Albumina (g/dl)	10	39,83	20,38	51,55	3,10	57,90	2,80 - 3,70	Albumina (g/dl)	5	48,03	4,77	48,43	43,10	53,90	2,80 - 3,70
	Albumina (%)	10	2,87	1,27	3,33	0,35	4,45	N.D.	Albumina (%)	5	3,13	0,57	3,22	2,24	3,78	N.D.
	α-1 globuline (g/dl)	10	2,74	0,90	2,98	1,20	3,80	0,10 - 0,35	α-1 globuline (g/dl)	5	4,79	2,49	4,10	2,30	8,64	0,10 - 0,35
	α-1 globuline (%)	10	0,21	0,06	0,22	0,12	0,31	N.D.	α-1 globuline (%)	5	0,32	0,20	0,26	0,16	0,67	N.D.
	α-2 globuline (g/dl)	10	12,73	2,99	13,15	7,10	15,50	0,40 - 0,95	α-2 globuline (g/dl)	5	15,20	3,70	16,80	8,72	17,70	0,40 - 0,95
	α-2 globuline (%)	10	0,98	0,21	0,96	0,66	1,40	N.D.	α-2 globuline (%)	5	0,97	0,19	0,98	0,68	1,21	N.D.
	β-1 globuline (g/dl)	10	9,80	6,17	7,90	4,50	25,10	0,63 - 1,05	β-1 globuline (g/dl)	5	12,38	3,80	11,50	9,00	18,88	0,63 - 1,05
	β-1 globuline (%)	10	0,84	0,79	0,56	0,37	2,98	N.D.	β-1 globuline (%)	5	0,82	0,37	0,66	0,56	1,47	N.D.
	β-2 globuline (g/dl)	9	9,66	1,96	9,60	6,60	12,40	0,35 - 0,80	β-2 globuline (g/dl)	4	11,13	2,80	11,05	8,20	14,20	0,35 - 0,80
	β-2 globuline (%)	10	0,67	0,36	0,70	0,00	1,39	N.D.	β-2 globuline (%)	5	0,55	0,36	0,59	0,00	1,00	N.D.
	γ-globuline (g/dl)	10	26,21	20,46	18,03	8,70	65,70	0,42 - 0,78	γ-globuline (g/dl)	5	10,71	2,99	10,30	7,50	15,33	0,42 - 0,78
γ-globuline (%)	10	2,43	2,48	1,38	0,58	7,38	N.D.	γ-globuline (%)	5	0,72	0,31	0,65	0,46	1,20	N.D.	

Tabella 32 Risultati dei parametri dell'elettroforesi sierica all'ammissione e nelle nove categorie di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (N.D.: non disponibile).

Di seguito vengono rappresentati, in grafici *box-and-whiskers*, il confronto della distribuzione dei parametri clinico-patologici all'ammissione e nelle nove categorie di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi.

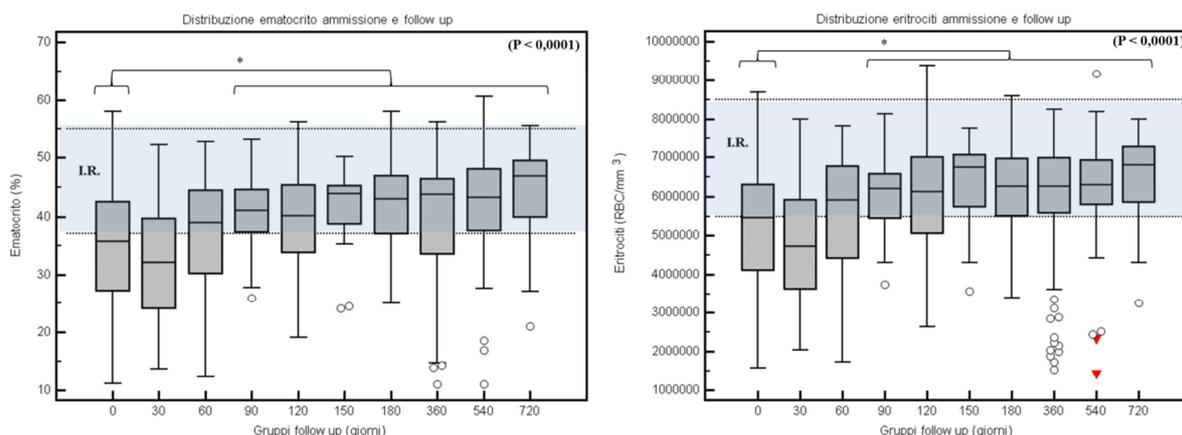


Figura 44 Confronto della distribuzione dei valori di ematocrito (555 valori totali) ed eritrociti (556 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

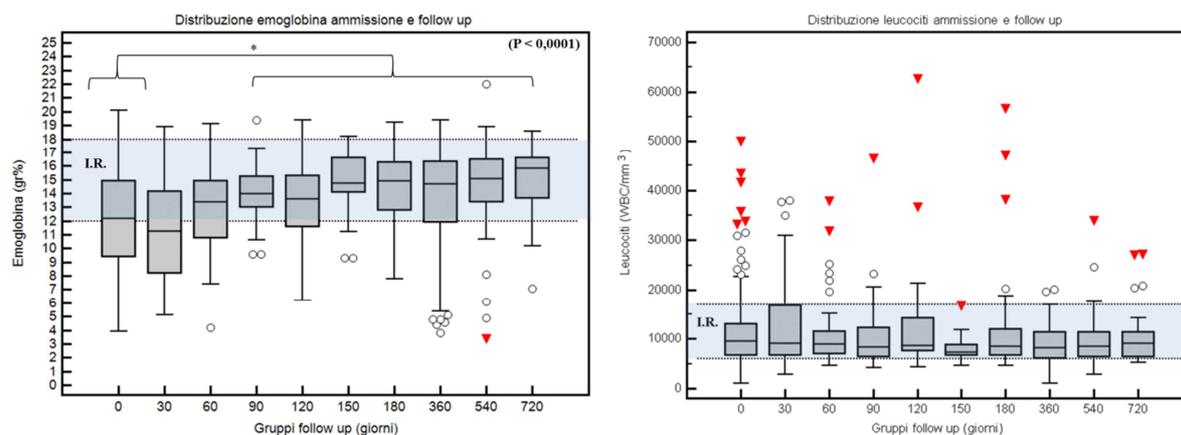


Figura 45 Confronto della distribuzione dei valori di emoglobina (556 valori totali) e leucociti (555 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

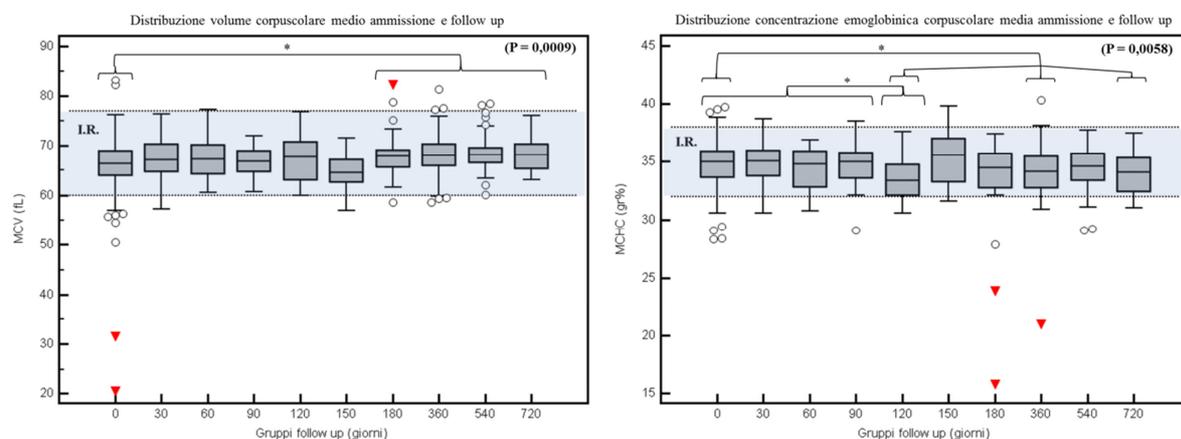


Figura 46 Confronto della distribuzione dei valori di MCV (volume corpuscolare medio, 556 valori totali) e MCHC (concentrazione emoglobinica corpuscolare media, 556 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

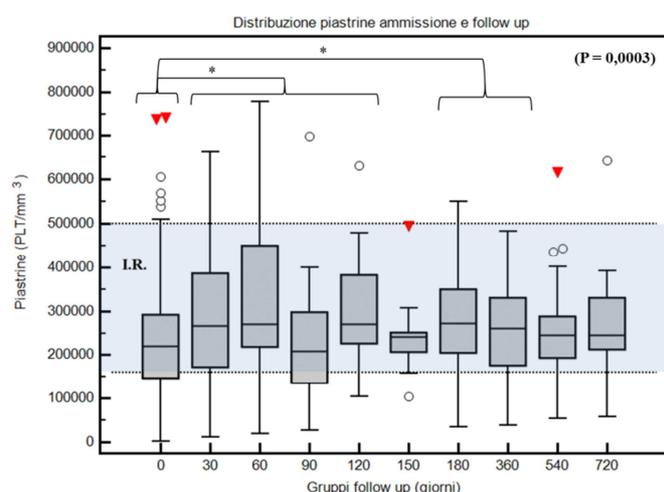


Figura 47 Confronto della distribuzione dei valori di piastrine (557 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up nella popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

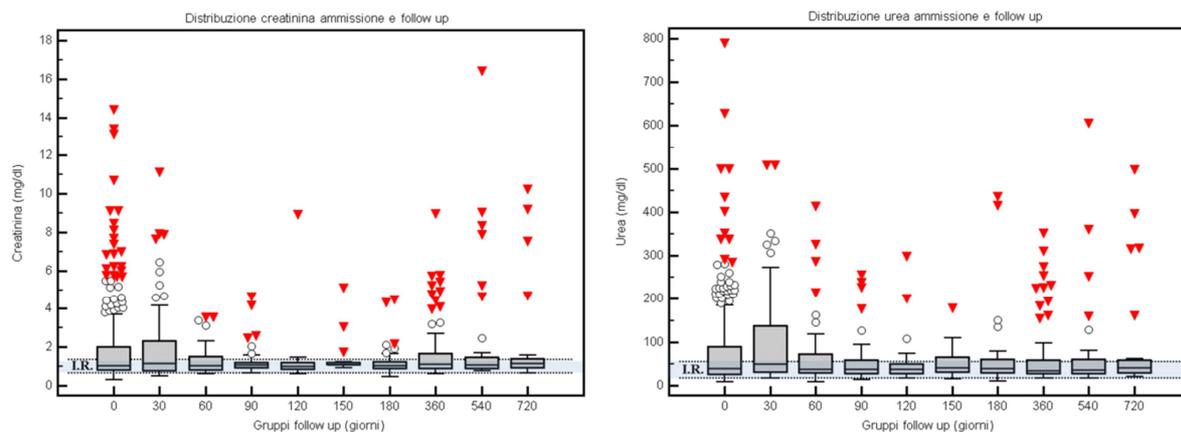


Figura 48 Confronto della distribuzione dei valori di creatinina (586 valori totali) ed urea (555 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

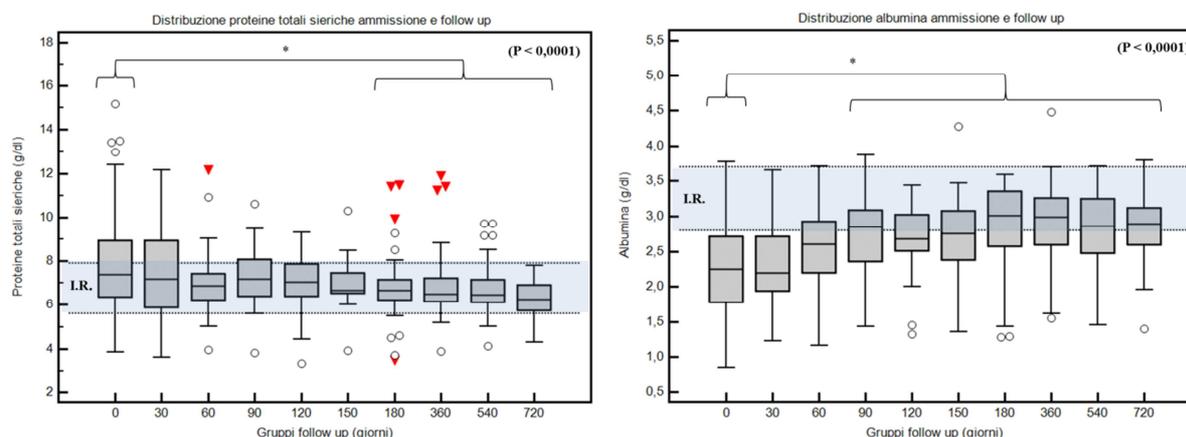


Figura 49 Confronto della distribuzione dei valori di proteine totali (568 valori totali) ed albumina (570 valori totali) sieriche all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

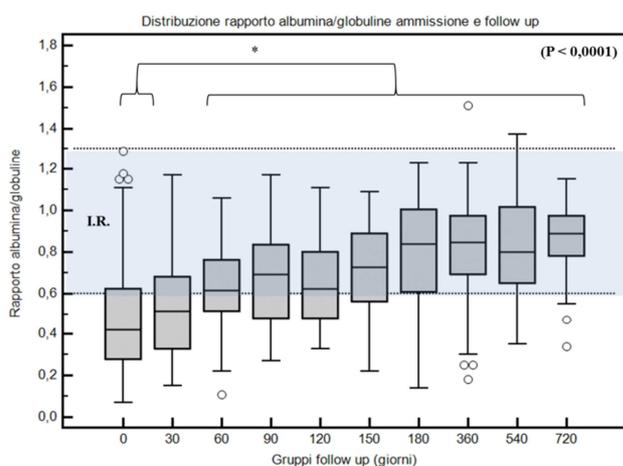


Figura 50 Confronto della distribuzione dei valori del rapporto albumina/globuline (559 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

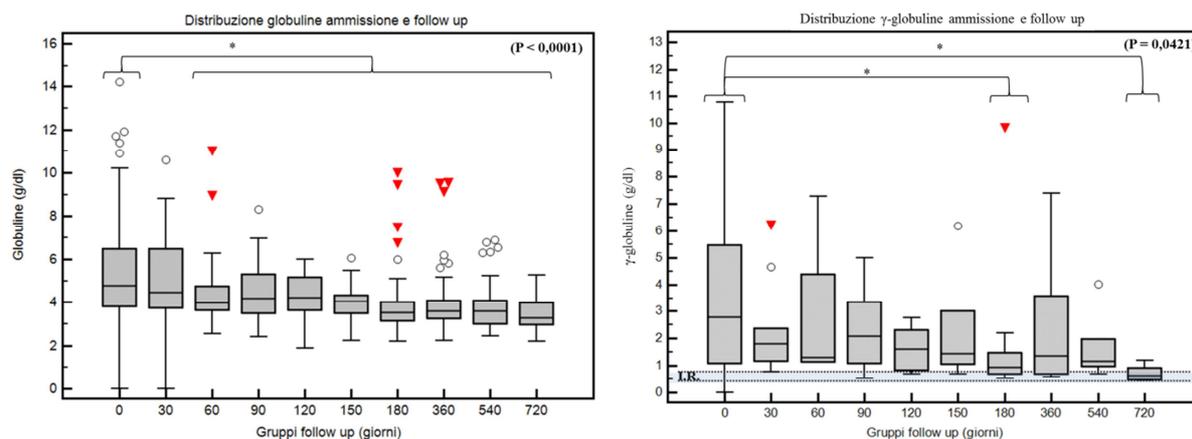


Figura 51 Confronto della distribuzione dei valori di globuline totali (560 valori totali) e γ -globuline (157 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

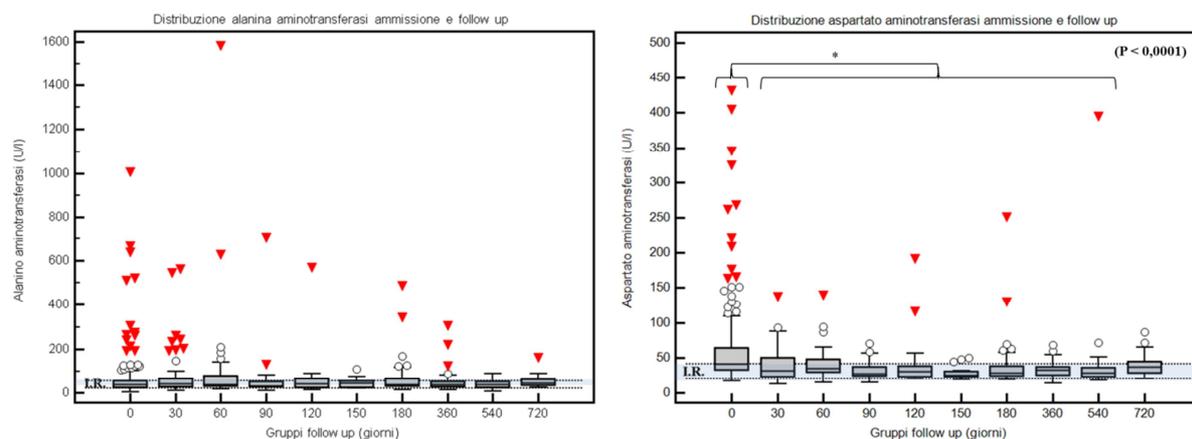


Figura 52 Confronto della distribuzione dei valori di alanina aminotransferasi (553 valori totali) e aspartato aminotransferasi (551 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

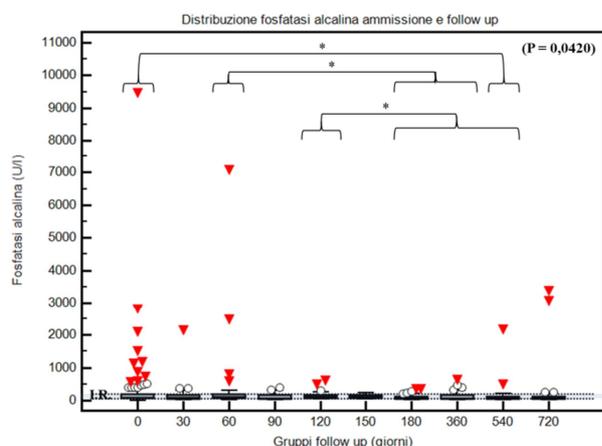


Figura 53 Confronto della distribuzione dei valori di fosfatasi alcalina (533 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

