

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE CLINICHE VETERINARIE
Ciclo XXV**

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4

Settore Scientifico disciplinare: Vet08

**METODI DI MISURAZIONE E IMPLICAZIONI
DELL'ALBUMINURIA E DELLA PROTEINURIA
NEL CANE**

Presentata da: Dott.ssa Luisa Conti

Coordinatore del Dottorato

Relatore

Chiar.mo Prof. Paolo Famigli Bergamini

Dott. Francesco Dondi

Esame finale anno 2013

SOMMARIO

Introduzione

PARTE COMPILATIVA pag.1

CAPITOLO I : Proteinuria pag. 2

1.1 Fisiopatologia, eziologia e classificazione della proteinuria pag. 2

1.2 Riscontri clinici e clinicopatologici pag. 13

1.3 Approccio diagnostico pag. 16

1.4 Metodi di misurazione e implicazioni cliniche pag. 17

CAPITOLO II: Albuminuria pag. 34

2.1 Fisiopatologia, eziologia e meccanismi dell'albuminuria pag. 34

2.2 Importanza clinica dell'albuminuria pag. 47

2.3 Metodi di misurazione e implicazioni cliniche pag. 55

dell'albuminuria

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO III: Obiettivi pag. 65

Obiettivi pag. 65

CAPITOLO IV: Materiali e Metodi	pag. 67
4.1 Selezione dei Soggetti e Criteri di inclusione ed esclusione	pag. 67
4.2 Categorie diagnostiche	pag. 68
4.3 Gruppo di controllo	pag. 69
4.4 Gruppo di Studio durante il periodo di Tesi	pag. 69
4.5 Metodo di prelievo, processazione e stoccaggio dei campioni	pag. 69
4.6 Determinazioni specialistiche	pag. 71
4.7 Analisi statistica	pag. 76
CAPITOLO V: Risultati	pag. 77
5.1 Intervalli di riferimento	pag. 77
5.2 Popolazione selezionata per lo studio	pag. 78
CAPITOLO VI: Discussione	pag. 105
Discussione	pag. 105
<i>Appendice I</i>	pag. 113
<i>Appendice II</i>	pag. 114
BIBLIOGRAFIA	pag. 117

Ai miei genitori

*“Educare l’anima: insegnare all’anima a trasformare la sua
invidia in ammirazione”*

INTRODUZIONE

La proteinuria è un marker di danno renale nel cane. Il dipstick e il rapporto proteine urinarie-creatinina urinaria (UPC) sono i metodi di misurazione utilizzati più frequentemente nella pratica clinica per diagnosticare e per monitorare i pazienti proteinurici. In medicina umana, il rapporto albumina urinaria-creatinina urinaria (UAC) è il *gold standard* per la diagnosi precoce di malattia renale. L'albuminuria, inoltre, è associata alla progressione della malattia renale cronica (CKD) e alla mortalità.

L'obiettivo dello studio è di valutare la capacità del dipstick urinario e dell'UPC di diagnosticare precocemente l'albuminuria nel cane. Sono stati raccolti 868 campioni di urina, con sedimento spento e assenza di ematuria, tra Gennaio 2002 e Dicembre 2012 nell'Ospedale Didattico Veterinario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna. Per 550 campioni è stata effettuata l'analisi delle urine, la misurazione dell'UPC e dell'UAC, mentre UPC e UAC sono stati misurati in tutti gli 868 campioni. I campioni di urina sono stati analizzati con il metodo dipstick mediante lettura automatizzata. Utilizzando come valore di riferimento l'UAC ottenuta con metodo immunotubidimetrico, è stata valutata l'accuratezza diagnostica del dipstick urinario e dell'UPC ottenuto con rosso di pirogallolo. L'intervallo di riferimento dell'UAC (0-0,024) è stato determinato utilizzando 60 cani sani. I dati raccolti sono stati classificati utilizzando differenti *cut-off* per il peso specifico urinario (1012 o 1030), per la proteinuria al dipstick (30 o 100 mg/dl), per l'UPC (0,2) e per l'UAC (0,024). Sono stati valutati l'*agreement* diagnostico (coefficiente K di Cohen) e la correlazione di Spearman tra dipstick, UPC e UAC. È stata stimata l'accuratezza diagnostica misurando l'area al di sotto della curva di ROC nell'analisi dell'UAC. Il livello di significatività è stato definito per $p < 0,05$.

Indipendentemente dal peso specifico urinario, l'*agreement* diagnostico tra dipstick, UPC e UAC è risultato forte ($k=0,62$ e $k=0,61$, rispettivamente; $p<0,001$) con valori di dipstick ≥ 30 mg/dl, debole ($k=0,27$ e $k=0,26$, rispettivamente; $p<0,001$) con valori di dipstick ≥ 100 mg/dl. L'accuratezza diagnostica del dipstick messa a confronto con UPC e con UAC è molto buona (AUC 0,84 e 0,84, rispettivamente; $p<0,001$) e i risultati negativi al dipstick presentano il 100% di sensitività. UPC e UAC sono fortemente correlate ($r=0,90$;

$p < 0,001$). Mettendo a confronto UPC e UAC, l'accuratezza diagnostica è risultata eccellente (AUC 0,94; $p < 0,001$), con massima sensibilità e specificità per $UPC \geq 0.3$.

In conclusione, il risultato positivo del dipstick (≥ 30 mg/dl) è indicativo della presenza di albumine urinarie in quantità superiori all'intervallo di riferimento ed è quindi consigliato quantificare la proteinuria anche mediante UPC e UAC. I campioni con dipstick negativo, invece, è improbabile che siano proteinurici o albuminurici. Infine, l'UPC può essere utilizzato per valutare precocemente cani albuminurici con danno renale utilizzando un valore soglia inferiore a 0.5. Sono necessari ulteriori studi per definire l'utilizzo nella pratica clinica veterinaria dell'UAC.

INTRODUCTION

Proteinuria is considered a marker of kidney damage in dogs and urine dipstick test and urinary protein to creatinine ratio (UPC) are commonly used to diagnose and monitor proteinuric patients in the clinical practice. In humans, the urinary albumin to creatinine ratio (UAC) represents the *gold standard* method for the early renal disease detection. Moreover, albuminuria is associated to chronic kidney disease (CKD) progression and mortality.

The aim of the study was to evaluate the ability of a urine dipstick test and UPC to early recognize albuminuric dogs. 868 canine urine samples without active sediment and macroscopic hematuria were collected from January 2002 to December 2012 in our Teaching Hospital. Urinalysis, UPC and UAC were available for 550 samples, while UPC and UAC were performed in 868 specimens. Urine samples were dipstick tested, using an automated reader. Considering UAC (immunoturbidimetric assay) as the reference method, the diagnostic accuracy of dipstick test and UPC (pyrogallol red- molybdate) was evaluated. UAC reference interval (0-0.024) was determined from 60 healthy dogs. Data collected were categorized using different cut-offs for urine specific gravity (1012 or 1030), dipstick proteinuria (30 or 100 mg/dl), UPC (0.2) and UAC (0.024). Diagnostic agreement (Cohen's *k* coefficient) and Spearman's correlation between dipstick, UPC and UAC were evaluated. The diagnostic accuracy was estimated with the area under the ROC curve (AUC) analysis. Significance level was set at $p < 0.05$.