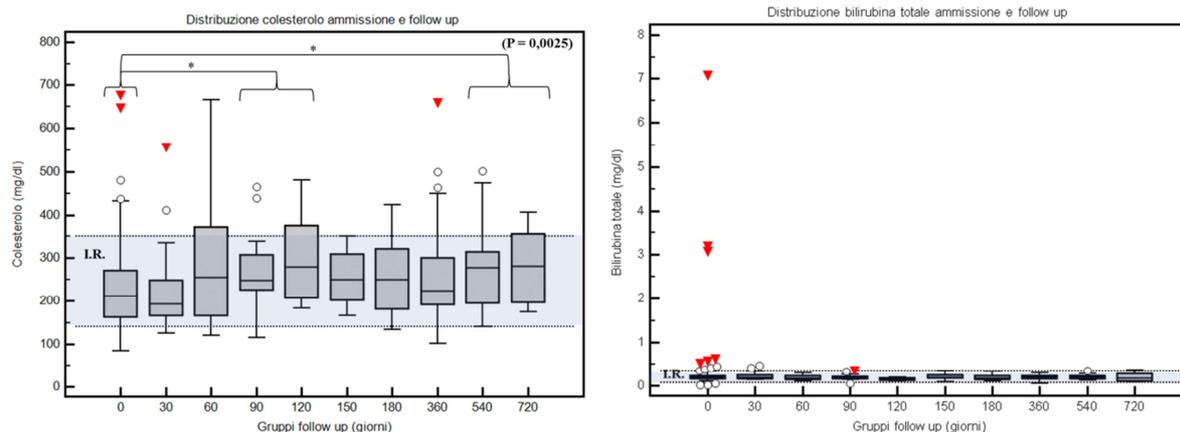


Figura 54 Confronto della distribuzione dei valori di colesterolo (337 valori totali) e bilirubina totale (332 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

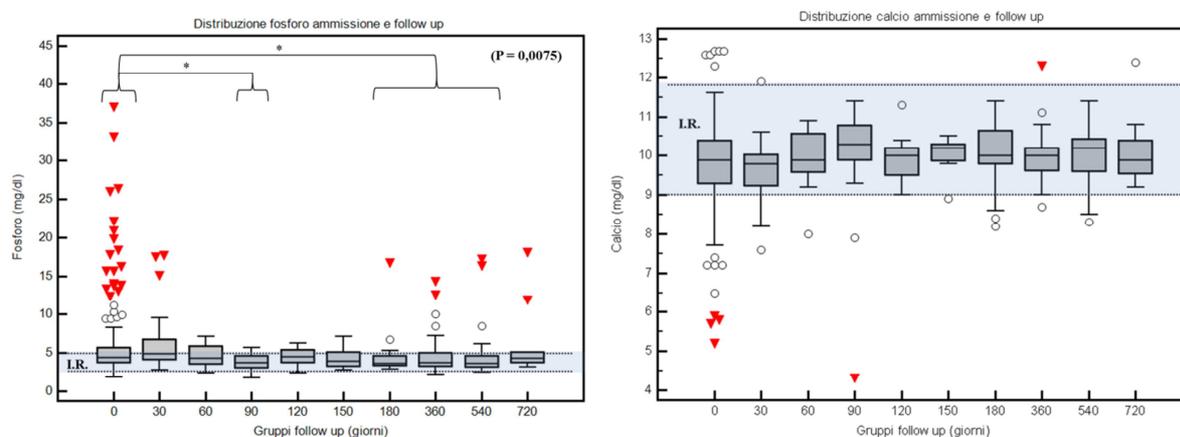


Figura 55 Confronto della distribuzione dei valori di fosforo (353 valori totali) e calcio (331 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

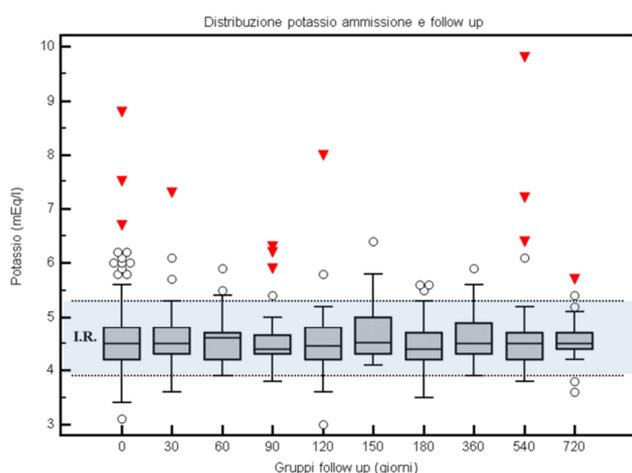


Figura 56 Confronto della distribuzione dei valori di potassio (505 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

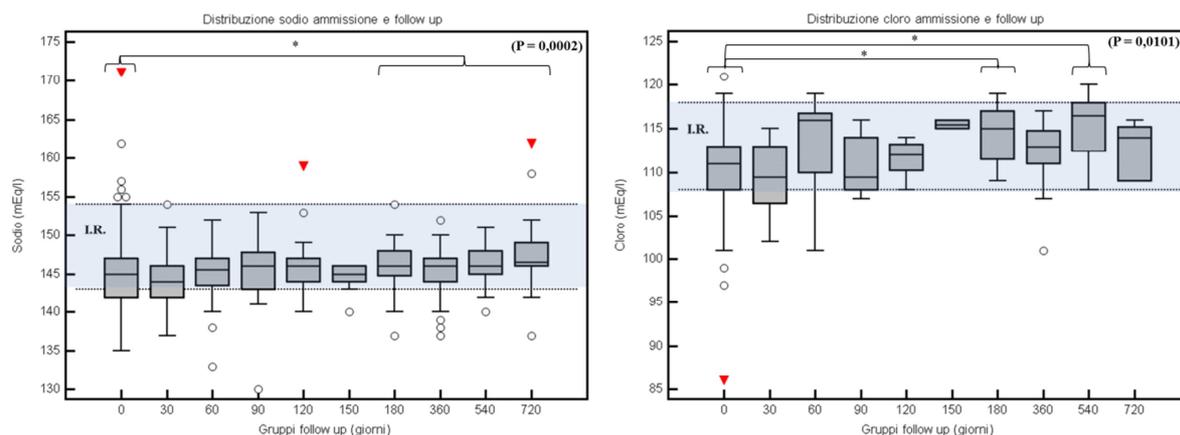


Figura 57 Confronto della distribuzione dei valori di sodio (544 valori totali) e cloro (174 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

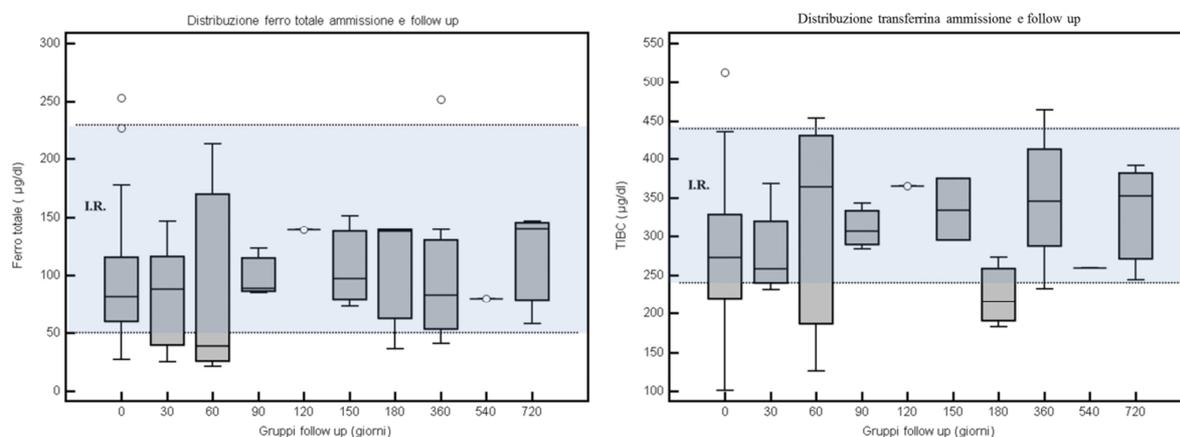


Figura 58 Confronto della distribuzione dei valori di ferro totale (122 valori totali) e di transferrina (119 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

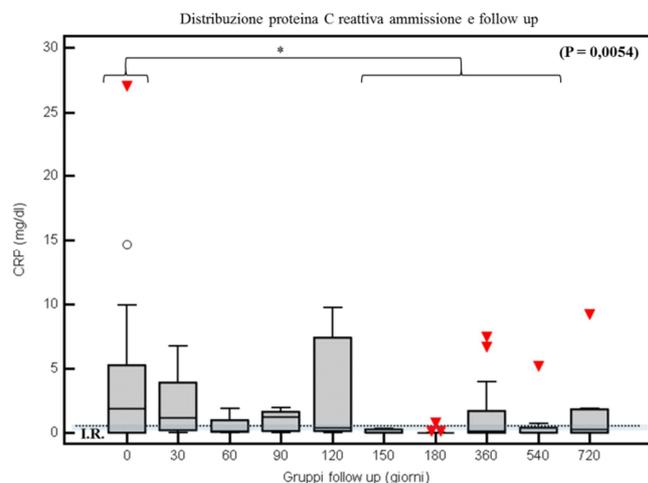


Figura 59 Confronto della distribuzione dei valori di proteina C reattiva (108 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: $P < 0,05$).

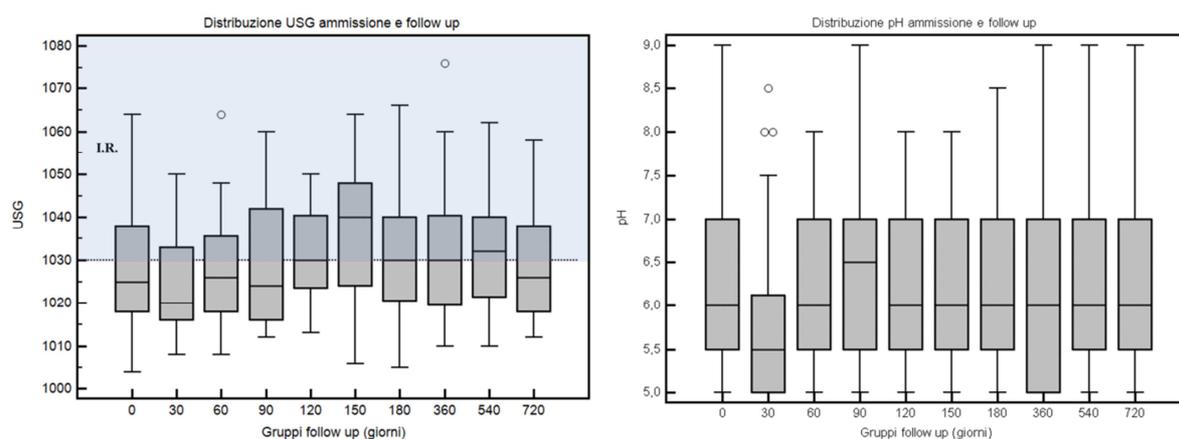


Figura 60 Confronto della distribuzione dei valori di peso specifico (437 valori totali) e pH (437 valori totali) urinari all’ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

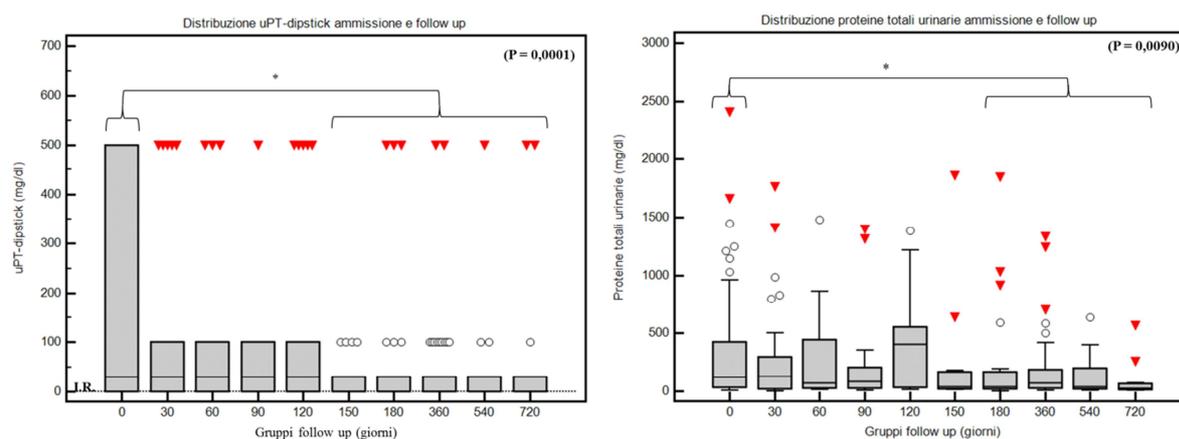


Figura 61 Confronto della distribuzione dei valori di proteine totali urinarie al dipstick (440 valori totali) e proteine totali urinarie (324 valori totali) all’ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

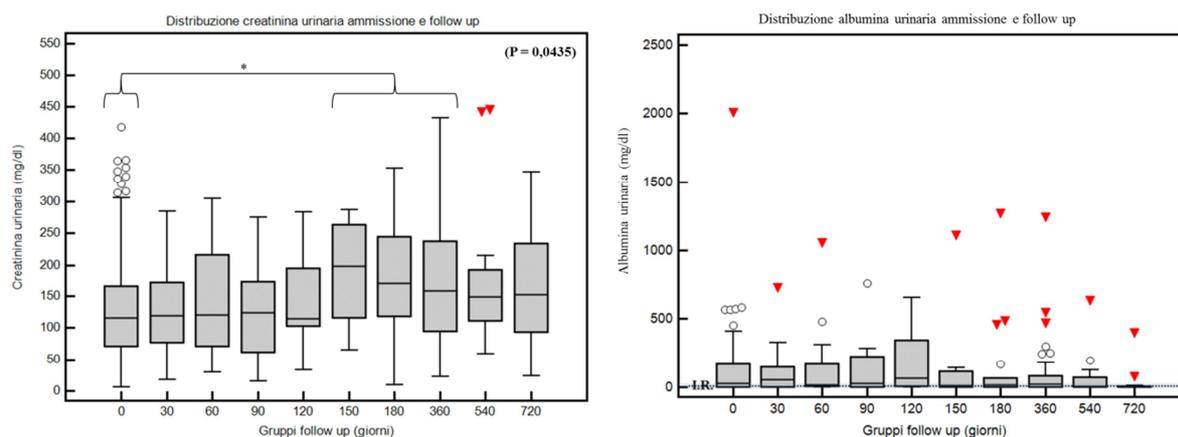


Figura 62 Confronto della distribuzione dei valori di creatinina urinaria (324 valori totali) e albumina urinaria (262 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

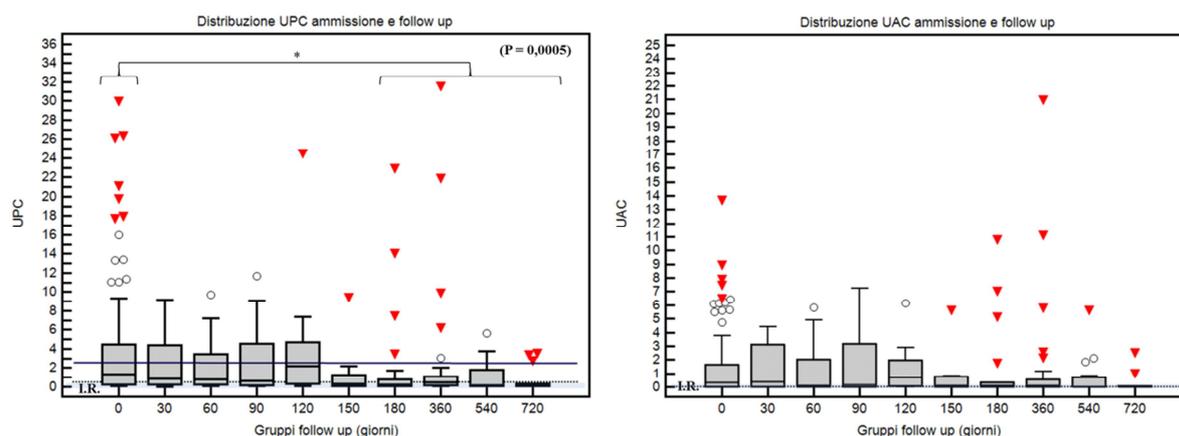


Figura 63 Confronto della distribuzione dei valori di UPC (323 valori totali) e UAC (260 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; la linea blu indica il valore cut off di UPC per definire una proteinuria nel range nefrosico; *: P < 0,05).

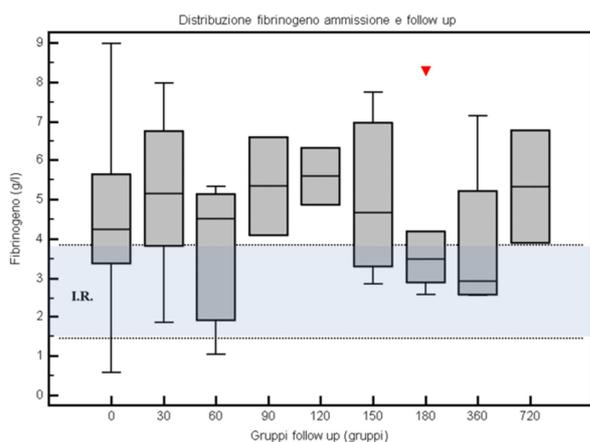


Figura 64 Confronto della distribuzione dei valori di fibrinogeno (87 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; valori non disponibili per il gruppo 540).

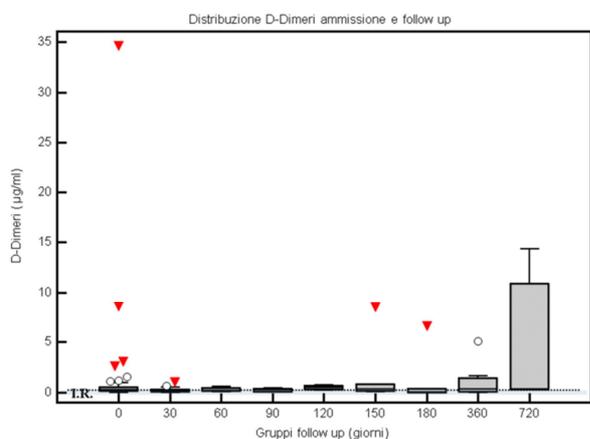


Figura 65 Confronto della distribuzione dei valori dei D-dimeri (119 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; valori non disponibili per il gruppo 540).

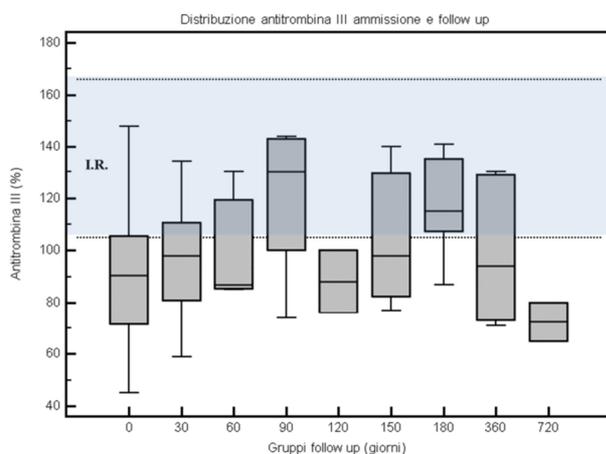


Figura 66 Confronto della distribuzione dei valori di antitrombina III (106 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; valori non disponibili per il gruppo 540).

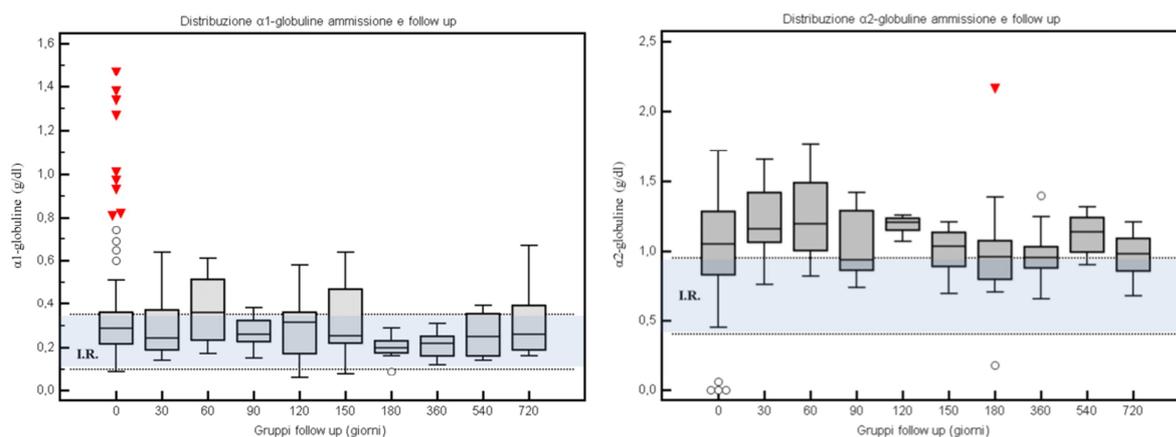


Figura 67 Confronto della distribuzione dei valori di α 1-globuline (160 valori totali) e α 2-globuline (160 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

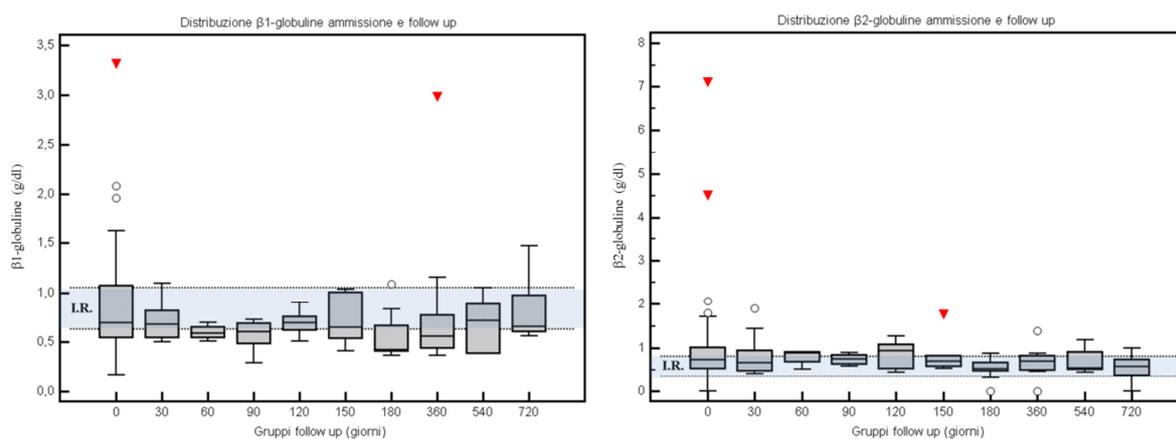


Figura 68 Confronto della distribuzione dei valori di β 1-globuline (160 valori totali) e β 2-globuline (160 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up della popolazione di studio in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

12.6 Risultati dell'analisi statistica univariata della sopravvivenza

Per analizzare statisticamente l'effetto di ciascun parametro sulla base del rapporto di rischio (*hazard ratio*), è stata eseguita una regressione univariata (*Cox proportional hazards regression*) utilizzando come endpoint 360 e 720 giorni dall'ammissione. I valori di tale

analisi che sono risultati statisticamente significativi ($P < 0,05$), sono riportati in **Tabella 28** e di seguito rappresentati graficamente.

Endpoint 360					Endpoint 720				
Parametro	Numero campioni	H.R.	Intervallo di confidenza (95%)	P	Parametro	Numero campioni	H.R.	Intervallo di confidenza (95%)	P
Creatinina	72	1,4072	1,2482 - 1,5865	< 0,0001	Creatinina	51	1,6042	1,2960 - 1,9856	< 0,0001
Urea	68	1,0081	1,0050 - 1,0111	< 0,0001	Fosforo	45	1,2757	1,1489 - 1,4164	< 0,0001
Fosforo	61	1,2800	1,1560 - 1,4174	< 0,0001	Potassio	49	4,0597	1,9419 - 8,4873	< 0,0001
Potassio	68	3,4786	1,9474 - 6,2139	0,0001	Urea	50	1,0130	1,0073 - 1,0187	< 0,0001
uPT dipstick	59	1,0042	1,0022 - 1,0062	0,0002	Calcio	44	0,3751	0,2214 - 0,6357	0,0001
Albumina	67	0,2948	0,1479 - 0,5879	0,0004	Albumina	49	0,2507	0,1163 - 0,5404	0,0002
USG	59	0,9432	0,9050 - 0,9830	0,0025	uPT dipstick	42	1,0036	1,0016 - 1,0056	0,0008
TIBC	34	0,9872	0,9783 - 0,9961	0,0031	WBC	50	1,0001	1,0000 - 1,0002	0,0016
A/G	66	0,0496	0,0044 - 0,5614	0,0050	TIBC	28	0,9875	0,9789 - 0,9962	0,0027
Calcio	60	0,6281	0,4685 - 0,8421	0,0066	USG	42	0,9523	0,9165 - 0,9894	0,0066
AST	70	1,0116	1,0046 - 1,0186	0,0068	AG	48	0,0508	0,0038 - 0,6717	0,0080
uCrea	49	0,9910	0,9833 - 0,9988	0,0135	uCrea	36	0,9901	0,9822 - 0,9980	0,0099
WBC	71	1,0001	1,0000 - 1,0001	0,0200	Hct	50	0,9456	0,9029 - 0,9903	0,0182
UAC	42	1,2343	1,0678 - 1,4268	0,0217	UPC	36	1,0865	1,0265 - 1,1499	0,0182
Colesterolo	62	1,0041	1,0011 - 1,0070	0,0234	AST	49	1,0100	1,0030 - 1,0170	0,0185
uALB	42	1,0031	1,0006 - 1,0057	0,0289	Hb	49	0,8557	0,7462 - 0,9812	0,0244
uPT	49	1,0012	1,0002 - 1,0023	0,0340	UAC	29	1,2060	1,0462 - 1,3901	0,0323
Hct	71	0,9540	0,9140 - 0,9958	0,0354	MCV	50	0,8978	0,8123 - 0,9922	0,0337
UPC	49	1,0734	1,0138 - 1,1365	0,0401					
MCV	71	0,8981	0,8108 - 0,9949	0,0406					
Hb	70	0,8711	0,7711 - 0,9977	0,0495					

Tabella 33 Regressione univariata (*cox proportional hazards regression*) con endpoint 360 giorni e 720 giorni (H.R.: hazard ratio; Hct: ematocrito; Hb: emoglobina; MCV: volume corpuscolare medio; WBC: leucociti; AST: aspartato aminotransferasi; A/G: rapporto albumina/globuline; TIBC: transferrina; USG: *urine specific gravity*; uPT: proteine totali urinarie; uCrea: creatinina urinaria; uAlb: albumina urinaria; UPC: *urine protein to creatinine ratio*; UAC: *urine albumin to creatinine ratio*).

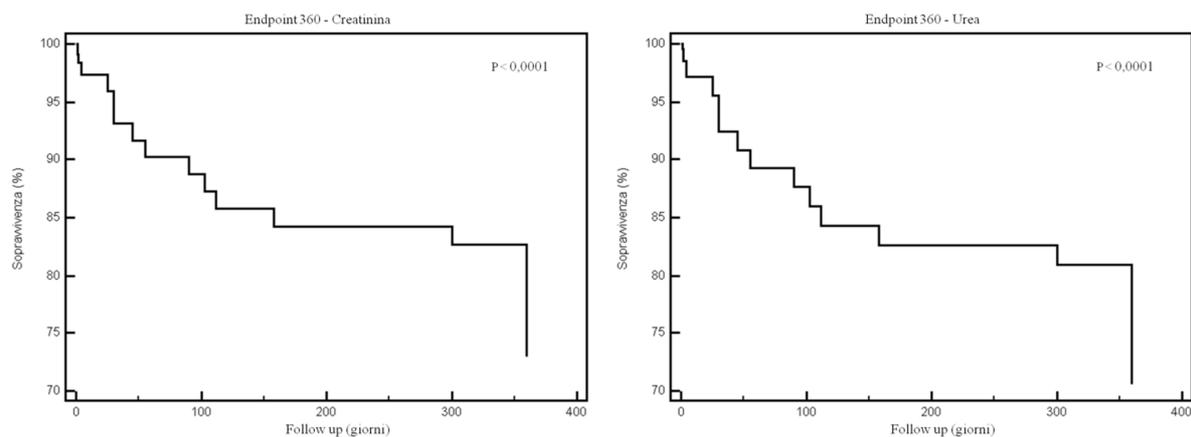


Figura 69 Rappresentazione della regressione univariata della creatinina sierica (72 campioni) e dell'urea (68 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

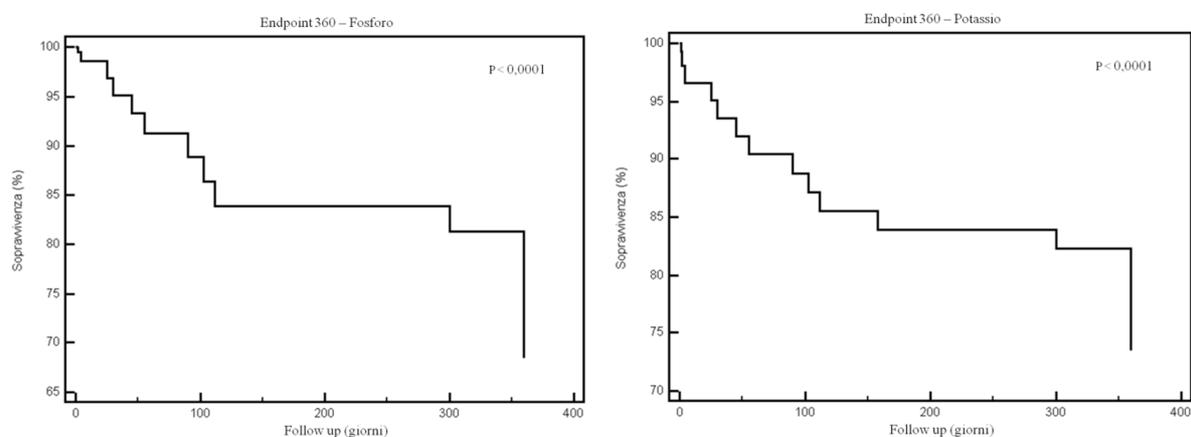


Figura 70 Rappresentazione della regressione univariata del fosforo (61 campioni) e del potassio (68 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

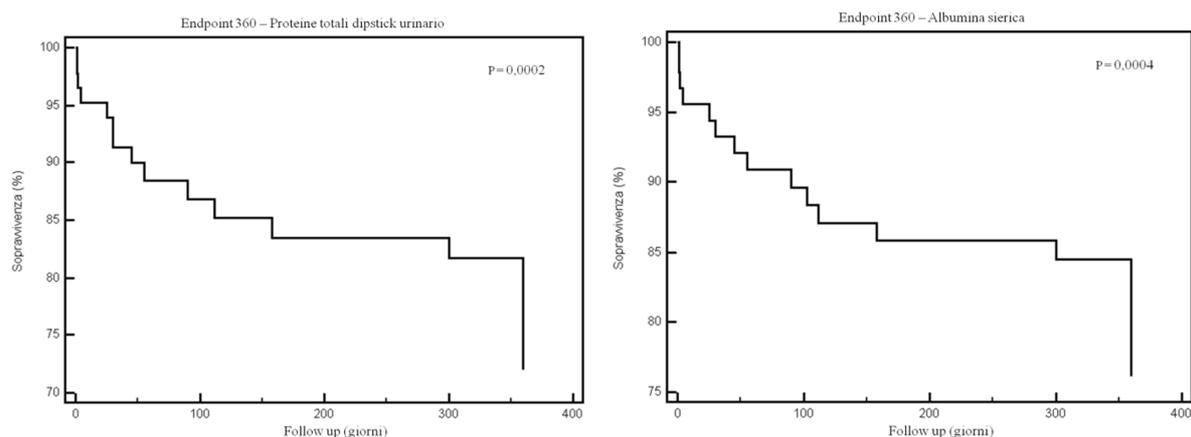


Figura 71 Rappresentazione della regressione univariata delle proteine totali al dipstick urinario (59 campioni) e dell'albumina sierica (67 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

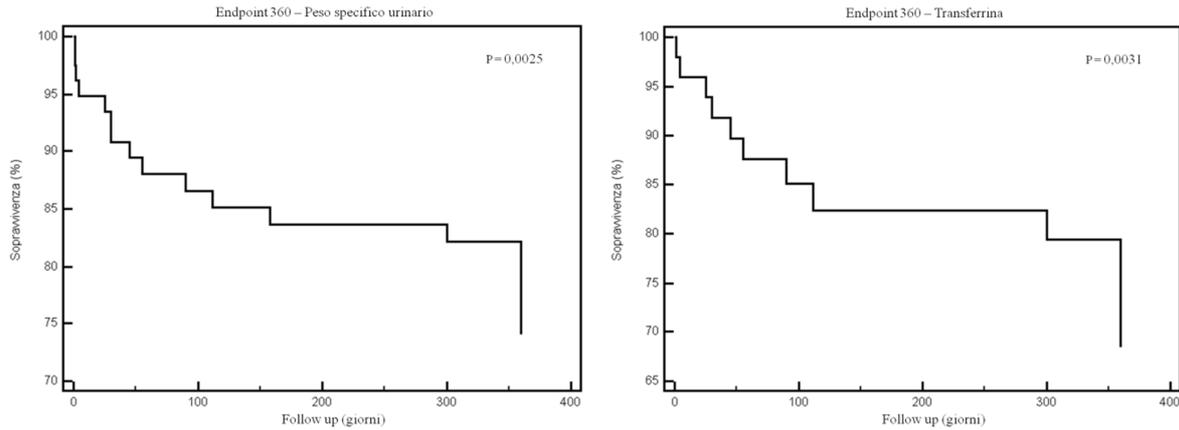


Figura 72 Rappresentazione della regressione univariata del peso specifico urinario (59 campioni) e della transferrina (34 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

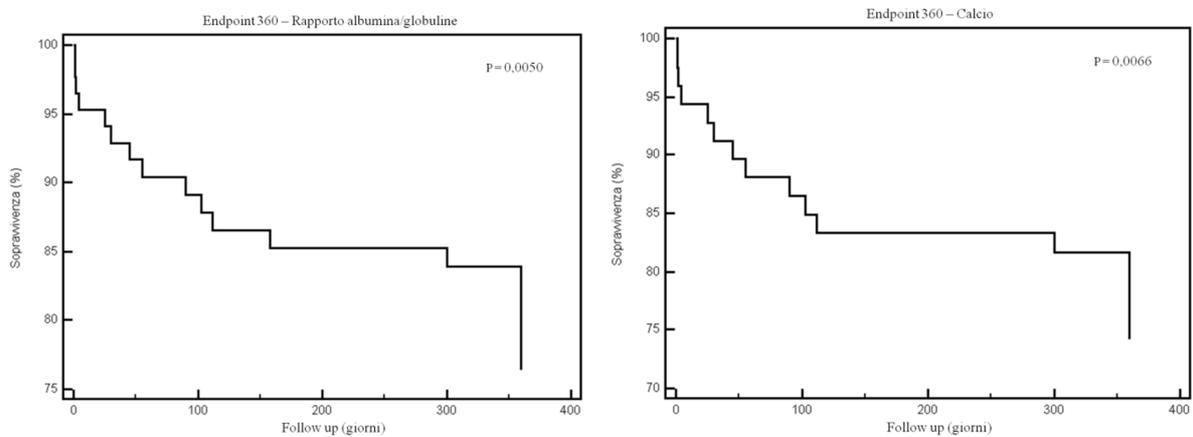


Figura 73 Rappresentazione della regressione univariata del rapporto albumina/globuline (66 campioni) e del calcio (60 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

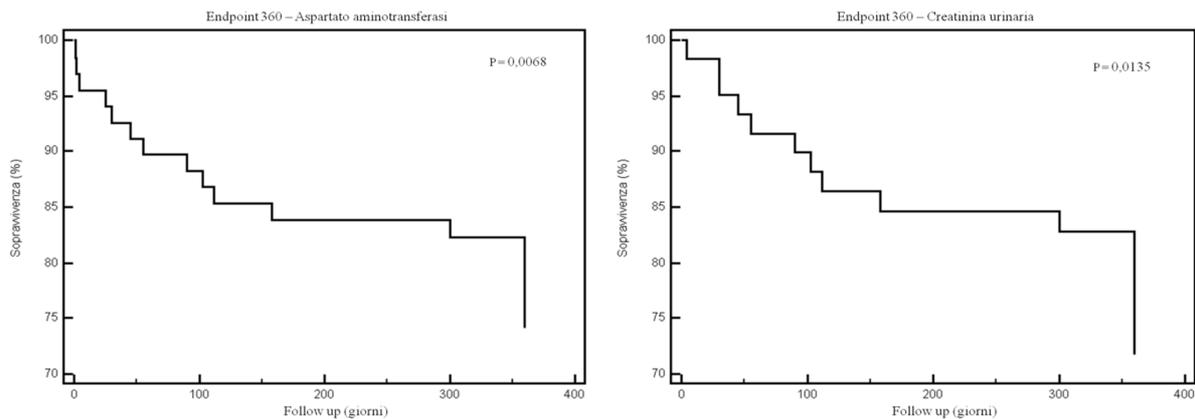


Figura 74 Rappresentazione della regressione univariata dell'aspartato aminotransferasi (70 campioni) e della creatinina urinaria (49 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