Independently of urine concentration, diagnostic agreement between dipstick and UPC or UAC was substantial ($k=0.62$ and $k=0.61$, respectively; $p<0,001$) with positive dipstick results ≥ 30 mg/dl, and was fair ($k=0.27$ and $k=0.26$, respectively; $p<0,001$) with positive dipstick results ≥ 100 mg/dl. Diagnostic accuracy of dipstick compared to UPC and UAC was very good (AUC 0.84 and 0.84, respectively; $p<0,001$) and negative dipstick results presented 100% sensitivity. UPC and UAC were highly correlated ($r=0,90$; $p<0,001$). Comparing UPC with UAC, diagnostic accuracy was excellent (AUC 0.94; $p<0,001$), with maximum sensitivity and specificity for UPC ≥ 0.3 .

In conclusion, for any urine density positive dipstick results (≥ 30 mg/dl) probably detect albuminuria outside the reference interval, and UPC or UAC should be assessed. In

contrast, samples with negative dipstick results are unlikely to be proteinuric or albuminuric. Furthermore, UPC could be used to detect albuminuric canine patients with an early kidney damage using thresholds lower than 0.5. Further studies are required to clarify the usefulness of UAC in the veterinary clinical practice.

PARTE COMPILATIVA

CAPITOLO I

Proteinuria

1.1 Fisiopatologia, eziologia e classificazione della proteinuria

La proteinuria indica la presenza di proteine nelle urine, condizione secondaria a numerosi processi fisiologici e patologici (Grauer 2007). La proteina maggiormente rappresentata nelle urine è l'albumina. La proteinuria può essere di origine renale, pre-renale e post-renale. Nel contesto della proteinuria renale, questa può essere secondaria a alterazioni glomerulari e tubulari ed è sempre necessario documentarne la presenza e la persistenza mediante misurazioni specifiche (Grauer 2011).

La principale funzione del rene consiste nella ritenzione selettiva ed eliminazione di acqua, elettroliti e altri soluti mediante tre principali processi: filtrazione glomerulare del sangue circolante per formare l'ultrafiltrato plasmatico nello spazio di Bowman, riassorbimento selettivo dell'ultrafiltrato attraverso le cellule tubulari e secrezione selettiva (Menon et al 2012).

Il processo di formazione delle urine ha inizio con la produzione dell'ultrafiltrato plasmatico. L'ultrafiltrazione glomerulare viene effettuata attraverso l'endotelio fenestrato, la membrana basale e i podociti della capsula di Bowman. Il corpo cellulare dei podociti prende contatto con la membrana basale solo con i processi pediformi citoplasmatici. Le cellule mesangiali, che riempiono gli spazi tra i capillari, hanno proprietà contrattili e sono, quindi, capaci di modificare l'area di superficie capillare disponibile per la filtrazione (Menon et al 2012; Radoi 2012; Sjaastad et al 2010).

La filtrazione dipende soprattutto dalle dimensioni e dalla forma dei soluti e, in misura minore, dalla loro carica. Molecole di dimensioni superiori ai 4 nm non vengono filtrate. La filtrazione avviene per molecole con diametro inferiore ai 2 nm. Le fenestrazioni tra le

cellule endoteliali hanno un diametro variabile tra i 50 e i 100 nm e la distanza tra i pedicelli dei podociti (*filtration slits*) ha un diametro variabile tra i 25 e i 50 nm ed è riempita da diaframmi (*slit diaphragms*) caratterizzati da piccoli pori (**Figura 1**). I diaframmi costituiscono la principale barriera di filtrazione cui contribuiscono anche l'endotelio e la membrana basale. Inoltre, i podociti e le cellule endoteliali sono rivestiti da glicocalici composti da glicoproteine, glicosaminoglicani e proteoglicani carichi negativamente, mentre la membrana basale è ricca di proteoglicano eparan solfato. La concentrazione elevata di cariche negative riduce ulteriormente la filtrazione di ioni di grandi dimensioni carichi negativamente, soprattutto di proteine. (**Figura 2**). Le albumine, infatti, nonostante il loro diametro di 3,6 nm che dovrebbe consentire loro di essere filtrate, normalmente vengono trattenute dal glomerulo (Tryggvason et al 2001; Clarkson et al 2011; Stockhame e Scott 2008).

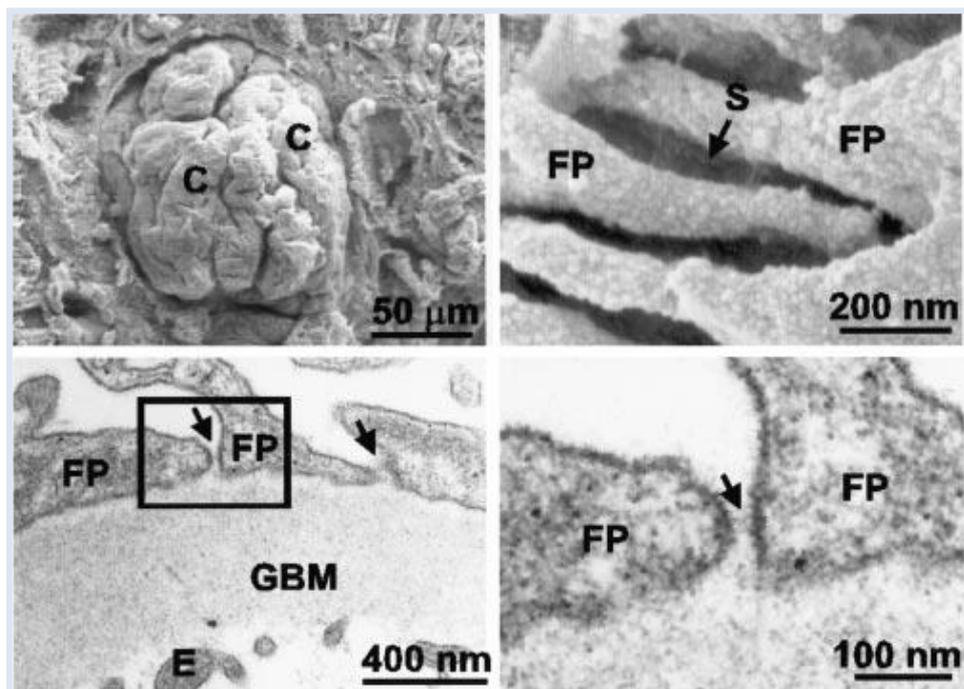


Figura 1: barriera di filtrazione glomerulare. (a) Scansione al microscopio elettronico di glomeruli umani. Si osservano strutture sferiche formate dai capillari glomerulari (C) dopo asportazione della capsula di Bowman. (b) Sulla superficie capillare si evidenziano i *filtration slits* (S) tra i processi podocitari (FP). (c) Microscopio a trasmissione elettronica a livello della parete dei capillari glomerulari caratterizzata da tre strati: cellule endoteliali (E), membrana basale glomerulare (GBM), processi podocitari (FP). Freccia, *filtration slits*. (d) ingrandimento di (c). Freccia *slit diaphragm* tra i processi podocitari (FP) (Tryggvason et al 2001)