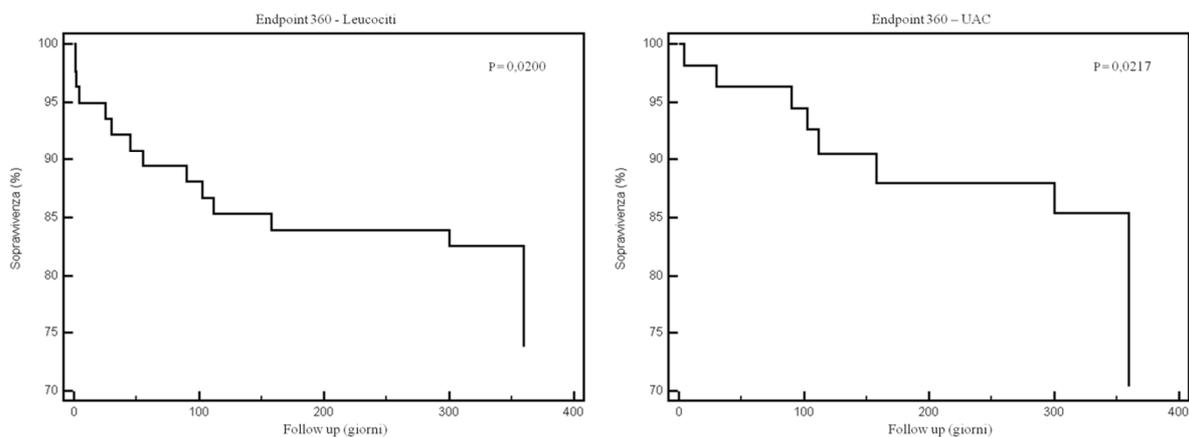


Figura 75 Rappresentazione della regressione univariata dei leucociti (71 campioni) e dell'UAC (42 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

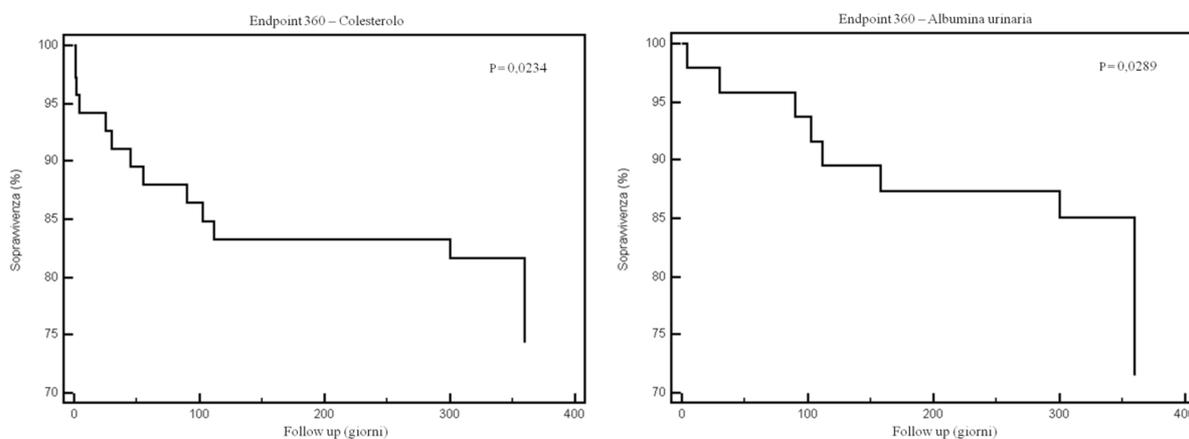


Figura 76 Rappresentazione della regressione univariata del colesterolo (62 campioni) e dell'albumina urinaria (42 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

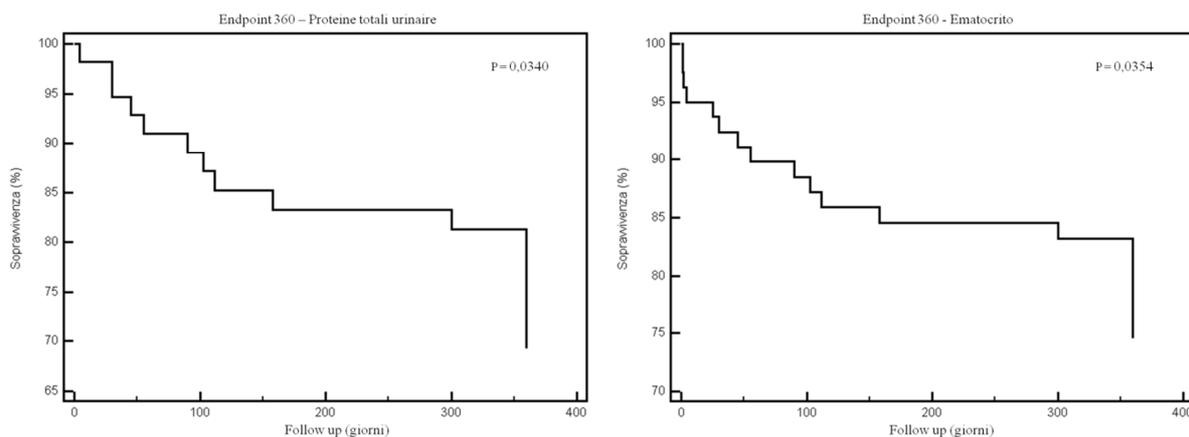


Figura 77 Rappresentazione della regressione univariata della proteine totali urinarie (49 campioni) e dell'ematocrito (71 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360.

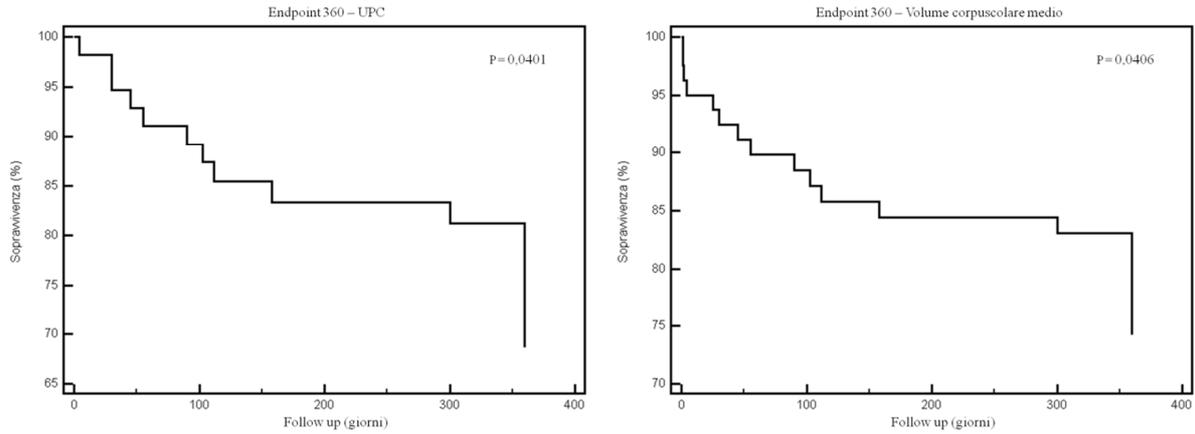


Figura 78 Rappresentazione della regressione univariata dell'UPC (49 campioni) e del volume corpuscolare medio (71 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

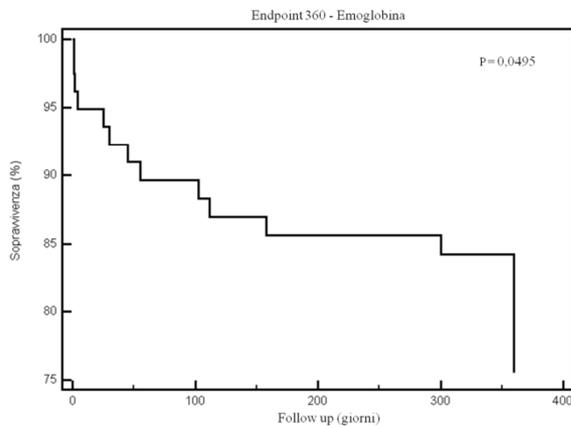


Figura 79 Rappresentazione della regressione univariata dell'emoglobina (70 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 360 giorni.

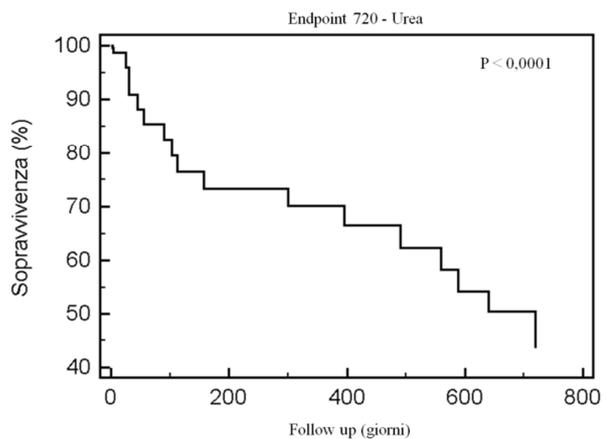
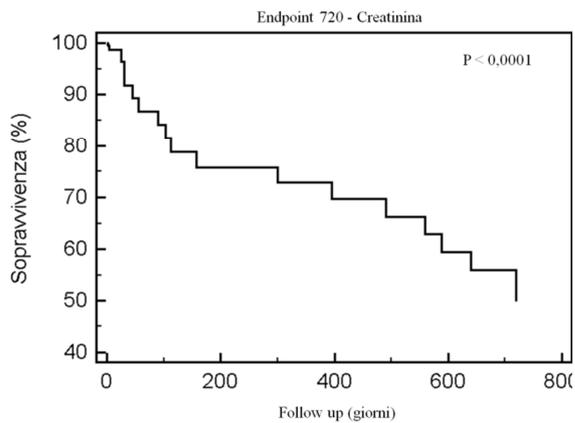


Figura 80 Rappresentazione della regressione univariata della creatinina sierica (51 campioni) e dell'urea (50 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni

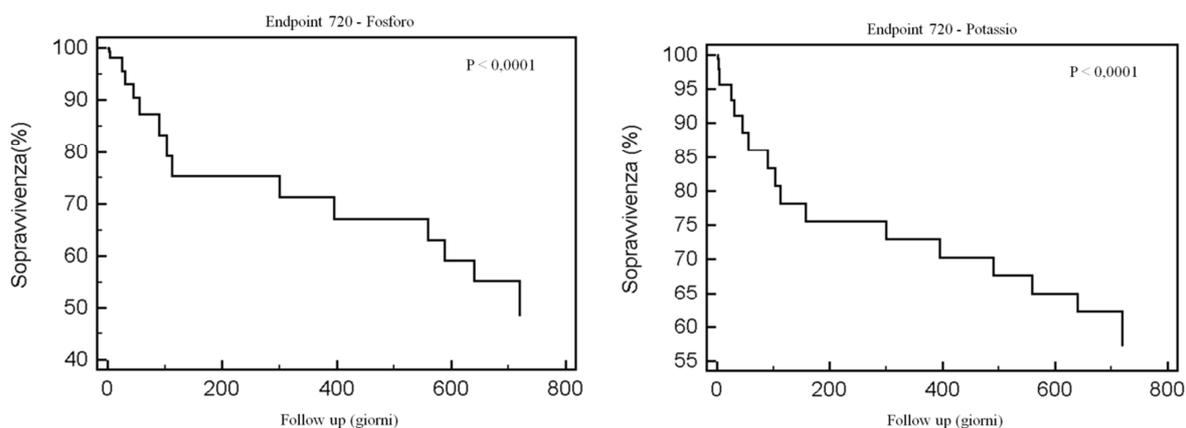


Figura 81 Rappresentazione della regressione univariata del fosforo (45 campioni) e del potassio (49 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

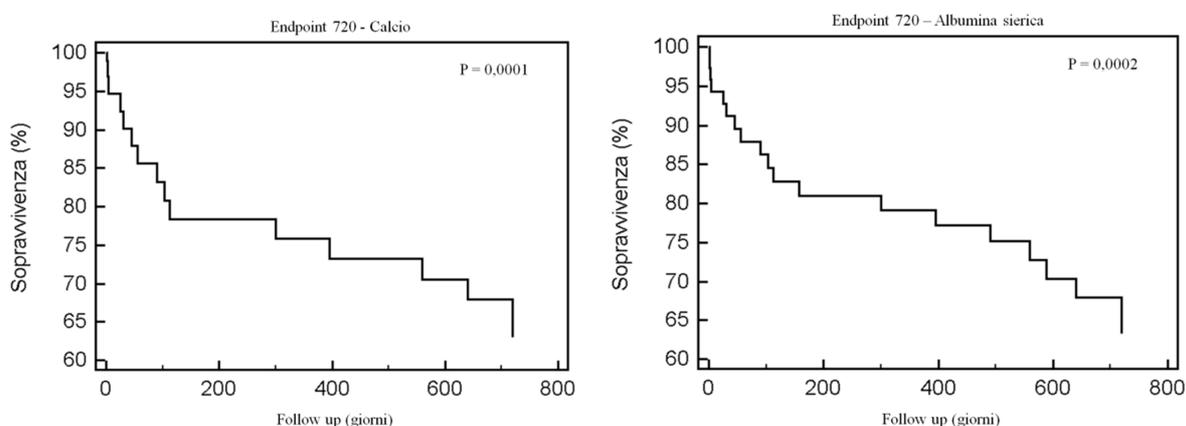


Figura 82 Rappresentazione della regressione univariata del calcio (44 campioni) e dell'albumina sierica (49 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

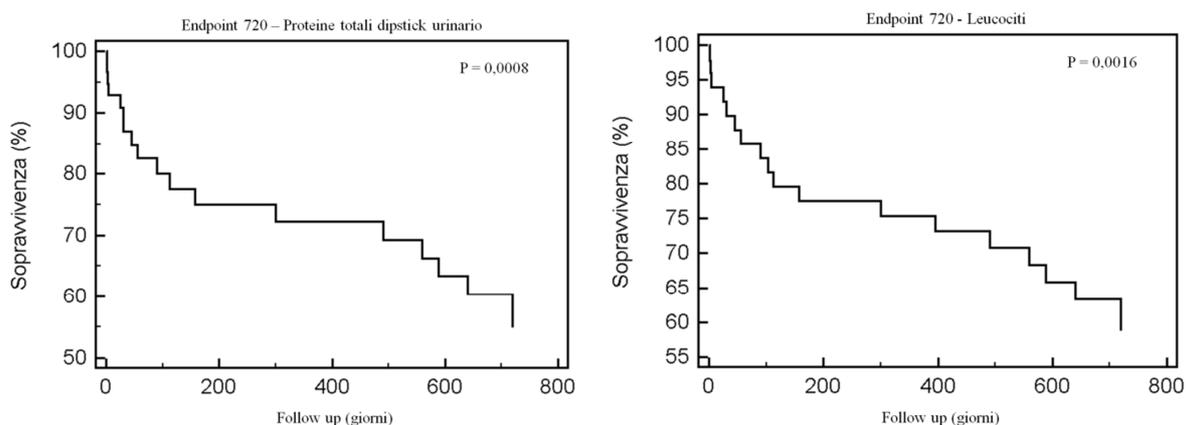


Figura 83 Rappresentazione della regressione univariata delle proteine totali al dipstick urinario (42 campioni) e dei leucociti (50 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

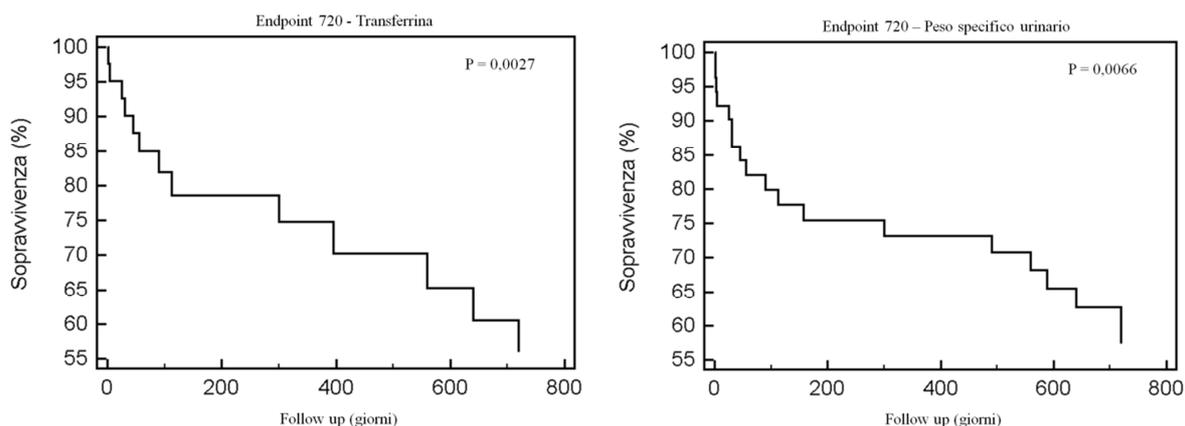


Figura 84 Rappresentazione della regressione univariata della transferrina (28 campioni) e del peso specifico urinario (42 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

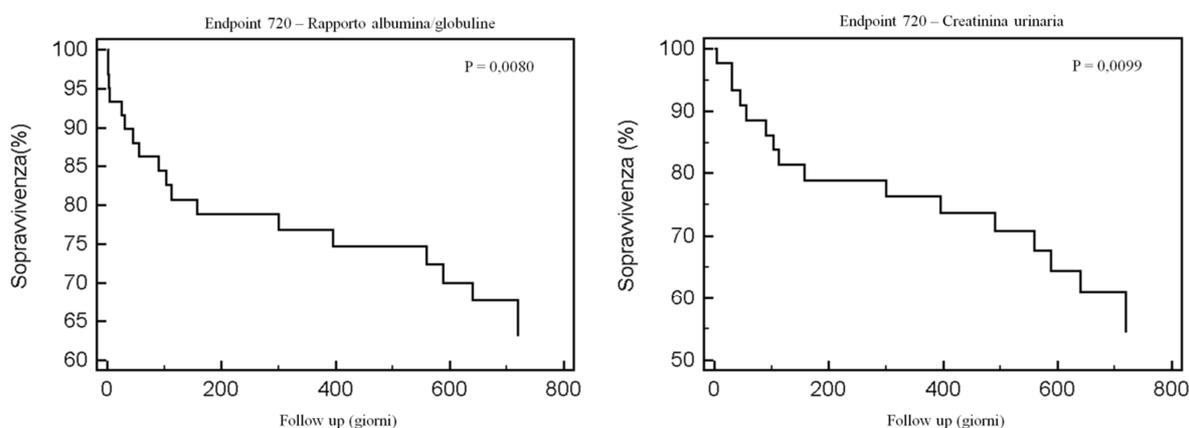


Figura 85 Rappresentazione della regressione univariata del rapporto albumina/globuline (48 campioni) e della creatinina urinaria (36 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

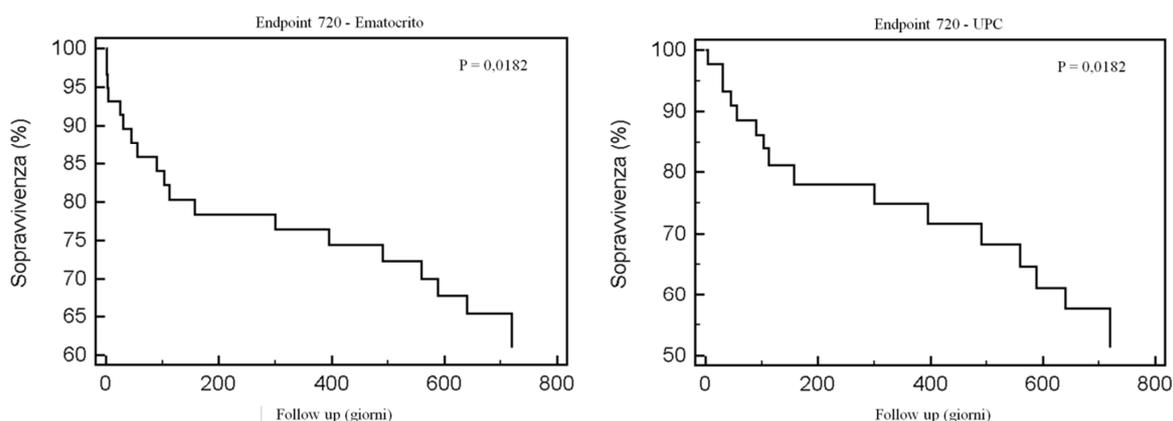


Figura 86 Rappresentazione della regressione univariata dell'ematocrito (50 campioni) e dell'UPC (36 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

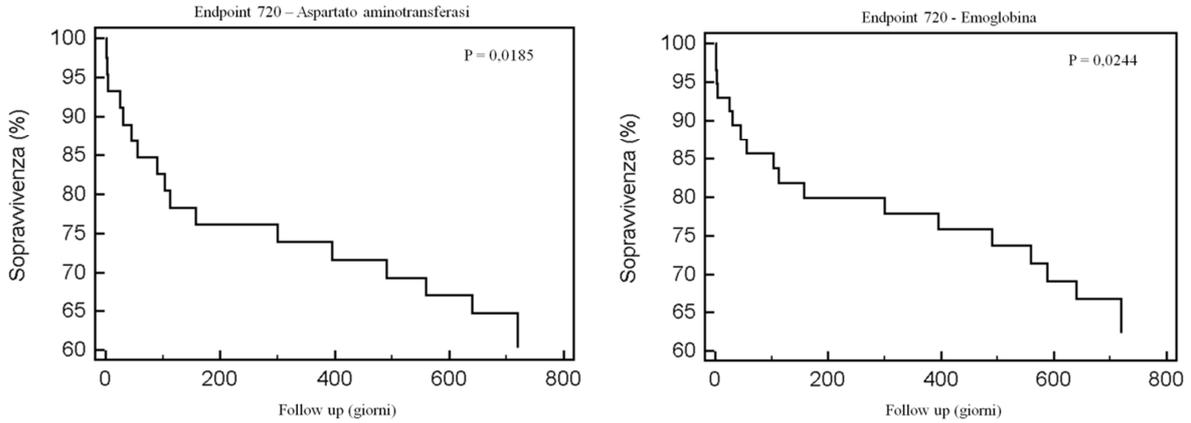


Figura 87 Rappresentazione della regressione univariata dell'aspartato aminotransferasi (49 campioni) e dell'emoglobina (49 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

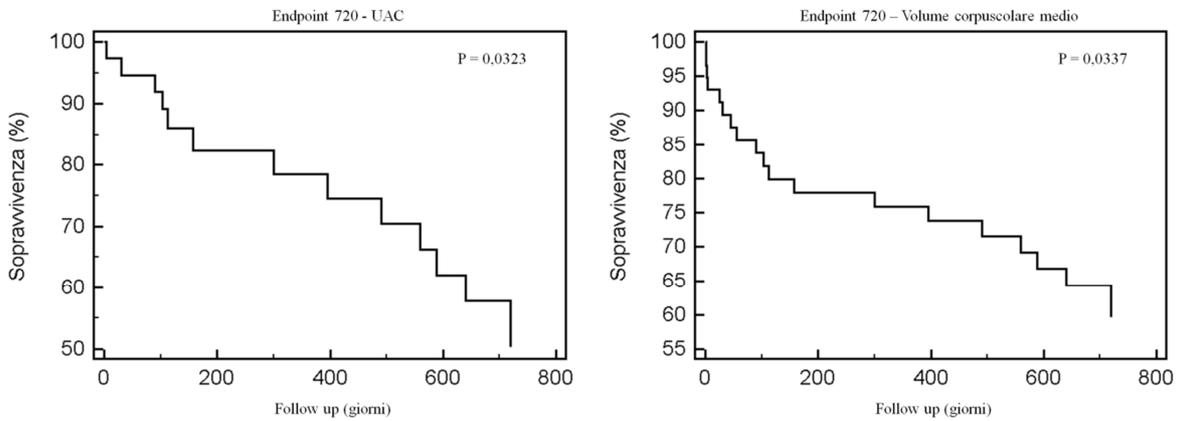


Figura 88 Rappresentazione della regressione univariata dell'UAC (29 campioni) e del volume corpuscolare medio (50 campioni) nell'analisi statistica con endpoint 720 giorni.

7.7 Risultati dell'analisi statistica multivariata della sopravvivenza

I valori risultati statisticamente significativi all'analisi univariata sono stati messi in relazione mediante regressione logistica utilizzando il metodo *stepwise*, raggruppati prima in emocromocitometrico (**Tabella 34**), biochimica sierica (**Tabella 35**), analisi urinaria (**Tabella 36**) e successivamente confrontati tutti insieme (**Tabella 37**). Questa tecnica statistica è utile per l'analisi dei problemi in cui ci sono una o più variabili indipendenti che determinano l'*outcome*.

Emocromocitometrico					
Parametro	Numero campioni	O.R.	Intervallo di confidenza (95%)	Diagnosi corretta (%)	P
Hct	594	0,9160	0,8964 - 0,9360	81,82	< 0,0001

Tabella 34 Regressione logistica multivariata con metodo *stepwise* dei parametri dell'esame emocromocitometrico risultati statisticamente significativi all'analisi univariata (O.R.: odds ratio; Hct: ematocrito).

Biochimica sierica					
Parametro	Numero campioni	O.R.	Intervallo di confidenza (95%)	Diagnosi corretta (%)	P
Creatinina	117	1,3793	1,1365 - 1,6740	80,34	0,0001
A/G	117	0,0819	0,0089 - 0,7575	80,34	0,0001

Tabella 35 Regressione logistica multivariata con metodo *stepwise* dei parametri della biochimica sierica risultati statisticamente significativi all'analisi univariata (O.R.: odds ratio; A/G: rapporto albumina/globuline).

Analisi urinaria					
<i>Parametro</i>	<i>Numero campioni</i>	<i>O.R.</i>	<i>Intervallo di confidenza (95%)</i>	<i>Diagnosi corretta (%)</i>	<i>P</i>
USG	270	0,9109	0,8707 - 0,9530	87,41	< 0,0001
uAlb	270	1,0043	1,0026 - 1,0060	87,41	< 0,0001

Tabella 36 Regressione logistica multivariata con metodo *stepwise* dei parametri dell'analisi urinaria risultati statisticamente significativi all'analisi univariata (O.R.: odds ratio; USG: *urine specific gravity*; uAlb: albumina urinaria).

<i>Parametro</i>	<i>Numero campioni</i>	<i>O.R.</i>	<i>Intervallo di confidenza (95%)</i>	<i>Diagnosi corretta (%)</i>	<i>P</i>
Creatinina	57	1,292	1,0016 - 1,6667	80,70	0,0343

Tabella 37 Analisi multivariata mediante regressione logistica con metodo *stepwise* dei parametri totali risultati statisticamente significativi all'analisi univariata (O.R.: odds ratio).

<i>Variabile</i>	<i>Numero campioni</i>	<i>AUC</i>	<i>Intervallo di confidenza (95%)</i>	<i>P</i>
Creatinina	637	0,752	0,716 - 0,784	< 0,0001

Tabella 38 Analisi sulla sopravvivenza mediante curva di ROC (receiver operating characteristic) della creatinina in funzione dell'outcome (AUC: area under curve).

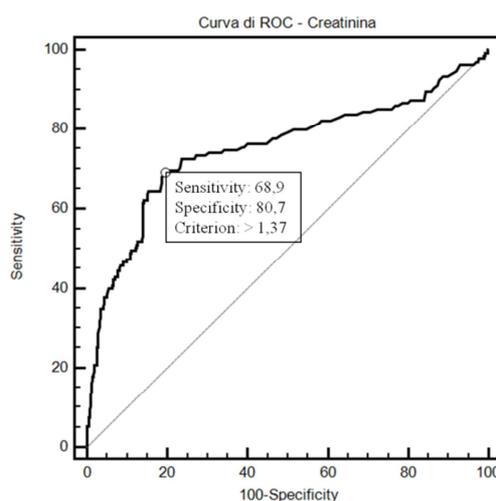


Figura 89 Curva di ROC (receiver operating characteristic) della creatinina in funzione dell'outcome per l'analisi della sopravvivenza.

12.7 7.8 Risultati dell'analisi statistica sull'UPC

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi statistica eseguita sui valori di UPC confrontati per dati accoppiati nel periodo di follow up.

Gruppo follow up	Numero casi	Numero casi in decremento	Δ (%) decremento	Numero casi in aumento	Δ (%) incremento	Numero casi stabili
30	68	41	29,8	15	31,9	13
60	61	36	36,7	13	47,1	12
90	55	27	40,6	17	53,6	11
120	49	21	42,3	16	111,1	12
150	40	18	43,5	12	135,6	10
180	41	23	46,3	11	168,3	7
360	36	19	49,7	11	125,3	6
540	24	15	47,1	4	214,8	5
720	13	6	32,9	1	14,3	6

Tabella 39 Riassunto dell'andamento dei valori di UPC nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi.

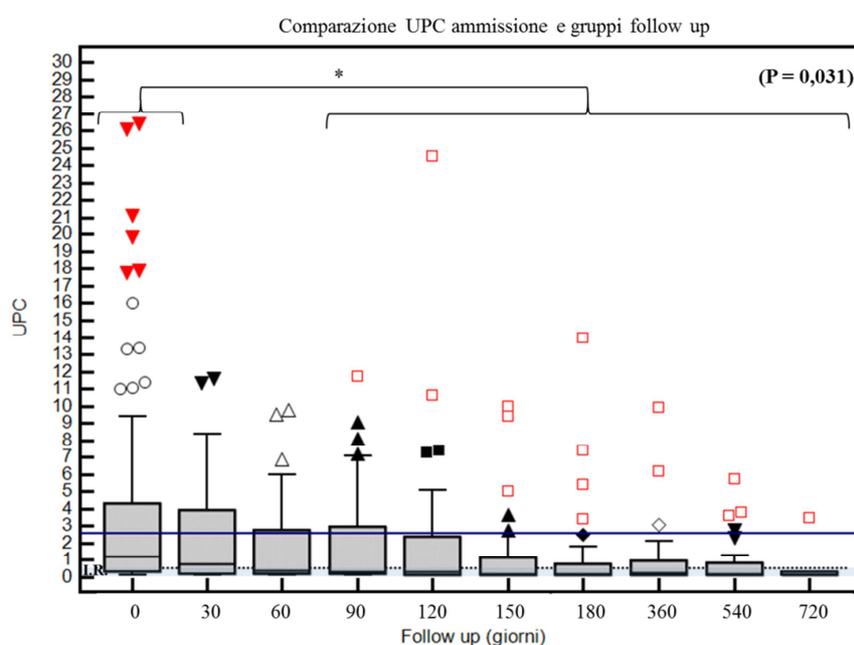


Figura 90 Comparazione dell'UPC (387 valori totali) fra ammissione e gruppi di follow up nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; la linea blu indica il valore cut off di UPC per definire una proteinuria nel range nefrosico; *: P < 0,05).

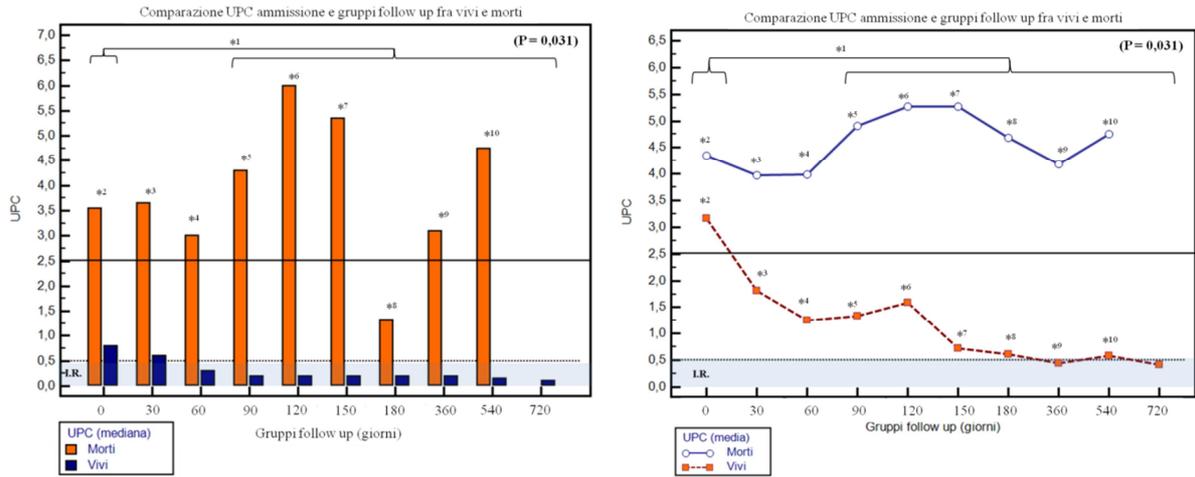


Figura 91 Comparazione dell'UPC (387 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up sulla base dell'outcome (mediana nel grafico a barre e media nel grafico a linee) nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; la linea nera indica il valore cut off di UPC per definire una proteinuria nel range nefrosico; *,*,*,*,*: $P < 0,05$; *,*,*,*,*,*,*,*,*: $P < 0,01$).

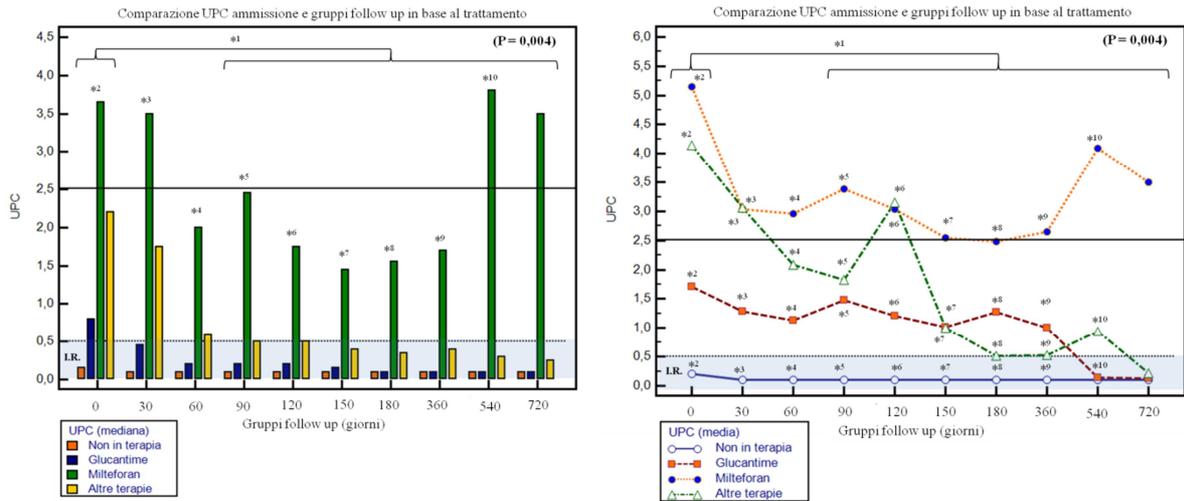


Figura 92 Comparazione dell'UPC (387 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up sulla base del trattamento effettuato (mediana nel grafico a barre e media nel grafico a linee) nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; la linea nera indica il valore cut off di UPC per definire una proteinuria nel range nefrosico;*,*,*,*,*,*,*,*,*,*: $P < 0,01$; *,*,*,*,*: $P < 0,05$).

12.8 7.9 Risultati dell'analisi statistica sull'UAC

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi statistica eseguita sui valori di UAC confrontati per dati accoppiati nel periodo di follow up.

Gruppo follow up	Numero casi	Numero casi in decremento	Δ (%) decremento	Numero casi in aumento	Δ (%) incremento	Numero casi stabili
30	57	27	26,6	23	1616	7
60	53	26	39,1	22	2697,3	5
90	49	22	40	23	3581,5	4
120	47	22	45,6	22	5309,9	3
150	38	19	44,9	16	8627	3
180	37	18	45,2	16	9848	3
360	31	17	57,2	12	1808	2
540	18	9	48,2	7	473,3	2
720	9	4	63	5	268,1	0

Tabella 40 Riassunto dell'andamento dei valori di UAC nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi.

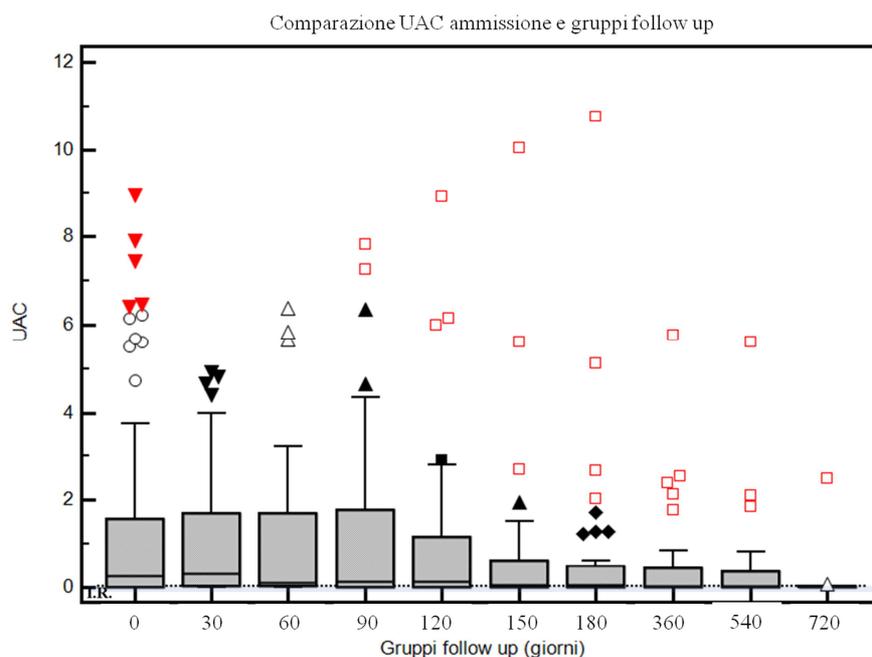


Figura 93 Comparazione dell'UAC (339 valori totali) fra ammissione e gruppi di follow up nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento).