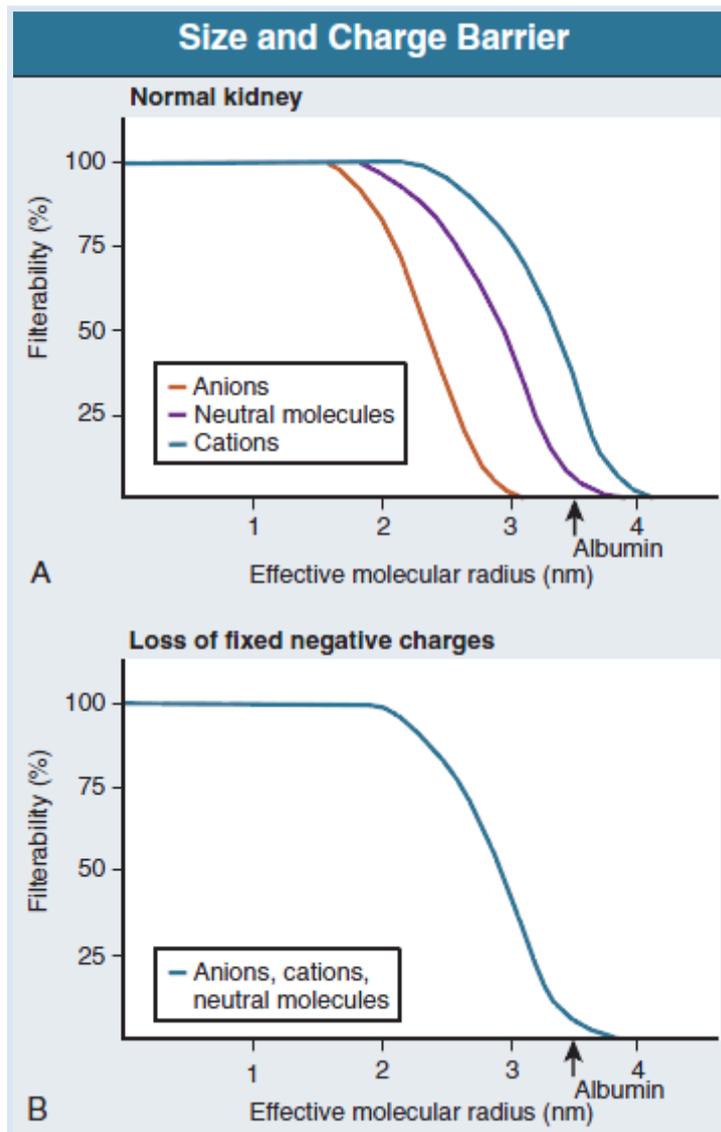


Figura 2: dimensione e carica della barriera di filtrazione glomerulare e loro effetti sulla filtrazione. A, rene normale. B, perdita delle cariche negative. Un 100% di filtrabilità indica che le sostanze vengono filtrate liberamente, quindi la loro concentrazione nello spazio di Bowman è uguale a quella del plasma dei capillari glomerulari. Per le molecole e i piccoli ioni (es. Na^+ , Cl^-), la carica non ha effetto sulla loro filtrazione; per ioni che hanno un raggio maggiore a 1.6 nm, gli anioni vengono filtrati meno facilmente rispetto ai cationi e alle molecole neutre. Viene, quindi, normalmente filtrato un quantitativo minimo di albumine (anioni). Se le cariche negative della membrana basale glomerulare vengono perse, la dimensione delle molecole non è in grado di limitare a lungo tempo la filtrazione, così viene filtrata una quantità più significativa di albumine (Comprehensive Clinical Nephrology; Fourth edition, 2010).

L'insieme dei meccanismi regolatori della permeabilità glomerulare alle molecole in relazione alla loro dimensione, alla loro carica e alla loro forma molecolare, viene definita Permeabilità. Il filtrato plasmatico attraversa prima le fenestrature dell'endotelio, che trattiene i globuli rossi, poi la membrana basale, che trattiene le proteine di grosse dimensioni e, infine, lo *slit diaphragms*, che impedisce il passaggio dell'albumina e delle proteine di dimensioni superiori all'albumina (Tryggvason et al 2001; Tojo et al 2008).

La membrana basale glomerulare è il primo sito di selezione del passaggio di molecole attraverso il glomerulo e contiene collagene tipo IV, laminina, nidogeno e proteoglicani. Il collagene tipo IV è una proteina membrana basale specifica, della quale si conoscono sei tipi genetici: $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$; nella vita intrauterina, la membrana basale glomerulare contiene collagene tipo IV $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, mentre, dopo la nascita, viene sostituito da collagene tipo IV $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ caratterizzato da una quantità maggiore di cisteina, che dà più resistenza alla membrana basale glomerulare. Difetti del collagene tipo IV sono caratteristici della sindrome di Alport descritta in medicina umana (Tryggvason et al 2001; Meno et al 2012; Adàmiz-Eschevarria 2012; Aldàmiz-Eschevarria et al 2012).

La laminina è un'altra componente della membrana basale. Questa proteina è importante nella differenziazione e nell'adesione cellulare, ma contribuisce anche alla formazione della struttura della membrana basale. Nella vita intrauterina, si riscontra l'isoforma laminina-10 ($\alpha 5$, $\beta 1$, $\gamma 1$) mentre, dopo la nascita, si riscontra la laminina-11 ($\alpha 5$, $\beta 2$, $\gamma 1$) (Tryggvason et al 2001). Il ruolo di queste isoforme di laminina è tuttora sconosciuto, ma alcuni studi hanno dimostrato che topi knockout per l'isoforma $\beta 2$ della laminina sviluppano sindrome nefrosica (Shih NY et al 1999). La laminina 11, quindi, ha un importante ruolo nel mantenere una normale filtrazione glomerulare (Tryggvason et al 2001; Vaden et al 2011).

Il perlecano e l'agrina sono i proteoglicani maggiormente presenti nella membrana basale glomerulare. Sono entrambi ricchi di eparan solfato carico negativamente che contribuisce alla formazione della barriera elettrica nei confronti delle macromolecole plasmatiche cariche negativamente. Una carenza di eparan solfato, quindi, può essere associata a proteinuria, ma non è ancora stato chiarito del tutto il ruolo di tale proteoglicano nella barriera di filtrazione glomerulare. Sicuramente i glicosaminoglicani ricchi di eparan solfato sono il principale sito anionico per la selettività di carica della membrana glomerulare (Tryggvason et al 2001).