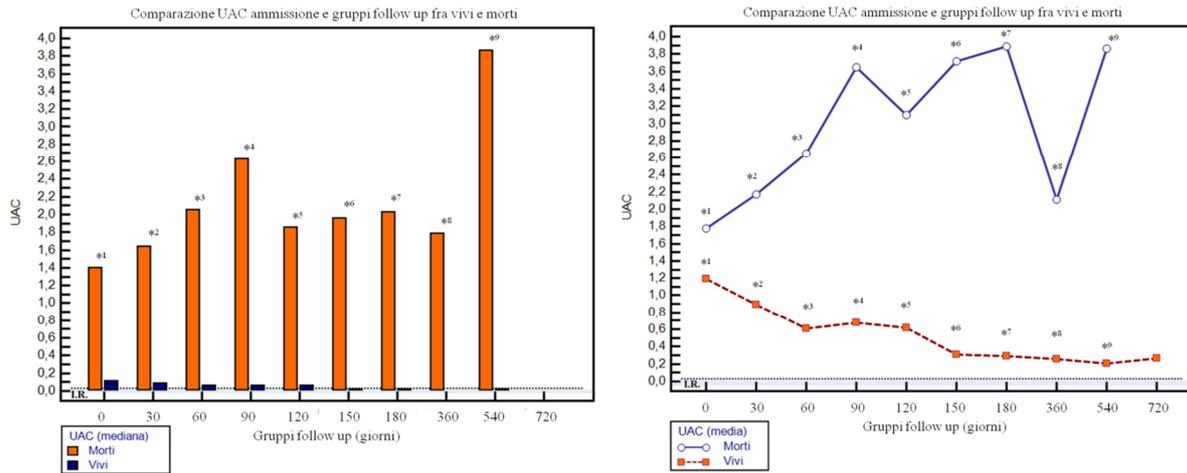


Figura 94 Comparazione dell’UAC (339 valori totali) all’ammissione e nei gruppi di follow up sulla base dell’outcome (mediana nel grafico a barre e media nel grafico a linee) nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *¹, *², *³, *⁴, *⁵, *⁶, *⁷, *⁸: P < 0,01; *⁹: P < 0,05).

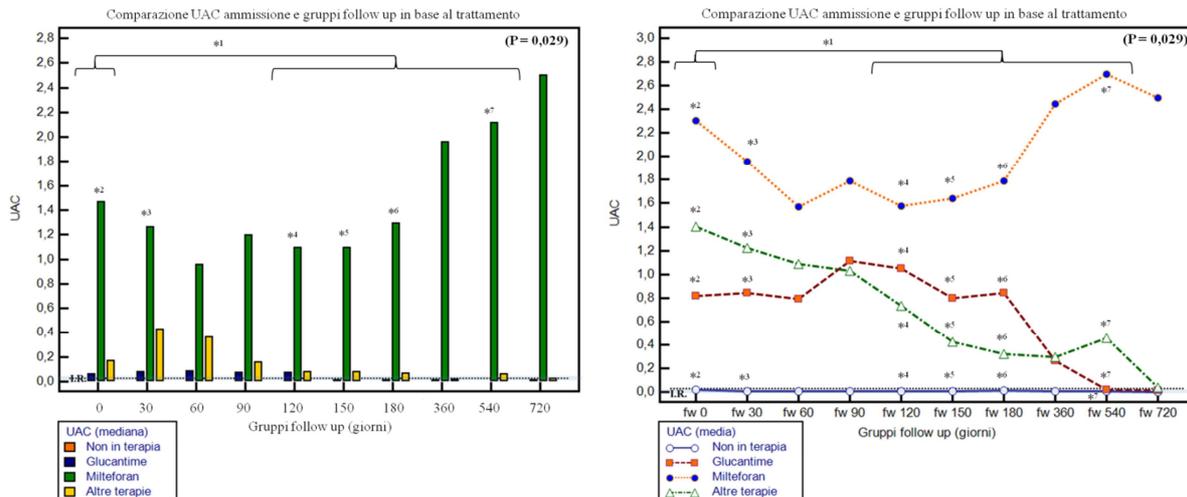


Figura 95 Comparazione dell’UAC (339 valori totali) all’ammissione e nei gruppi di follow up sulla base del trattamento effettuato (mediana nel grafico a barre e media nel grafico a linee) nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *¹, *², *³, *⁴, *⁵, *⁶, *⁷: P < 0,05).

12.9 Risultati dell'analisi statistica sulla creatinina

Di seguito vengono riportati i risultati dell'analisi statistica eseguita sui valori di creatinina confrontati per dati accoppiati nel periodo di follow up.

Gruppo follow up	Numero casi	Numero casi in decremento	Δ (%) decremento	Numero casi in aumento	Δ (%) incremento	Numero casi stabili
30	111	38	14,3	70	31,2	3
60	97	33	15	62	20,3	1
90	88	29	14,1	57	21,2	2
120	78	26	13,9	50	24,1	2
150	72	20	14,7	48	24,5	4
180	66	20	15,2	44	34,7	2
360	59	18	10,2	39	44,8	2
540	41	11	11,1	29	70,4	1
720	21	4	12,5	17	115,8	0

Tabella 41 Riassunto dell'andamento dei valori di creatinina nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi.

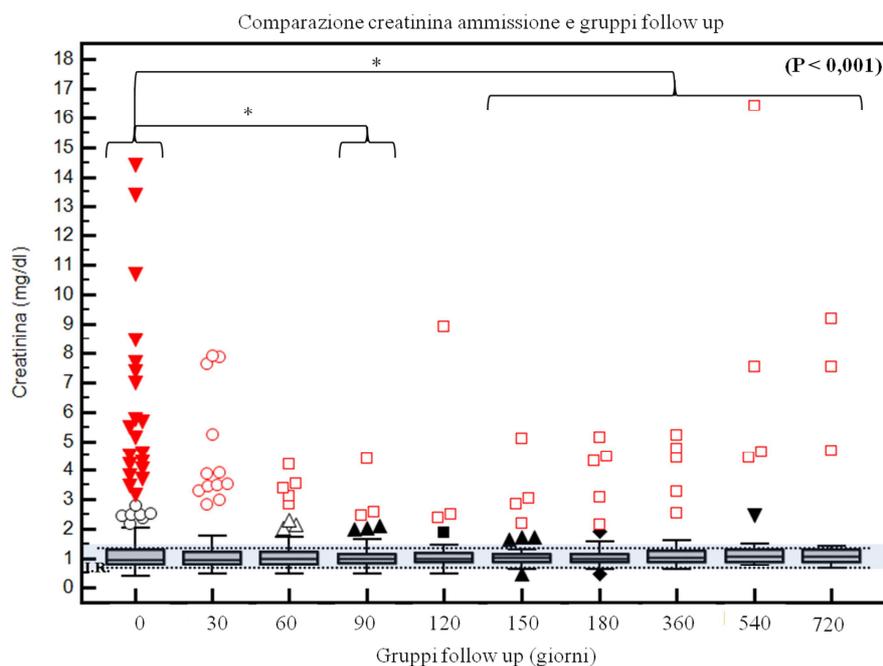


Figura 96 Comparazione della creatinina (633 valori totali) fra ammissione e gruppi di follow up nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *: P < 0,05).

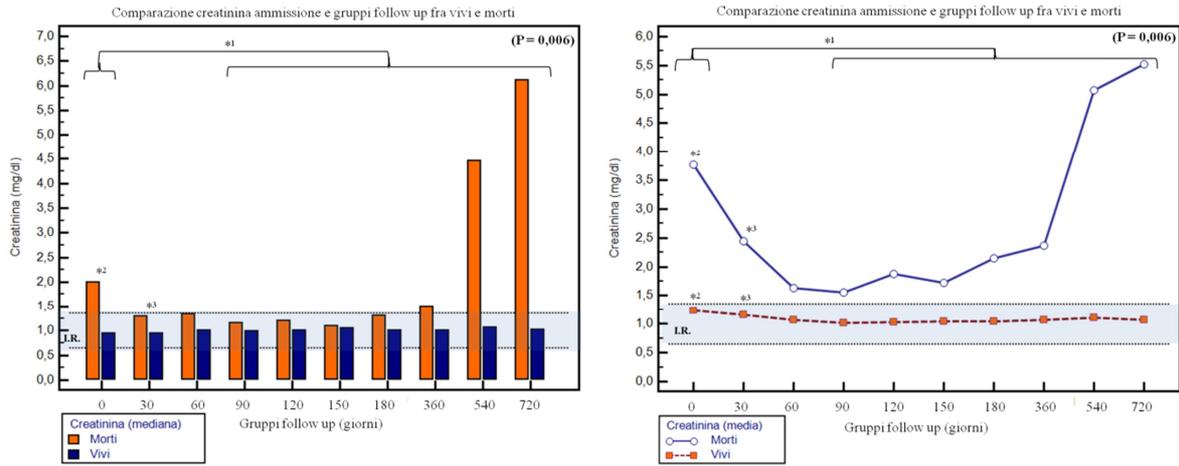


Figura 97 Comparazione della creatinina (633 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up sulla base dell'outcome (mediana nel grafico a barre e media nel grafico a linee) nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *¹, *², *³: P < 0,01).

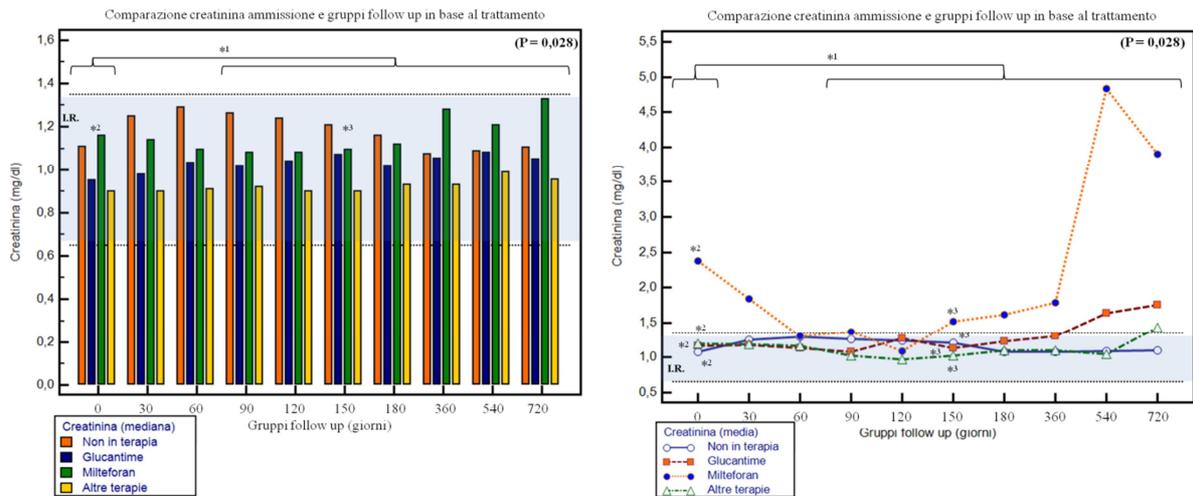


Figura 98 Comparazione della creatinina (663 valori totali) all'ammissione e nei gruppi di follow up sulla base del trattamento effettuato (mediana nel grafico a barre e media nel grafico a linee) nella popolazione di studio (187 casi) in corso di leishmaniosi (I.R.: intervallo di riferimento; *¹, *², *³: P < 0,05).

12.10 Risultati sui pazienti leishmaniotici affetti da sindrome nefrosica

I pazienti affetti da leishmaniosi complicata da sindrome nefrosica sono risultati essere 10. Al momento della diagnosi, questi pazienti hanno presentato almeno tre dei quattro segni clinici e clinico-patologici che contraddistinguono la sindrome nefrosica (UPC > 2,5; albumina sierica < 2,5 g/dl; colesterolemia > 350 mg/dl; comparsa di edemi e versamenti). Nella **Tabella 42** vengono riportati i valori dei principali parametri laboratoristici valutati all'ammissione.

Caso	Tempo di sopravvivenza (giorni)	Età (mesi)	UPC	UAC	Albumina (g/dl)	Colesterolo (mg/dl)	Creatinina (mg/dl)	Hct (%)	A/G	γ -globuline (mg/dl)
1	103	55	13,1	9,2	1,64	216	10,26	26,7	0,34	N.D.
2	20	70	4,5	1,3	1,3	268	0,68	39,5	0,21	1,77
3	300	86	22,9	10,76	2,54	227	4,48	40,9	0,38	2,18
4	729	87	6,2	0,01	1,23	218	1,29	31,9	0,52	N.D.
5	43	50	8,1	6,7	2,42	163	9,13	39,7	0,64	1,91
6	55	57	9,7	5,8	1,62	N.D.	3,56	12,3	0,47	N.D.
7	777	104	2,2	0,05	2,34	N.D.	1,15	45	0,54	N.D.
8	124	61	8,3	5,9	2,14	286	1,18	44,4	0,42	N.D.
9	1	34	16	6,23	0,85	481	4,21	23,4	0,28	N.D.
10	180	124	2,8	0,21	0,93	413	0,43	22,5	0,23	N.D.

Tabella 42 Resoconto delle alterazioni clinico-patologiche riscontrate all'ammissione nei 10 cani affetti da leishmaniosi complicata da sindrome nefrosica. (N.D.: non disponibile; Hct: ematocrito; A/G: rapporto albumina/globuline).

13.DISCUSSIONE

Il presente studio sperimentale è frutto di un'analisi eseguita su 136 casi abbinata ad una valutazione prospettica su 31 casi raccolti durante il periodo dell'internato svolto nella sezione di medicina interna della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna per un totale di 167 pazienti. L'indagine svolta ha permesso di ottenere una casistica numerosa ed una consistente quantità di dati rispetto alla letteratura consultata, ma ha presentato alcuni limiti. Quest'ultimi si possono riassumere in: cartelle cliniche a volte incomplete; mancanza di dati clinico-patologici o matrici organiche stoccate per i casi antecedenti il 2005; perdita del follow up dei casi riferiti in struttura da colleghi esterni per consulenza; disponibilità di dati completi (comprendenti anche le metodiche di più recente introduzione come CRP e UAC) solo dal 2006; presentazione di casi con anamnesi di trattamenti effettuati prima dell'ammissione in clinica; impossibilità di conoscere precisamente l'anamnesi di alcuni pazienti provenienti da canili e/o sequestrati ed in seguito condotti a visita. Infine, le limitazioni economiche imposte dai proprietari per l'esecuzione del protocollo diagnostico non hanno sempre permesso di ottenere dati clinici e clinico-patologici completi. Oltre a ciò, in alcuni casi, nonostante si sia cercato di standardizzare i tempi dei follow up (con una tolleranza di ± 15 giorni dall'ammissione fino al gruppo di follow up corrispondente a 6 mesi e di ± 90 giorni dal gruppo di follow up corrispondente ad un anno fino al termine dello studio), i controlli seriali a cui il cane è stato sottoposto sono stati limitati dalla disponibilità (economica e non) del proprietario.

La leishmaniosi è una patologia che può provocare immunodepressione e può essere associata alla comparsa di altre patologie di tipo immunomediato/autoimmune come Ehrlichiosi, Borreliosi, Leptosirosi, Lupus Eritematoso Sistemico, Babesiosi, Hepatozoonosi, Filariosi o alla comparsa di

malattie concomitanti come ad esempio infezioni delle vie urinarie, piodermiti, polmoniti, gastroenteriti etc (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Queste patologie possono avere una sintomatologia in parte sovrapponibile alla leishmaniosi e da un punto di vista diagnostico la distinzione tra quest'ultime e la leishmaniosi stessa a volte risulta complessa. Un esempio frequente nella pratica clinica è rappresentato dall'Ehrlichiosi o dalle malattie autoimmuni (LES, poliartrite autoimmune) le quali, oltre ad avere una sintomatologia comune, si possono presentare con positività anticorpali (IFI, ANA-test) nei pazienti con leishmaniosi. Ad oggi, tuttavia, non è ben chiaro se tali positività siano l'esito di cross-reazioni o dell'effettiva compresenza delle malattie. Per questi motivi sono stati esclusi dallo studio i pazienti la cui sintomatologia non era attribuibile con certezza alla leishmaniosi e questo criterio di selezione può aver escluso cani effettivamente infetti (sottostimando la prevalenza della malattia), ma dal punto di vista statistico ha permesso un'analisi più corretta e veritiera Analogamente, un altro problema poteva essere rappresentato dalla vaccinazione per la leishmaniosi che, da quanto attualmente è noto (monografia CaniLeish Virbac, 2012) (Javier Moreno *et al.*, 2012), potrebbe portare ad una positività sierologica a basso titolo. Nella popolazione oggetto dello studio tuttavia non era presente nessun paziente vaccinato poiché al momento la vaccinazione non è una pratica frequente nella nostra realtà clinica.

La prevalenza della malattia nella popolazione di studio è stimata essere 1,6%. Tale dato risulta essere lievemente inferiore rispetto a quanto riportato in letteratura (dal 2 al 40% nel bacino del mediterraneo) (G.S.L.C., 2007). Il dato riportato deve essere inteso esclusivamente come una stima in quanto il presente lavoro non è strutturato come uno studio epidemiologico. Tuttavia è evidente come la prevalenza della malattia nel bacino di afferenza dell'ospedale veterinario sia bassa. E' necessario ricordare che l'esclusione di pazienti con patologie immunomediate/autoimmuni concomitanti e sintomatologia non certamente riferibile alla leishmaniosi potrebbe aver comportato anche la

mancata inclusione di pazienti leishmaniotici con conseguente possibile sottostima della prevalenza.

Nella popolazione di studio il titolo anticorpale all'immunofluorescenza indiretta era disponibile per 144 pazienti. La maggior parte di questi casi presentava un elevato titolo anticorpale con mediana 1:1280, nella maggior parte dei casi associato a sintomi clinici riferibili a leishmaniosi. Dei 144 pazienti, 19 soggetti (13,2%) presentavano una positività sierologica a "basso titolo", cioè inferiore a 1:320. Per questi pazienti era tuttavia disponibile, dal punto di vista diagnostico, la citologia, la quale ha permesso di evidenziare la presenza della forma amastigote di *Leishmania spp.* Le motivazioni di questi risultati possono essere ricondotte all'inclusione di soggetti precedentemente trattati, ma non negativizzati dal punto di vista citologico, oltre al fatto che, come è riportato in letteratura, non esiste sempre una correlazione fra titolo anticorpale e sintomatologia clinica (Ferrer *et al.*, 1995). Come riportato in precedenza, in nessun soggetto incluso nella popolazione di studio è stata riportata in anamnesi la vaccinazione per la leishmaniosi e quindi è possibile escludere il coinvolgimento di quest'ultima nei pazienti a "basso titolo" anticorpale.

Nella nostra popolazione di studio, la distribuzione dell'età dei pazienti ha mostrato una notevole variabilità, includendo soggetti molto giovani (6 mesi) ed alcuni soggetti anziani (168 mesi), la cui mediana è risultata essere di 60 mesi. Si sono registrati due picchi: un primo fra 24 e 36 mesi ed un secondo, meno evidente, a 96 mesi. Questi risultati si mostrano in accordo con la letteratura, nella quale viene riportata la presenza di un picco al di sotto dei 3 anni ed un secondo picco tra gli 8 ed i 10 anni (Alvar *et al.*, 2004) (G.S.L.C., 2007) (Solano-Gallego *et al.*, 2011). La popolazione inclusa in questo studio è composta prevalentemente da maschi (68%), di cui il 65% interi ed il 3% castrati. Tale dato conferma una prevalenza maggiore per la malattia nel sesso maschile, come riportato anche in letteratura (G.S.L.C., 2007). I cani meticci rappresentano la maggioranza dei pazienti inclusi in questi studio, ma le razze

maggiormente rappresentate (con frequenza dal 3% al 5%) sono state Boxer, Dobermann Pinscher, Labrador, Pastore Tedesco, American Staffordshire e Setter Inglese, in linea con quanto descritto in letteratura (G.S.L.C., 2007) (Solano-Gallego *et al.*, 2011) (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Questi risultati tuttavia dovrebbero essere confrontati con la diffusione di queste razze sul territorio italiano.

I segni clinici riscontrati all'ammissione e maggiormente rappresentati (> 5%) nella nostra realtà clinica sono stati dermatopatia (49%), linfoadenomegalia (30%), dimagrimento (17%), poliuria/polidipsia (16%), depressione del sensorio/abbattimento (12%), anoressia/disoressia (12%), vomito/diarrea (11%), astenia/debolezza (10%) e pallore delle mucose (5%). Tali risultati si sono mostrati in parziale accordo con quanto riportato in letteratura, in quanto alcuni segni clinici come la poliuria/polidipsia sono risultati sovrarappresentati (in letteratura 10%) mentre altri segni clinici come onicogrifosi, epistassi, lesioni oculari ed epato-splenomegalia, da noi poco rappresentati (< 5%), in letteratura sono riportati con una frequenza maggiore (6 - 30%) (Alvar *et al.*, 2004) (Baneth *et al.*, 2008) (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

La maggior frequenza della poliuria/polidipsia, rilevata nel nostro studio, può essere giustificata dal fatto che i pazienti portati a visita, a volte, erano casi riferiti da colleghi per una consulenza, cani già trattati o comunque soggetti che già da tempo erano affetti da leishmaniosi. A causa della presenza da lungo tempo del danno renale provocato dalla leishmaniosi, lo stadio della malattia renale cronica nella popolazione di studio può risultare più avanzato rispetto a quanto riportato in letteratura.

Le alterazioni clinico-patologiche riscontrate all'ammissione con maggiore frequenza e di particolare interesse ai fini di questo lavoro sono rappresentate dai parametri riguardanti la proteinuria. L'UPC presente in 70% dei casi, sottolinea l'elevata percentuale di pazienti leishmaniotici nefropatici con danno glomerulare. Questo dato risulta sovrarappresentato rispetto a quanto descritto in

letteratura (Baneth e Solano-Gallego, 2012). Per quanto riguarda la prevalenza dell'albuminuria (UAC), risultata essere nella nostra popolazione del 78%, non sono riportati dati analoghi in letteratura. Altri parametri di particolare interesse, inclusi nel profilo protidemico, sono: ipoalbuminemia (66%), iperglobulinemia (75%) e riduzione del rapporto albumina/globuline (64%) che si dimostrano in linea con quanto affermato in letteratura (Baneth e Solano-Gallego, 2012). L'iperazotemia si è presentata nel 22% dei pazienti risultando in accordo con quanto riferito in letteratura, mentre la leucopenia (14%), la trombocitopenia (21%) e l'anemia, manifestata da una bassa concentrazione emoglobinica (41%), risultano sottorappresentati se confrontati con i dati riportati in letteratura (Baneth e Solano-Gallego, 2012).

Nella popolazione di studio si è osservato che il 70% di pazienti risulta proteinurico ($UPC \geq 0,5$) ed il 30% non proteinurico ($UPC < 0,5$). Quest'ultimi, erano per il 27% albuminurici ($UAC > 0,024$) e per il 73% non albuminurici ($UAC \leq 0,024$), evidenziando come l'albuminuria possa essere un marker precoce di danno glomerulare. Allo stesso tempo esiste una parte di pazienti (6% circa) proteinurici, ma non albuminurici. Questo risultato permette di ipotizzare che la proteinuria possa essere l'esito di un danno tubulare o tubulo-interstiziale poiché questi stessi pazienti presentano un aumento dell'UPC di grado lieve/moderato ($UPC < 2$), in assenza di albuminuria. Infatti, come è riportato in letteratura, circa un terzo dei pazienti presenta una nefropatia tubulo interstiziale (Zatelli *et al.*, 2003). Altro riscontro importante nella nostra popolazione di studio è la presenza di una rilevante percentuale di pazienti (38%) presentanti una proteinuria di grave entità ($UPC > 2,5$), definibile nel range nefrosico. L'attenzione dello studio si è focalizzata su questi pazienti che, come descritto in letteratura (Klosterman *et al.*, 2011), presentano una progressione della malattia renale cronica (CKD) più rapida ed una sintomatologia clinica più grave rispetto a soggetti presentanti una proteinuria di grado lieve o non proteinurici.

Dall'analisi statistica in cui sono confrontati i dati clinico-patologici rilevati al momento dell'ammissione con quelli ottenuti durante il follow up, si è ricavato il tempo impiegato da queste alterazioni per mostrare una variazione statisticamente significativa dall'ammissione, oltre al tempo necessario affinché tali alterazioni rientrino nell'intervallo di riferimento (**Figure da 24 a 48**). Per quanto riguarda l'ematocrito, l'emoglobina e gli eritrociti (parametri clinico-patologici la cui diminuzione ha indicato la presenza di anemia in più della metà della popolazione all'ammissione) nei gruppi di follow up da 90 a 720 giorni si è registrato un miglioramento statisticamente significativo ($P < 0,05$) rispetto al gruppo dell'ammissione, mentre la mediana della popolazione è rientrata nell'intervallo di riferimento a 60 giorni dalla diagnosi/inizio della terapia.

I risultati dei parametri renali alla biochimica sierica riportano che la creatinina e l'urea non mostrano nei gruppi di follow up variazioni statisticamente significative rispetto all'ammissione e la mediana della popolazione si trova all'interno dell'intervallo di riferimento in tutti i gruppi, anche se un numero elevato di pazienti (25% dei soggetti con un valore mediano di creatinina corrispondente a 3,05) presenta una grave iperazotemia. Per quanto riguarda il fosforo i gruppi ai giorni 90, 180, 360 e 540 hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa ($P < 0,05$) dall'ammissione e la mediana della popolazione è risultata all'interno dell'intervallo di riferimento in tutti i gruppi.

Dai parametri del profilo protidemico sierico si è rilevato che, le proteine totali hanno mostrato una variazione statisticamente significativa ($P < 0,05$) rispetto all'ammissione nei gruppi 180, 360, 540 e 720 e la mediana della popolazione è risultata all'interno dell'intervallo di riferimento in tutti i gruppi. L'albumina ha mostrato una variazione statisticamente significativa ($P < 0,05$) dall'ammissione nei gruppi 90, 120, 150, 180, 360, 540, 720 e la mediana della popolazione è risultata nell'intervallo di riferimento a 90 giorni dalla diagnosi/inizio della terapia, risolvendo la condizione d'ipoalbuminemia. Il rapporto albumina/globuline ha mostrato un miglioramento statisticamente significativo

($P < 0,05$) dall'ammissione (dove si è presentato ridotto) nei gruppi 60, 90, 120, 150, 180, 360, 540, 720 e la mediana della popolazione è risultata essere nell'intervallo di riferimento a 60 giorni dalla diagnosi/inizio della terapia. Le γ -globuline hanno mostrato una riduzione statisticamente significativa ($P < 0,05$) dall'ammissione nei gruppi 180 e 720 e la mediana della popolazione è rientrata nell'intervallo di riferimento a 720 giorni. Il profilo protidemico tende a normalizzarsi nella maggior parte della popolazione (3 quartili) tra i 150 e 180 giorni dall'inizio del trattamento. Nonostante questo le γ -globuline tendono a rimanere alte fino a quasi la fine dello studio (720 giorni). Il tempo nettamente più lungo, impiegato dalle γ -globuline per rientrare nell'intervallo di riferimento, può essere attribuito alla necessità di un tempo maggiore per la soppressione o riduzione dell'imponente risposta umorale indotta dalla leishmaniosi.

Dal punto di vista della proteinuria, l'UPC mostra una riduzione statisticamente significativa rispetto all'ammissione nei gruppi 180, 360, 540 e 720 e la mediana della popolazione risulta essere all'interno dell'intervallo di riferimento (risultando non proteinurico o borderline proteinurico) a 150 giorni. L'UAC non presenta variazioni statisticamente significative nei gruppi di follow up dall'ammissione, ma una sua riduzione che porta la mediana della popolazione all'interno dell'intervallo di riferimento è osservabile a 150 giorni. Combinando questi risultati con quelli ottenuti dall'analisi statistica *Friedman* (**Tabelle 34 - 35** e **Figure 70 - 73**) è possibile ricavare che le variazioni statisticamente significative ($P < 0,05$) rispetto all'ammissione si verificano non prima dei 90 giorni. Nonostante ciò, alcuni pazienti potrebbero mostrare una riduzione della proteinuria prima di questo valore *cut off*, mentre altri potrebbero non mostrare mai un miglioramento della proteinuria nel corso della loro vita, anche a seguito del trattamento. In conclusione, si può affermare che la mancata risposta alla riduzione della proteinuria prima di 90 giorni non sia necessariamente da associare ad una mancata risposta terapeutica. Inoltre, si sottolinea l'importanza

di oggettivare la causa di questa proteinuria risalendo alla tipologia del danno renale in corso mediante l'ausilio di metodiche diagnostiche come la biopsia renale.

Alla luce di questi risultati ci si è posti il problema di stabilire quali siano le variabili che posseggano un indice di predittività statisticamente significativo in funzione dell'*outcome*. Dall'analisi statistica univariata eseguita utilizzando una *cox proportional hazards regression* è interessante notare come i parametri renali (creatinina, urea e fosforo) siano risultati statisticamente significativi in funzione dell'*outcome*, in particolar modo i pazienti presentanti iperazotemia risultano mostrare un 50% di rischio in più di prognosi infausta. Il potassio si è dimostrato fortemente associato con l'*outcome*, infatti i pazienti iperpotassiemici all'ammissione risultano essere esposti ad un rischio 4 volte maggiore di prognosi infausta. Anche l'ipoalbuminemia ha mostrato un incremento statisticamente significativo di 4 volte del rischio di morte e la riduzione del rapporto albumina/globuline di 20 volte. Per quello che riguarda la proteinuria, l'aumento dell'UPC e dell'UAC è risultato statisticamente significativo, con un incremento del 20% di prognosi infausta. L'analisi statistica multivariata, eseguita mediante regressione logistica, ha confermato quanto già dimostrato con l'univariata e cioè che l'aumento della creatinina e lo stato iperazotemico concomitante è strettamente connesso con una prognosi infausta aumentando del 30% il rischio di morte. Da quest'analisi, si deduce come un aumento della creatinemia e della proteinuria, oltre ad una riduzione dell'albuminemia, siano associate ad rischio di morte maggiore. Inoltre, risulta interessante notare come l'alterazione di questi parametri sia alla base della malattia glomerulare e della sindrome nefrosica, una complicazione della nefropatia caratterizzata da un tempo di sopravvivenza inferiore rispetto ai pazienti nefropatici non nefrosici.

L'analisi statistica eseguita sull'UPC per dati accoppiati, ha evidenziato come i pazienti deceduti presentino una proteinuria nel range nefrosico, nettamente più alta rispetto a quella rilevata nei soggetti che sopravvivono e che non si riduce

nemmeno in seguito al trattamento. I pazienti che sopravvivono hanno una proteinuria che risponde al trattamento e che si riduce progressivamente, a tal punto che a 60 giorni dalla diagnosi/inizio della terapia il valore mediano risulta essere all'interno dell'intervallo di riferimento. Per quanto riguarda i trattamenti, è evidente come i pazienti trattati con *Glucantime* abbiano presentato una maggiore riduzione dell'UPC (la cui mediana è risultata essere all'interno dell'intervallo di riferimento a 30 giorni) al contrario di quelli trattati con *Milteforan* che hanno presentato in tutti i gruppi di follow up una proteinuria grave (quasi sempre nel range nefrosico). Inoltre, in quelli trattati con *Milteforan*, dopo un'iniziale miglioramento è comparso un peggioramento a 360 giorni dall'inizio delle terapie. Questo risultato però può essere correlato al fatto che i pazienti a cui veniva proposto il trattamento con *Milteforan*, grazie alla sua minore nefrotossicità, erano quelli che all'ammissione si presentavano iperazotemici e quindi ad uno stadio più avanzato della malattia renale cronica (stadio IRIS 2,3,4 della CKD).

L'analisi statistica sull'UAC per dati accoppiati, ha sottolineato ciò che è stato dimostrato con l'UPC, cioè che i soggetti deceduti hanno presentato un valore di UAC nettamente più elevato rispetto ai soggetti sopravvissuti ed addirittura che tende a peggiorare nel tempo. Nei soggetti deceduti è evidente un miglioramento dell'UAC a 360 giorni, dall'inizio della terapia, che però è imputabile al netto peggioramento dello stato iperazotemico manifestato dagli stessi pazienti e quindi alla riduzione del numero di nefroni funzionanti. Come per l'UPC, anche nell'UAC il miglioramento risulta più evidente nei pazienti trattati con *Glucantime* (la cui mediana del valore risulta essere nell'intervallo di riferimento a 150 giorni) rispetto a quelli trattati con *Milteforan*.

L'analisi statistica sulla creatinina, per dati accoppiati, ha sottolineato quanto già dimostrato con l'analisi statistica multivariata e cioè la presenza di una stretta correlazione fra lo stato iperazotemico e il rischio di morte. I soggetti deceduti sono risultati sempre iperazotemici in tutti i gruppi di follow up con un riduzione

graduale del valore iniziale di creatinina fino a 150 µmol/L, attribuibile alla stabilizzazione del paziente, seguito da un importante peggioramento dello stato iperazotemico indice della progressione della malattia renale cronica (CKD). I pazienti sopravvissuti si sono presentati invece sempre normoazotemici.

In conclusione è possibile affermare che la leishmaniosi nel cane è una patologia relativamente frequente nella nostra realtà clinica e che presenta caratteristiche cliniche e clinico-patologiche in accordo con quanto riportato in letteratura. Il coinvolgimento renale in seguito al danno glomerulare o tubulo-interstiziale e le conseguenze sistemiche che ne derivano possono essere predominanti a livello clinico e laboratoristico, anche se tutti i cani affetti da leishmaniosi non necessariamente presentano un danno renale. La gravità del quadro clinico appare associata in maniera significativa anche all'entità della risposta umorale dovuta all'infiammatoria sistemica cronica e alla comparsa di complicazioni conseguenti alla malattia glomerulare come la sindrome nefrosica. I risultati ottenuti da questo studio sperimentale evidenziano l'importanza di ottenere una diagnosi precoce di leishmaniosi al fine di limitare le complicazioni indotte da questa patologia che possono peggiorare l'*outcome*. Inoltre è importante stadiare correttamente il paziente al fine di mettere in atto il protocollo terapeutico più adatto. Questa affermazione si basa sulla dimostrazione che i pazienti presentanti all'ammissione proteinuria ed iperazotemia sono associati ad una prognosi più sfavorevole e che l'attuazione di strategie terapeutiche mirate a ridurre queste complicanze possano essere associate ad una riduzione del rischio di morte. Il ricorso ai trattamenti per la leishmaniosi si sono dimostrati essere efficaci al fine di migliorare la proteinuria e lo stato iperazotemico dei pazienti, tranne in quei soggetti in cui la malattia renale cronica, per lo stadio avanzato in cui si presentava (stadio 3 e 4 IRIS), non ha permesso un miglioramento clinico o clinico-patologico. In futuro risulterà utile confrontare questi dati clinico-patologici con i risultati ottenuti da uno studio prospettico al fine di valutare la reale efficacia dei trattamenti.

14. Bibliografia

- A Chang, O. A. (2007). Membranous and crescentic glomerulonephritis in a patient with anti-nuclear and anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. *Kidney International.*, 71, 360-365.
- Aardema H, S. Y. (2009). Pancytopenia in a simultaneous pancreas and kidney transplant recipient: an unexpected cause - a case of visceral leishmaniasis in a transplant recipient. *Clinical nephrology*, 71(4), 460-2.
- Abate O., V. V. (2005). Valutazione qualitativa della proteinuria mediante SDS-AGE ai fini della localizzazione del danno renale nel cane e nel gatto. *Veterinaria*, 19(1), 9-14.
- Almeida ABPF, S. V. (2013). Canine visceral leishmaniasis: diagnostic approaches based on polymerase chain reaction employing different biological samples. *Diagnostic microbiology and infectious disease*.
- Altet L, F. O.-G. (2002). Mapping and sequencing of the canine NRAMP1 gene and identification of mutations in leishmaniasis-susceptible dogs. *Infection and immunity.*, 70(6), 2763-71.
- Alvar J., V. I. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates in its incidence. 7(5), e35671.
- Amann K, B. C. (2012). Renal leishmaniasis as unusual cause of nephrotic syndrome in an HIV patient. *JASN*, 23(4), 586-90.
- Aresu L., B. S. (2012). Light and electron microscopic analysis of consecutive renal biopsy specimens from Leishmania-seropositive dogs. *Veterinary Pathology, Epub ahead of print*, 1-8.
- Aresu L., V. F. (2007). Membranoproliferative glomerulonephritis type III in a simultaneous infection of *Leishmania infantum* and *Dirofilaria immitis* in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 19(5), 569-572.
- Athanasiou L.V., S. M. (2013). Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: a pilot open clinical trial. *Veterinary parasitology*, 192(1-3), 91-97.
- Ball S.T., L. M. (2003). Urinary retinol binding protein in indo-asian patients with idiopathic interstitial nephritis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 96(5), 363-367.
- Baneth D. and Solano-Gallego. (2012). Leishmaniases. In Greene, *Infectious disease of the dog and cat* (p. 734-749).
- Baneth G., K. A.-G. (2008). Canine leishmaniosis – new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one. . 24(7), 324-30.

- Barbieri C.L. (2006). Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 28(7), 329-37.
- Basnayake K., S. S. (2011). The biology of immunoglobulin free light chains and kidney injury. *Kidney International*, 79(12), 1289-1301.
- Bianciardi P., B. C. (2009). Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs. clinicopathological evaluation of the impact on the kidney. *Toxicologic pathology*, 37(6), 770-775.
- Boonyarit Cheunschon. (2012). *Renal Pathology Review*. Tratto da <http://renalpathologyreview.blogspot.it/>:
<http://renalpathologyreview.blogspot.it/2012/08/non-iga-mesangioproliferative.html>
- Brown, C. (2011). Cap. 24: Renal pathology. In B. J. D.J., *Nephrology and urology of small animals* (p. 215-228). Wiley-Blackwell.
- Centro Nazionale Trapianti. (2012, Aprile). *Criteri generali per la valutazione di idoneità del donatore*. Tratto da San Filippo Neri: http://www.sanfilippoeneri.roma.it/file_allegati/Linee_Giu08.pdf
- Chaigne V, K. Y. (2004). A patient with visceral leishmaniasis and acute renal failure in necrotizing glomerulonephritis. *Nephrologie*, 25(5), 179-183.
- Chew D.J., D. S. (2011). Disease of the glomerulus. In D. S. Chew D.J., *Canine and feline nephrology and urology* (Second edition ed., p. 218-239). Elsevier Saunders.
- Ciaramella P., O. G. (1997). A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *The Veterinary Record*, 141(21), 539-543.
- Cortadellas O., F.-d. P. (2009). Serum phosphorus concentrations in dogs with leishmaniasis at different stages of chronic kidney disease. *Veterinary Record*, 164(16), 487-90.
- Cortadellas O., F.-d. T. (2006). Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences. *Journal of veterinary internal medicine*, 20(4), 941-947.
- Costa F.A.L., G. H. (2003). Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral Leishmaniasis. *Veterinary pathology*, 40(6), 677-84.
- Costa F.A.L., Prianti M.G., S. (2010). T cells, adhesion molecules and modulation of apoptosis in visceral leishmaniasis glomerulonephritis. *BMC Infectious Disease*, 10(112), 1-12.
- Coura-Vital M., M. M.-C.-S.-O.-F. (2011). Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *The veterinary journal*, 190(2), e43-e47.