L'ultimo sito di selezione di filtrazione molecolare è lo *slit diaphragm*, caratterizzato da una struttura proteica tridimensionale con molti ponti che si incrociano tra di loro a formare una simil cerniera tra i processi podocitari (**Figura 3**). La distanza tra i pedicelli è di 39 nm e i pori contenuti nel diaframma hanno dimensioni di 4 X 14 nm. Lo slit diaphragm ha un ruolo importante nella filtrazione proteica. La perdita di nefrina, molecola presente esclusivamente nello slit diaphragm, determina sindrome nefrosica in topi *knockout* per il gene che codifica per la nefrina (**Figura 4**) (Simon et al 2008; Tryggvason et al 2001; Lan et al 2013).

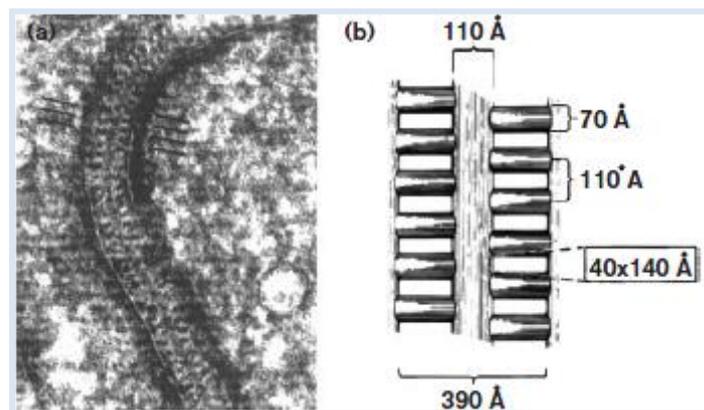


Figura 3: visione in sezione longitudinale e modello strutturale dello *slit diaphragm*. (a) Microscopio elettronico che mostra la cerniera tra i processi podocitari di un glomerulo di ratto. (b) Modello strutturale dei pori dello *slit diaphragm*. Filamenti centrali (110 Å) e ponti incrociati (70 Å) che delimitano i pori di 40 x 140 Å (Tryggvason et al 2001).

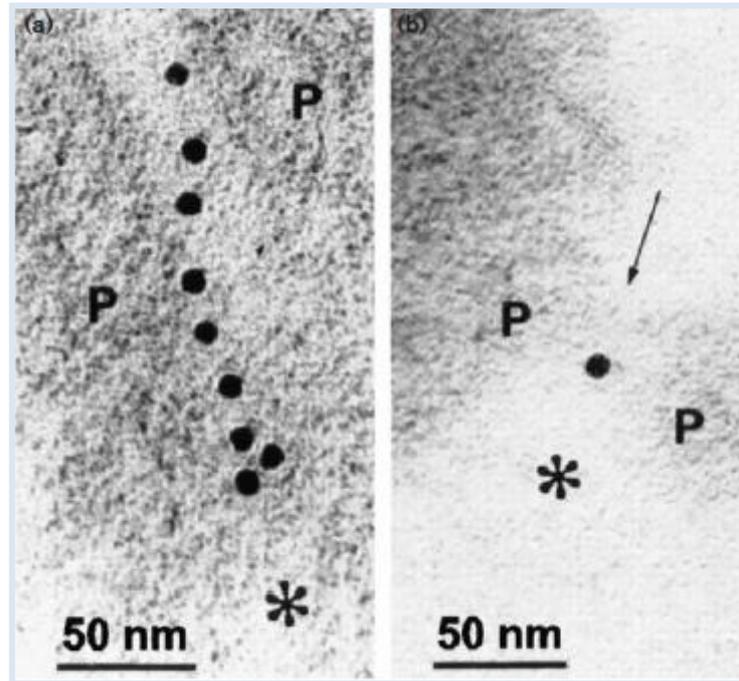


Figura 4: localizzazione della nefrina nei glomeruli umani con microscopio elettronico. (a) *slit diaphragm* osservato parallelamente. I punti neri evidenziano la nefrina localizzata lungo lo *slit diaphragm* tra i processi podocitari (P). Asterisco, membrana basale glomerulare. (b) sezione trasversale della *filtration slit*. Freccia, nefrina nello *slit diaphragm* tra i podociti (P) e sopra alla membrana basale glomerulare (asterisco) (Tryggvason et al 2001).

Anche la proteina CD2, costituente dello slit diaphragm, ha un ruolo importante nella filtrazione glomerulare: topi *knockout* per il gene che codifica per la proteina CD2 sviluppano proteinuria. L'actina e la podocina, costituenti dei processi podocitari, sono proteine coinvolte nella filtrazione glomerulare, ma la loro funzione specifica è tuttora sconosciuta (**Figura 5**) (Tryggvason et al 2001; Meno et al 2012; Zhang et al 2012).

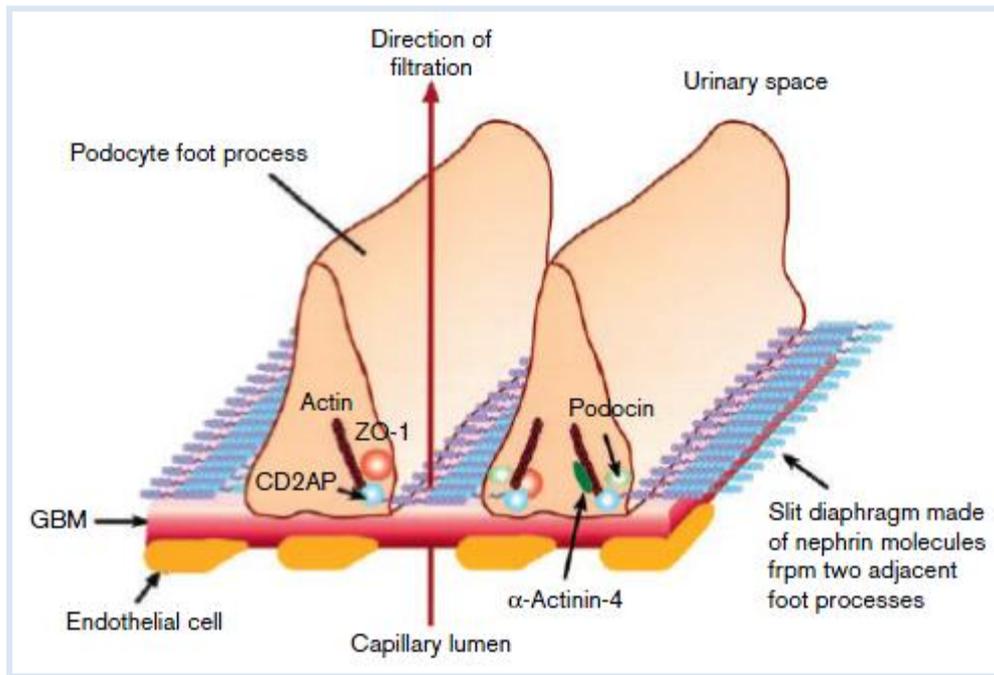


Figura 5: modello molecolare della barriera di filtrazione glomerulare. I tre strati della barriera di filtrazione glomerulare sono le cellule endoteliali fenestrate, la membrana basale glomerulare (GBM) e i processi podocitari tra i quali si trova lo *slit diaphragm*. Lo *slit diaphragm* è un filtro poroso costituito da molecole di nephrina localizzato tra due processi podocitari. All'interno della cellula, la nephrina interagisce con la proteina CD2 associata (CD2AP) e con la Podocina, con la zona *occludens-1* (ZO-1) e con molte altre proteine ancora sconosciute che si legano a loro volta all'actina. L' α -actina-4 stabilizza la struttura del citoscheletro podocitario. Mutazioni della nephrina, della CD2AP o della podocina determinano proteinuria e sindrome nefrosica, mentre mutazioni dell'actina-4 determinano glomerulosclerosi focale segmentale (Tryggvason et al 2001).

Fisiologicamente sono poche le proteine che passano la barriera glomerulare. Nell'ultrafiltrato contenuto nella capsula di Bowmann si riscontrano, infatti, solo proteine a basso peso molecolare, ovvero inferiore a 60 kD, come la *Vitamin-D Binding Protein* (DBP) o il *Free-Retinol Binding Protein* (RBP). L'albumina, solo parzialmente filtrata, si riscontra nell'ultrafiltrato glomerulare in quantità variabile tra 1 e 50 $\mu\text{g}/\text{ml}^2$. Passano attraverso la barriera glomerulare anche la Transferrina (pm 81 kD) e l'Apolipoproteina A1. Nell'ultrafiltrato glomerulare si riscontrano, inoltre, la Vitamina D, la Vitamina A, la Vitamina B12 e il ferro (Christensen et al 2009; Amsellem et al 2010; Raghu et al 2004; Raila et al 2003; Raila et al 2005).

L'albumina viene parzialmente riassorbita con un meccanismo di endocitosi dalle cellule del tubulo contorto prossimale grazie all'attività recettoriale della megalina, della cubilina e dell'amnionless: la concentrazione urinaria dell'albumina, infatti, è inferiore a 1 mg/dl.

La megalina e cubilina legano le albumine filtrate con il loro dominio extracellulare e le trasportano ai lisosomi delle cellule tubulari. Le proteasi lisosomiali degradano i componenti proteici e i prodotti della degradazione vengono utilizzati dalla stessa cellula tubulare oppure riversati in circolo. Megalina e cubilina legano anche le vitamine e gli oligoelementi filtrati dal glomerulo. L'amnionless è una molecola recettoriale necessaria per il corretto funzionamento della cubilina (Christensen et al 2009; Amsellem et al 2010; Syme et al 2011).

In corso di proteinuria glomerulare, caratterizzata dalla filtrazione sia di proteine, che normalmente passano la barriera glomerulare, sia di proteine, che fisiologicamente non vengono filtrate, il massivo riassorbimento di proteine da parte delle cellule tubulari è causa di danno tubulare con aggravamento del danno renale. La proteinuria glomerulare determina, infatti, la sintesi da parte delle cellule del tubulo contorto prossimale di Endotelina-1 (ET-1), che stimola la produzione di matrice extracellulare, una aumentata produzione di proteina-1 monocitica chemotattica (MCP-1) e di RANTES e una aumentata espressione e produzione di IL-8, potente agente chemotattico nei confronti di linfociti e macrofagi. Anche gli acidi grassi liberi legati all'albumina determinano a livello tubulare un'aumentata espressione di chemochine pro infiammatorie (Abbate et al 2006; Zoja et al 2006; Erkan 2012; Floege et al 2010; Grauer 2009; Littman 2011).

La proteinuria tubulare, invece, è caratterizzata da difetti molecolari, a carico del tubulo contorto prossimale, che determinano un mancato riassorbimento delle proteine filtrate dal glomerulo. La proteinuria, causata da una eccessiva filtrazione glomerulare di proteine, può essere secondaria a mieloma multiplo, a mioglobinuria e ad amiloidosi ed è caratterizzata dalla saturazione dei recettori tubulari. In questi casi, la proteinuria si definisce come persistente (Christensen et al 2009; Amsellem et al 2010; Cantaluppi et al 2012). La proteinuria può anche essere transitoria, quindi reversibile, perché secondaria a patologie infiammatorie, stress, febbre e intensa attività fisica.

Tradizionalmente la proteinuria viene classificata in tre categorie: pre-renale, renale e post-renale. Ognuna di queste categorie ha delle cause specifiche nel cane e nel gatto riassunte in **Tabella 1 e 2** (Harley et al 2012).

Tabella 1: Patologie implicate nello sviluppo di proteinuria.

	Cane	Gatto
Pre-renale	Mieloma Multiplo Ipertensione Sistemica Reazioni ai Farmaci Pancreatite Acuta Ipertiroidismo Iperadrenocorticismo (convulsioni, colpo di calore, febbre, esercizio, congestioni, insufficienza cardiaca) ^a	Mieloma Multiplo Ipertensione Sistemica Reazioni ai Farmaci Pancreatite Acuta Ipertiroidismo Iperadrenocorticismo (convulsioni, colpo di calore, febbre, esercizio, congestioni, insufficienza cardiaca) ^a
Renale	Insufficienza Renale Acuta Insufficienza Renale Cronica Glomerulopatie (vedi tabella 2) Pancreatiti acute Malattie virali Reazioni ai farmaci Ipertensione sistemica Diabete mellito Ipertiroidismo Iperadrenocorticismo Endocarditi Corticosteroidi Qualsiasi processo infiammatorio, neoplasia o malattia immunomediata	Insufficienza Renale Acuta Insufficienza Renale Cronica Glomerulopatie (vedi tabella 2) Pancreatiti acute Malattie virali Reazioni ai farmaci Ipertensione sistemica Diabete mellito Ipertiroidismo Iperadrenocorticismo Malattie immunomEDIATE LES Anemia emolitica immunomediata Malattie da zecca Leptosirosi Endocarditi Filariosi Corticosteroidi Qualsiasi processo infiammatorio; (IBD, cute, denti), neoplasia, malattie infettive e immunomEDIATE
Post-renale	Patologie delle vie urinarie inferiori Patologie dell'apparato genitale	Patologie delle vie urinarie inferiori Patologie dell'apparato genitale

^a: dati di *Medicina Umana*.