- Daher EF, E. L. (2008). Clinical presentation and renal evaluation of human visceral leishmaniasis (Kala-azar): a retrospective study of 57 patients in Brazil. *The Brazilian Journal of Infectious Disease.*, 12(4), 329-332.
- Daher EF, R. N. (2011). Renal function improvement with pentavalent antimonial agents in patients with visceral leishmaniasis. *AJN*, 33(4), 332-336.
- D'amico G. and Bazzi C. (2003). Pathophysiology of proteinuria. *Kidney international*, 63(3), 809-825.
- Dantas-Torres F., S.-G. L.-C. (2012). Canine Leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences. *Trend in Parasitology*, 28(12), 531-38.
- de Albuquerque B.C.N.C., M. F. (2008). Structural changes in kidneys of dogs with natural infection of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *R. Bras. Ci. Vet.*, 15(1), 3-5.
- De Brito T., H.-S. S. (1975). Glomerular involvement in human kala-azar. *The american journal of tropical medicine and hygiene*, 24(1), 9-18.
- de Oliveira RA, D. L. (2011). Renal tubular dysfunction in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Kidney International*, 80(10), 1099-1106.
- Defontis M., B. N. (2013). Automated and visual analysis of commercial urinary dipsticks in dogs, cats and cattle. *Research in Veterinary Science*, 94(3), 440-445.
- Dettwiler S, M. T. (2010). Visceral Leishmaniasis in a kidney transplant recipient: parasitic interstitial nephritis, a cause of renal dysfunction. *AJT*, 10(6), 1486-89.
- Dettwiler S, M. T. (2010). Visceral leishmaniasis in a kidney transplant recipient: parasitic interstitial nephritis, a cause of renal dysfunction. *American Journal of transplantation.*, 10(6), 1486-89.
- Dieter Glatz. (2002). *Patho & Co*. Tratto da <http://alf3.urz.unibas.ch/>: <http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/getpic-fra.cfm?id=2732>
- Dutra M., M. R. (1985). Renal involvement in visceral leishmaniasis. *AJKD*, 6(1), 22-27.
- Elnojomi NAA, M. A.-H. (2010). Surrogate markers of subtle renal injury in patients with visceral leishmaniasis. *Saudi Journal of Kidney disease and transplantation*, 21(5), 872-875.
- Esch K.J., P. (2013). Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 58-85.
- Figueredo L.A., d. P.-C.-F.-T. (2012). Clinical and hematological findings in *Leishmania braziliensis*-infected dogs from Pernambuco, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 21(4), 418-420.

- Geisweid K., M. R.-L. (2012). Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic area. *Veterinary record*, 171(16), 399.
- Ginel P.J., C. S. (2008). Anti-histone antibodies in dogs with leishmaniasis and glomerulonephritis. *Research in Veterinary Science*, 85(3), 510-514.
- Giori L., T. F. (2011). High-resolution gel electrophoresis and sodium dodecyl sulphate-agarose gel electrophoresis on urine samples for qualitative analysis of proteinuria in dogs. *Journal of veterinary diagnostic investigation.*, 23(4), 682-690.
- Grauer F.G. (2005). Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. *Journal of Small Animal Practice*, 46(10), 469-478.
- Grauer G.F. (2007). Measurement, interpretation, and implications of proteinuria and albuminuria. *Veterinary clinics. Small animal practice.*, 37(2), 283-295.
- Grauer G.F. (2011). Proteinuria: measurement and interpretation. *Topical review*, 26(3), 121-127.
- Harley L. and Langston C. (2012). Proteinuria in dogs and cats. *CVJ*, 53(6), 631-638.
- Ikeda-Garcia F.A., L. R. (2007). Evaluation of renal and hepatic functions in dogs naturally infected by visceral leishmaniasis submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Research in Veterinary Science*, 83(1), 105-108.
- IRIS. (2007). *IRIS-international renal interest society*. Tratto da http://www.iris-kidney.com/pdf/IRIS2009_Staging_CKD.pdf
- Jacob F., P. D. (2005). Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *JAVMA*, 226(3), 393-400.
- Jeronimo S.M.B., d. Q. (2011). Cap.100: Leishmaniasis. In M. D. Richard L. Guerrant, *Tropical infectious disease: principles, pathogens and practice*. (Vol. Sezione II: Pathogens., p. 696-706). Saunders.
- Jha PK, V. M. (2012). Postrenal transplant laryngeal and visceral leishmaniasis - A case report and review of the literature. *Indian journal of nephrology*, 22(4), 301-304.
- Kawachi H., M. N. (2006). Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology.*, 11(4), 274-281.
- Kaye P. and Scott P. (2011). Leishmaniasis: complexity at the host pathogen interface. *Nature reviews-Microbiology*, 9, 604-615.
- Klosterman E.S. and Pressler B.M. (2011). Nephrotic syndrome in dogs: clinical features and evidence-based treatment considerations. *Topics in companion animal medicine*, 26(3), 135-142.

- Koutinas A.F., K. V. (1994). Canine Leishmaniasis-associated nephropathy: a clinical, clinicopathologic and pathologic study in 14 spontaneous cases with proteinuria. *Bullettin HVMS*, 45(2), 131-40.
- Koutinas A.F., Polizopoulou Z.S., S. a. (1999). Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996). *JAAHA*, 35(5), 376-382.
- Koutinas A.F., S. M. (2001). A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniasis. *Veterinary Parasitology*, 98(4), 247-261.
- Lachaud L., M.-H. S. (2004). Comparison of six PCR methods using peripheral blood for detection on canine visceral leishmaniasis. . *Journal of clinical microbiology*, 40(1), 210-5.
- Lan X., R. P. (2013). Morphine induces albuminuria by compromising podocyte integrity. *PLOS One*, 8(3), e55748.
- Laskay T., v. Z. (2003). Neutrophil granulocytes-trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. *TRENDS in Microbiology*, 11(5), 210-14.
- Laskay T., v. Z. (2003). Neutrophil granulocytes-trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. . *TRENDS in Microbiology*, 11(5), 210-14.
- Lees G.E., B. S. (2005). Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animal). *Journal of veterinary internal medicine.*, 19(3), 377-385.
- Liborio AB, R. N. (2012). Acute kidney injury in children with visceral leishmaniasis. *The pediatric infectious disease journal.*, 31(5), 451-454.
- Lima Verde F.A.A., L. V. (2007). Evaluation of renal function in human visceral leishmaniasis (kala-azar): a prospective study on 50 patients from Brazil. *Journal of Nephrology*, 20(4), 430-436.
- Lima Verde FAA, Lima Verde FA, D. L. (2009). Renal tubular dysfunction in human visceral leishmaniasis (Kala-azar). *Clinical Nephrology*, 71(5), 492-500.
- Lu H., K. G. (2012). Hypoxia decreases podocyte expression of slit diaphragm proteins. *International journal of nephrology and renovascular disease.*, 5, 101-107.
- Madalosso G., F. C. (2012). American visceral leishmaniasis: factors associated with lethality in the state of Sao Paulo, Brazil. *Journal of Tropical Medicine.*, 1-7.
- Maia C., N. M. (2010). Experimental canine leishmaniasis: clinical, parasitological and serological follow-up. *Acta tropica*, 116, 193-199.

- Manna L., R. S. (2008). Urine sampling for real-time polymerase chain reaction-based diagnosis of canine leishmaniasis. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(1), 64-67.
- Manna L., V. F. (2009). Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis. *The veterinary journal*, 182(3), 441-445.
- Marino G., G. G. (2012). Clinicopathological study of canine transmissible venereal tumour in leishmaniotic dogs. *Journal of Small Animal Practice*, 53, 323-327.
- McCall L.I., Z. W. (2013). Determinants for the development of visceral Leishmaniasis disease. *PLOS Pathogens*, 9(1), e1003053.
- Medical Book Online. (2012). *Medical Books Online*. Tratto da <http://www.cixip.com/index.php/page/content/id/442>
- Ministero della Salute. (2005, Marzo). *Linee guida per la valutazione di idoneità del donatore e protocolli specifici*. Tratto da Trapianti - sito ufficiale del Centro Nazionale Trapianti: http://www.trapianti.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1277_allegato.pdf
- Mirò G., O. G. (2009). Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Veterinary Dermatology*, 20(5-6), 397-404.
- Müller K, v. Z. (2001). Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Medical microbiology and immunology*, 190(1-2), 73-76.
- Murray H.W., F. K. (2005). Antagonizing deactivating cytokines to enhance host defense and chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. *Infection and immunity*, 73(7), 3903-11.
- Murray H.W., L. C. (2002). Interleukin-10 (IL-10) in experimental visceral Leishmaniasis and IL-10 receptor blockade as immunotherapy. *Infectious immunology*, 70(11), 6284-93.
- Murray H.W., M. A. (2003). Determinants of the response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. *Journal of infectious disease*, 188(3), 458-64.
- Nabity M.B. (2011). Urine protein and microalbuminuria. In B. J. D.J., *Nephrology and urology of small animals*. (p. 58-61). Wiley-Blackwell.
- Nangaku M. and Couser W.G. (2005). Mechanism of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Japanese Society of Nephrology*, 9(3), 183-191.
- Nangaku M. and Couser W.G. (2005). Mechanisms of immune-deposit formation and the mediation of immune renal injury. *Clin. Exp. Nephrol.*, 9(3), 183-191.

- Natalino Salgado Filho, T. M. (2003). Envolvimento da funcao renale m pacientes com leishmaniose visceral (calazar). *Revista da sociedade brasileira de medicina tropical.*, 36(2), 217-221.
- National Kidney Foundation. (2008). *Renal Fellow Network*. Tratto da <http://renalfellow.blogspot.it/2008/10/congenital-nephrotic-syndrome.html>
- Navid Ezra, M. T. (2010). Human immunodeficiency virus and leishmaniasis. *Journal of global infectious diseases*, 2(3), 248-257.
- Oliva G., R. X. (2010). Guidelines for treatment of leishmaniasis in dogs. *JAVMA*, 236(11), 1192-98.
- Oliveira MJC, S. J. (2010). Risk factor for Acute Kidney Injury in visceral leishmaniasis (Kala-Azar). *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 82(3), 449-453.
- Oliveira RA, L. C. (2012). Renal function evaluation in patients with american cutaneous leishmaniasis after specific treatment with pentavalent antimonial. *BMC nephrology*, 13, 44.
- Palacio J., L. F. (1997). Enzymuria as an index of renal damage in canine leishmaniasis. *Veterinary Record*, 140(18), 477-480.
- Paradies P., S. M. (2012). Minitoring the reverse to normal of clinico-pathological findings and the disease free interval time using four different treatment protocols for canine leishmaniasis in an endemic area. *Research in veterinary science*, 93(2), 843-847.
- Pasa S., T. S. (2005). Clinical and serogical follow-up in dgos with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Veterinary Parasitology*, 128(3-4), 243-249.
- Pennisi MG, D. M. (2005). Efficacy of the treatment of dogs with leishmaniosis with a combination of metronidazole and spiramycin. *Veterinary Record*, 156(11), 346-349.
- Perico N., C. I. (2005). Pathophysiology of disease progression in proteinuric nephropathies. *Kidney International* , 67(supplemento 94), s79-s82.
- Plevraki K., K. A. (2006). Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Journal of veterinary internal medicine*, 20(2), 228-233.
- Poli A., A. F. (1991). Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study. . *Neprhon.*, 57(4), 444-52.
- Prasad N, G. A. (2011). Cytomegalovirus and *Leishmania donovani* coinfection in a renal allograft recipient. *Indian journal of nephrology*, 21(2), 128-31.
- Proto W.R., C. G. (2013, Gennaio). Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? *Nature Review - Microbiology*, 11(1), 58-66.

- Reis A.B., M.-F. O.-C.-S.-O. (2006). Parasite density and impaired biochemical/hematological status are associated with severe clinical aspects of canine visceral leishmaniasis. *Research in Veterinary Science*, 81(1), 68-75.
- Richard J. Johnson, J. F. (2010). Introduction to glomerular disease: histologic classification and pathogenesis. In J. F. Richard J. Johnson, *Comprehensive clinical nephrology* (4^o edizione ed., p. 208-217). Saunders Elsevier.
- Rigo R.S., C. C. (2013, Marzo-Aprile). Renal histopathological findings in dogs with visceral leishmaniasis. *Res. Bras. Ci. Vet.*, 55(2), 113-116.
- Rocha NA, O. M. (2013). Comparative analysis of pediatric and adult visceral leishmaniasis in Brazil. *Pediatric Infectious Disease Journal*, 32(5), e182-e185.
- Romagnani P., L. L. (2013). Renal progenitors: an evolutionary conserved strategy for kidney regeneration. *Nature Review Nephrology*, 9(3), 137-46.
- Rougier S, V. I. (2008). Efficacy of different treatment regimens of marbofloxacin in canine visceral leishmaniasis: a pilot study. *Veterinary parasitology*, 153(3-4), 244-254.
- S., K. R. (2012). Immunobiology of visceral Leishmaniasis. *Frontiers in immunology*, 3(251), 1-10.
- Salgado Filho N., F. T. (2003). Envolvimento da funcao renal em pacientes com leishmaniose visceral (calazar). *Revista de sociedade brasileira de medicina tropical.*, 36(2), 217-221.
- Saridomichelakis M.N., X. P. (2013). Thyroid function in 36 dogs with leishmaniasis due to *Leishmania infantum* before and during treatment with allopurinol with or without meglumine antimoniate. *Veterinary parasitology*.
- Schaefer H., K. B. (2011). Quantitative and qualitative urine protein excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome. *Journal of veterinary internal medicine*, 25(6), 1292-1297.
- Sethi S. and Fervenza F.C. (2012). Membranoproliferative glomerulonephritis - A new look at an old entity. *The New England Journal of Medicine.*, 366(12), 1119-1131.
- Shaw A.S. and Miner J.H. (2001). CD2-associated protein and the kidney. *Current opinion in nephrology and hypertension.*, 10(1), 19-22.
- Silva L.C., C. R. (2013). Canine visceral Leishmaniasis as a systemic fibrotic disease. *International journal of experimental pathology*, Epub ahead of print, 1-8.
- Singh RK, P. H. (2006). Visceral leishmaniasis (kala-azar): challenges ahead. *The indian journal of medical research*, 123(3), 331-44.
- Soares M.J.V., M. J. (2009). Renal involvement in canine leishmaniasis: a morphological and immunohistochemical study. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, 61(4), 785-90.

- Solano-Gallego L., M. G. (2011). LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasite & Vectors*, 4, p. 86.
- Solano-Gallego L., R. A. (2003). Detection of anti-Leishmania immunoglobulin G antibodies in ruine specimens of dogs with Leishmaniasis. *Clinical and vaccine Immunology*, 10(5), 849-855.
- Stockham S.L. and Sott L.M. (2008). Urinary system. In S. S. L.M., *Foundamentals of veterinary clinical pathology*. (seconda ed., p. 415-494). Blackwell publishing.
- Tafari W.L., d. O. (2001). Canine visceral leishmaniosis: a remarkable histopathological picture of one case reported from Brazil. *Veterinary Parasitology*, 96(3), 203-212.
- The University of Utah , E. (2012). *The internet pathology laboratory for medical education*. Tratto da <http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL088.html>
- Toplu N. and Aydogan A. (2011). An immunoistochemical study in cases with usual and unusual clinicopathological findings of canine visceral leishmaniosis. *Parasit. Res.*, 109(4), 1051-1057.
- Torres M., B. M. (2011). Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *The veterinary journal*, 188(3), 346-351.
- Tryphonas L., Z. Z. (1977). Visceral Leishmaniasis in a dog: clinical, hematological and pathological observations. *Canadian Journal of Comparative Medicine*, 41(1), 1-17.
- Tvarijonavičiute A., C. J.-S.-M. (2012). Serum and urinary adiponectin in dogs with renal disease from leishmaniasis. *Veterinary Record*, 171(12), 297.
- University of Utah. (2013). *University of Utah - Health Sciences Library*. Tratto da <http://library.med.utah.edu/index.php>:
<http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL097.html>
- University of Utah. (2013). *University of Utah - Health Sciences Library*. Tratto da <http://library.med.utah.edu/index.php>:
<http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL091.html>
- University of Utah. (2013). *University of Utah - Health Sciences Library*. Tratto da <http://library.med.utah.edu/index.php>:
<http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL083.html>
- University of Utah. (2013). *University of Utah - Health Sciences Library*. Tratto da <http://library.med.utah.edu/index.php>:
<http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL082.html>
- University of Utah. (2013). *University of Utah - Health Sciences Library*. Tratto da <http://library.med.utah.edu/index.php>:
<http://library.med.utah.edu/WebPath/RENAHTML/RENAL102.html>

- Veroux M, C. D. (2010). Visceral leishmaniasis in the early post-transplant period after kidney transplantation: clinical features and therapeutic management. *Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society*, 12(5), 387-391.
- Virginia Commonwealth University. (2013, Maggio 1). *Departement of pathology - VCU Medical Center*. Tratto da http://www.pathology.vcu.edu/education/PathLab/pages/renalpath/rpsr/images/mgn_sr/mgn.html
- Wamsley H. and Alleman R. (2007). Complete urinalysis. In E. J. G.F., *BSAVA manual of canine and feline nephrology and urology* (seconda ed., p. 87-116). BSAVA.
- Weisinger J.R., P. A. (1978). Clinical and histological kidney involvement in human kala-azar. . *The American journal of tropical medicine and hygiene.*, 27(2), 357-59.
- Welsh G.I. and Saleem M.A. (2012). The podocyte cytoskeleton - key to a functioning glomerulus in health and disease. *Nature Review Nephrology*, 8, 14-21.
- WHO. (s.d.). Tratto da http://www.who.int/leishmaniasis/leishmaniasis_maps/en/index.html;
- WHO. (2012). Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update. Ginevra.
- Zatelli A., B. M. (2003). Glomerular lesions in dogs infected with Leishmania organisms. *AJVR*, 64(5), 558-561.
- Zatelli A., Paltrinieri S., N. (2010). Evaluation of a ruine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *American Journal of Veterinary Research.*, 71(2), 235-240.
- Zhang A. and Huang S. (2012). Progress in pathogenesis of proteinuria. *International journal of nephrology.*, epub, 1-12.
- Zhang J., P. J.-H. (2012). Retinoids Augment the Expression of Podocyte Proteins by Glomerular Parietal Epithelial Cells in Experimental Glomerular Disease. *Nephron. Experimental nephrology.*, 121(1-2), e23-e37.