Da *L. Harley et al. 2012 (Modificato)* e *Chew D. et al., 2011^b*

Tabella 2: Patologie glomerulari nel cane e nel gatto

Glomerulopatia	Possibili Cause	Razze Predisposte
Glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN)	Infezioni da morso di artropodi: <i>Borreliosi di Lyme</i> <i>Babesiosi</i> <i>RMSF</i> <i>Ehrlichiosi</i> <i>Hepatozoonosi</i> <i>Leishmaniosi</i> Malattie Virali: <i>Adenovirus Canino 1</i> <i>FIP</i> <i>FeLV</i> <i>FIV</i> <i>Leptospirosi</i> Malattie Parassitarie: <i>Dirofilariosi</i> <i>Trypanosomiasi</i> <i>Schistosomiasi</i> Neoplasia	Segugio Americano (secondaria a Leishmaniosi) Bernese (carattere recessivo) Epagneul Breton (carenza complemento) Doberman pinscher (Sulfamidici) Labrador retriever, Pastore Shetland e Golden retriever (associata a <i>Borrelia burgdorferi</i>)
Nefropatia Membranosa (MN)		Doberman pinscher
Glomerulonefrite mesangio proliferativa (PGN)	Patologie Gastrointestinali Allergie LES Infezioni Batteriche	Soft-coated wheaten terrier (SCWT)
Amiloidosi		Collie Segugio inglese Treeing Walker coonhound Familiare in: Shar pei Abissino Siamese
Glomerulosclerosi	Ipertensione Corticosteroidi Iperadrenocortismo Età	Terranova
Minimal change disease (MCD)	Ehrlichiosi Reazioni ai farmaci	Pastore tedesco (secondaria a <i>Ehrlichia canis</i>)
Glomerulosclerosi Focale Segmentale (FSGS)		Bullmastiff Soft-coated wheaten terrier (SCWT)
Sindrome di Alport (nefrite ereditaria inclusa la nefrite X-linked)		Bull terrier Dalmata Samoiedo
Altre glomerulopatie o nefropatie ereditarie (glomerulopatie primarie)		Basenji Beagle Boxer Cocker spaniel Greyhound (associate a vasculiti e lesioni cutanee) Doberman pinscher Segugio norvegese Pembroke Welsh corgi Rottweiler Samoiedo
Displasia Renale Giovanile		Alaskan malamute Beagle Bernese Border terrier Boxer Bull mastiff Cairn terrier Cocker spaniel Dalmata Doberman Dogue de Bordeaux Kookier Segugio finlandese Golden retriever Gordon setter Segugio irlandese Lhasa Apso Schnauzer nano Terranova Pembroke Welsh corgi Rhodesian ridgeback Rottweiler Samoiedo Shih tzu SCWT Barboncino Weimaraner

modificato da L. Harley et al., 2012.

La proteinuria pre-renale è caratterizzata da proteinuria lieve, secondaria ad un'aumentata filtrazione di proteine a basso peso molecolare quali emoglobina, immunoglobuline a catene leggere, mioglobina e dimeri, in quantità tali da superare la capacità di riassorbimento del tubulo contorto prossimale (Harley et al 2012).

La proteinuria renale comprende sia la proteinuria fisiologica che quella patologica e può essere classificata in relazione al tipo di proteine che si riscontrano nelle urine (**Tabella 3**). La proteinuria patologica è la causa più importante di proteinuria persistente ed è secondaria ad alterazioni della barriera di filtrazione glomerulare e/o del riassorbimento tubulare (sindrome di Fanconi) con danno interstiziale secondario. Alti livelli di proteine nelle urine (UPC>2) sono frequentemente secondari ad alterazioni nella barriera di filtrazione glomerulare, anche se la presenza di proteinuria di minore entità non può escludere un danno glomerulare primario. Le patologie glomerulari nel cane e nel gatto comprendono glomerulonefrite membranoproliferativa (MPGN), nefropatia membranosa (MN), che vede come razza predisposta il Doberman Pinscher, glomerulonefrite mesangioproliferativa (PGN), amiloidosi, glomeruloscerosi, *Minimal Change Disease* (MCD), glomeruloscerosi focale segmentale (FSGS), *Alport's like syndrome*, glomerulopatie ereditarie o glomerulopatie primarie e displasia renale. Il danno interstiziale è caratterizzato da infiammazione secondaria a patologie quali leptospirosi, pielonefriti, neoplasie renali e nefrolitiasi. La proteinuria fisiologica è caratterizzata da proteinuria lieve e transitoria. Nel cane e nel gatto ci sono pochi studi che definiscano la cause di proteinuria transitoria. Studi datati evidenziano come possibili cause l'esercizio fisico eccessivo e lo stress. Una volta eliminata la causa sottostante, la proteinuria fisiologica si risolve spontaneamente (Harley et al 2012; Umbreit et al 2000; Abbate et al 2006; Bello et al 2010; Cortadellas et al 2008; Mason et al 2010; Eckersall et al 2010; Karlsson et al 2012; Mastrorilli et al 2007; Monti et al 2012).

Tabella 3: Criteri di classificazione della proteinuria

	Albumina	A-1-M	IgG	Trf
Proteinuria fisiologica	normale	normale	normale	normale
Microalbuminuria	elevata	normale	normale	normale
Proteinuria glomerulare selettiva	elevata	normale	normale	elevata
Proteinuria glomerulare non selettiva	elevata	normale	elevata	elevata
Proteinuria tubulare	normale	elevata	normale	normale
Proteinuria mista	elevata	elevata	elevata	elevata
Altro	elevata	elevata/ normale	elevata/ normale	elevata/ normale

Modificata da Umbreit et al, 2000

La proteinuria post-renale è caratterizzata dalla deposizione nelle urine di proteine provenienti da ureteri, vescica e uretra. E' causata da infiammazioni, infezioni delle vie urinarie, emorragie e infezioni a carico dell'apparato genitale (proteinuria post-renale extrarenale). La proteinuria post-renale è definita transitoria, perché scompare quando viene risolta la causa sottostante (Harley et al 2012).

1.2 Riscontri clinici e clinicopatologici

I segni clinici, che si evidenziano nei pazienti proteinurici, dipendono dal grado di proteinuria, dalla persistenza della proteinuria e dalla patologia che ha determinato il danno renale. Per questi motivi, una corretta valutazione della funzionalità renale e della storia clinica del paziente sono di aiuto nell'interpretazione delle alterazioni cliniche. Nel cane i

segni clinici più gravi si riscontrano in corso di glomerulopatie che determinano proteinuria grave, mentre le proteinurie di grado lieve hanno un significato prevalentemente prognostico.

Le glomerulopatie possono manifestarsi con segni clinici aspecifici, quali disoressia/anoressia, calo ponderale, depressione del sensorio, vomito saltuario, pelo opaco e presenza di forfora. Si possono anche riscontrare segni clinici compatibili con malattia renale cronica, quali poliuria/polidipsia, alitosi, ulcere buccali, melena, pallore delle mucose, segni di disidratazione. Saltuariamente si osservano segni clinici compatibili con danno renale acuto, quali oliguria/anuria. All'esame fisico diretto, la palpazione renale può evidenziare la presenza di reni piccoli e duri con superficie irregolare come in corso di malattia renale cronica oppure reni di dimensioni normali o aumentate come in corso di alcune patologie glomerulari (Tvarijonaviciute et al 2013).

Alcune importanti conseguenze cliniche della proteinuria possono essere gli edemi, l'ipertensione sistemica e le conseguenze delle complicazioni trombo emboliche.

Gli edemi sono caratterizzati dall'accumulo di fluidi nelle cavità corporee oppure nell'interstizio e sono la conseguenza di una grave perdita proteica, cui segue un aumento della pressione idrostatica intravascolare e un aumento della permeabilità vascolare. Sono stati ipotizzati tre possibili meccanismi eziopatogenetici della formazione di edemi. La *underfill hypotesis*, per cui il calo della pressione oncotica determina la fuoriuscita di fluidi nel terzo spazio ad una velocità superiore rispetto alla capacità di riassorbimento da parte dei vasi linfatici: ciò esita in ipovolemia e in ipotensione, che stimola il sistema renina angiotensina aldosterone ad aumentare il riassorbimento di sodio e acqua nelle parti distali del nefrone. L'*overflow hypotesis*, per cui l'eccessivo riassorbimento di sodio, principale causa di ritenzione di fluidi, è causato da una aumentata attività dei canali del sodio nei dotti collettori indotta dalla proteinuria. La *vascular hyperpermeability hypotesis*, per cui si osserva un accumulo di fluidi secondario ad un aumento della permeabilità vascolare. Qualsiasi sia il meccanismo eziopatogenetico, i segni clinici che si evidenziano possono essere caratterizzati da aumento di volume dell'addome, da difficoltà respiratorie secondarie all'edema polmonare, da un aumento delle dimensioni degli arti e della regione ventrale del collo. (Klosternan et al 2011).

L'ipertensione sistemica è secondaria all'aumentata attività del sistema renina angiotensina aldosterone, che provoca una aumentata ritenzione di sodio. Negli animali con patologie glomerulari, l'ipertensione sistemica si verifica in più del 60% dei soggetti (Surman et al

2012). L'ipertensione può determinare danni a carico di alcuni organi definiti organi target: occhi, sistema nervoso centrale, cuore e rene. A livello oculare si può evidenziare la coroidopatia/retinopatia ipertensiva frequentemente bilaterale, caratterizzata da distacco retinico. A livello renale l'ipertensione può aggravare la proteinuria determinando glomerulosclerosi, ipertrofia glomerulare, espansione mesangiale e infiammazione interstiziale con conseguente atrofia tubulare, fibrosi interstiziale e assottigliamento delle arteriole renali. A livello di sistema nervoso centrale, si può osservare encefalopatia ipertensiva con arteriosclerosi dei vasi cerebrali, edema della sostanza bianca e microemorragie parenchimali, cui seguono segni clinici caratteristici della sindrome centrale. A livello cardiaco, nel gatto, si può osservare ipertrofia ventricolare sinistra con assottigliamento del setto interventricolare (Jepson 2011; Brown et al 2011).

Le complicanze tromboemboliche sono la conseguenza di ipoproteinemia, aumento della sintesi di fattori della coagulazione, riduzione della concentrazione sierica di inibitori della coagulazione, iperattivazione piastrinica, alterata fibrinolisi. La formazione di trombi si riscontra soprattutto in pazienti con alcuni tipi di patologie glomerulari, quali glomerulopatia membranosa, glomerulo nefrite membranosa proliferativa e *Minimal Change Disease*. I trombi si localizzano soprattutto a livello venoso splenico, epatico, mesenterico, polmonare, renale e surrenalico. La prevalenza delle complicanze tromboemboliche in cani con patologie glomerulari è superiore al 25,7% e superiore al 38,5% in cani con amiloidosi renale (Klosterman et al 2011; Buemi et al 2005; Kerlin et al 2012; Kumar et al 2012; Mahmoodi et al 2008).

Le principali conseguenze clinico patologiche, in corso di proteinuria glomerulare, sono iperazotemia, ipernatriemia, iperlipidemia, alterazioni del profilo coagulativo, panipoproteinemia e peso specifico inadeguato.

L'azotemia si riscontra frequentemente in cani con patologie glomerulari ed è la conseguenza dell'inappropriata filtrazione glomerulare delle sostanze azotate (Klosterman et al 2011).

L'ipernatriemia si manifesta per un aumento dell'attivazione del sistema renina angiotensina aldosterone con conseguente inappropriata ritenzione di sodio. L'ipernatriemia, a livello neurologico, determina il passaggio di acqua al di fuori della cellula nervosa e, quindi, una rapida riduzione del volume cerebrale, che può comportare rottura dei vasi cerebrali ed emorragie focali (Klosterman et al 2011).

L'iperlipidemia è secondaria ad una aumentata sintesi e ad un ridotto catabolismo di lipoproteine a molto bassa, intermedia e bassa densità e raramente di trigliceridi. L'aumentata sintesi epatica di lipoproteine si ha in risposta all'ipoalbuminemia e al calo della pressione oncotica. L'iperlipidemia è associata ad una aumentata prevalenza di arteriosclerosi e di progressione dell'azotemia in medicina umana (Klosterman et al 2011). La principale alterazione del profilo coagulativo in cani proteinurici con patologie glomerulari consiste nel calo dell'antitrombina III (ATIII) (Klosterman et al 2011).

1.3 Approccio diagnostico

In medicina veterinaria la proteinuria persistente è un reperto clinopatologico, che presenta numerose cause come riassunto in **Tabella 1**. E', quindi, necessario che il clinico classifichi correttamente la proteinuria ed effettui un protocollo diagnostico finalizzato ad identificare la patologia che determina proteinuria.

In presenza di un paziente proteinurico il clinico deve innanzitutto identificare eventuali condizioni fisiologiche che esitano in un'aumentata escrezione di proteine (proteinuria funzionale), quali colpo di calore, congestione venosa, ipertermia e stress. Tale tipo di proteinuria è lieve e transitoria (Lee set al 2004).

Quando la proteinuria è stata definita come patologica, è necessario effettuare misurazioni ripetute nel tempo per poterla classificare come persistente o transitoria. Si ha proteinuria persistente, quando si riscontra proteinuria in tre misurazioni a distanza di due settimane l'una dall'altra. La proteinuria persistente, indipendentemente dalla sua entità, è considerata un reperto clinicopatologico di patologia renale, quando è stata esclusa la possibilità che sia di origine pre-renale e post-renale. (Lee set al 2004).

L'iniziale valutazione di un paziente proteinurico consiste nel segnalamento cui segue un'attenta anamnesi remota e recente. L'esame fisico diretto deve comprendere l'esame obiettivo particolare dell'apparato urogenitale e la misurazione della pressione arteriosa. Il protocollo diagnostico prevede analisi ed esame batteriologico delle urine, esame emocromocitometrico, profilo biochimico da siero, ecografia addominale e/o radiografia addominale e diagnostica per immagini avanzata, test sierologici o PCR (*Polymerase*

Chain Reaction) per testare malattie infettive, biopsia renale e analisi quantitativa e qualitativa delle proteine urinarie UPC (Verma et al 2012).

La proteinuria renale può avere un'origine glomerulare, tubulare o mista. L'origine tubulare della proteinuria può essere sospettata in presenza di acidosi tubulare prossimale, glicosuria normoglicemica e alterazioni nelle frazioni escretorie degli elettroliti. La proteinuria glomerulare può essere di entità variabile con valori di UPC sempre superiori a 0,5 e, se si ha il sospetto una patologia glomerulare, è necessario effettuare una biopsia renale per identificare il tipo di nefropatia proteinurica. La valutazione del preparato istologico deve essere effettuata con l'utilizzo concomitante di microscopio a trasmissione elettronica, immunofissazione e microscopio a immunofluorescenza (Lee et al 2011; Pressler 2011).

1.4 Metodi di misurazione e implicazioni cliniche

I metodi di misurazione della proteinuria in medicina veterinaria comprendono metodi semi-quantitativi, quantitativi e qualitativi. I metodi semi-quantitativi sono il dipstick urinario, multistix PRO e L'SSA (metodo turbidimetrico con acido sulfosalicilico). Il metodo quantitativo consiste nella misurazione dell' UPC. I metodi qualitativi comprendono SDS-PAGE, SDS-AGE, HRE e Cromatografia liquida (Harley 2012; Giori et al 2011).

Il dipstick urinario è un rapido e poco costoso metodo di screening ampiamente utilizzato nella pratica clinica veterinaria (**Figura 6**). Il reagente attivo utilizzato per individuare le proteine urinarie è il blu di tetrabromofenolo che subisce una variazione colorimetrica in presenza di proteine, soprattutto albumina. La lettura del dipstick può essere effettuata da un operatore mediante valutazione soggettiva della modificazione dei colori nello stick, oppure può essere automatizzata. Uno studio recente del 2013 pubblicato su *Research in Veterinary Science* dimostra che la lettura automatizzata del Dipstick è più accurata rispetto alla sua valutazione visiva (Defontis et al 2013).

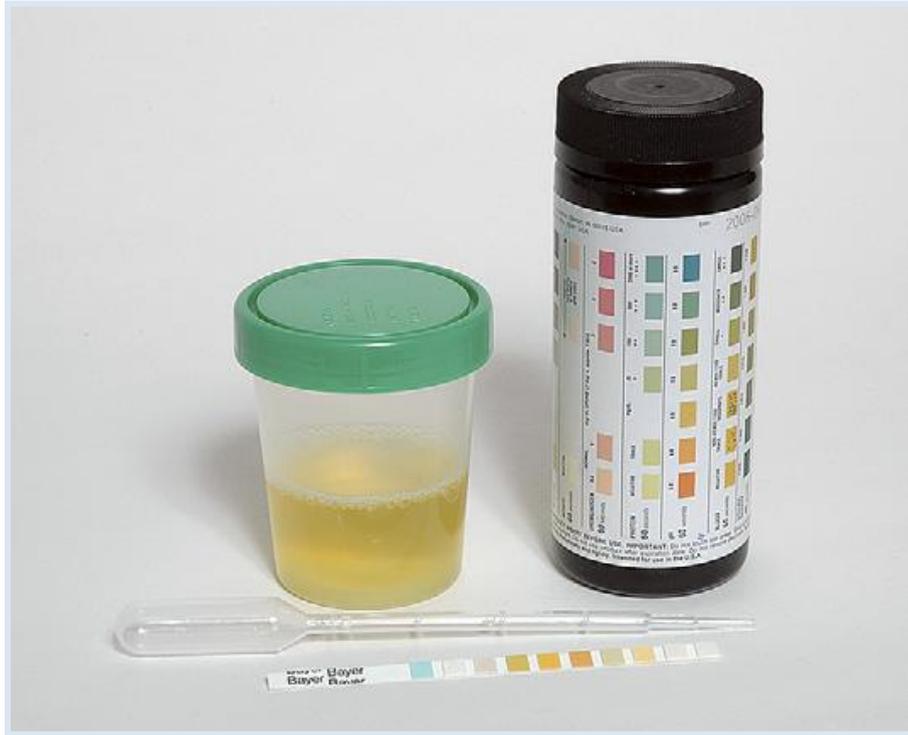


Figura 6: dipstick per la misurazione della proteinuria (Grauer 2007)

Il dipstick test ha sensibilità e specificità relativamente basse e risulta positivo per livelli di proteine urinarie superiori o uguali a 30 mg/dl. Risultati falsi negativi si ottengono in presenza di proteinuria di *Bence Jones*, di basse concentrazioni di albuminuria, di urine diluite e di urine acide. La sensibilità risulta, quindi, essere nel cane e nel gatto rispettivamente dell' 81% e del 90%, come riportato da Lyson e collaboratori in uno studio che mette a confronto il dipstick urinario e l'ELISA su 599 campioni di urine di cane e 347 campioni di urine di gatto. Nello stesso studio è riportata una specificità del dipstick nel cane e nel gatto rispettivamente del 64% e del 25%. I falsi positivi, infatti, sono più frequenti nel gatto e sono legati alla presenza di urine molto concentrate e urine pigmentate, condizioni per le quali i falsi positivi si possono osservare solo per concentrazioni di proteine non superiori ai 30 mg/dl. Si possono riscontrare falsi positivi anche in presenza di urine alcaline, di sedimento attivo (piuria, ematuria, batteriuria) e quando i tempi di contatto tra urine e dipstick sono troppo lunghi (Grauer 2007; Harley 2012; Grauer 2011; Maisnar et al 2011).

Zatelli e collaboratori, in uno studio del 2010, pubblicato sull'*American Journal of Veterinary Reserch*, hanno valutato l'efficacia del dipstick per la misurazione della proteinuria confrontandolo con l'UPC nel cane. dipstick, UPC, peso specifico urinario e sedimento sono stati valutati in 507 campioni di urine. Con il rapporto UPC come criterio di riferimento (UPC < 0,2 viene considerato assenza di proteinuria), l'accuratezza del dipstick urinario è stata calcolata in relazione al peso specifico urinario (< 1012, > 1012 e < 1030; > 1030). Il dipstick urinario ha una sensibilità maggiore del 90% per la misurazione della proteinuria, quando il test viene definito negativo per 0 mg/dl di proteine, mentre la sensibilità varia dal 40% al 60% in relazione al peso specifico. Quando, come limite di riferimento si utilizza 30 mg/dl, il dipstick ha una sensibilità che varia dal 56% all'81% in relazione al peso specifico e la specificità aumenta fino al 90%. Quando il peso specifico è inferiore a 1012, il dipstick non è sempre in grado di identificare i cani proteinurici. Nei cani con risultati del dipstick pari a 30 mg/dl e peso specifico < 1012, non è fondamentale ricorrere a una determinazione quantitativa della proteinuria. Se il dipstick misura 30 mg/dl di proteine e il peso specifico è > 1012, i cani possono essere considerati come non proteinurici. Se il dipstick misura 100 mg/dl o valori superiori e il peso specifico è inferiore a 1030, i cani devono essere considerati proteinurici ed è necessaria una determinazione quantitativa (**Tabella 4**) (Zatelli et al 2010).

Tabella 4: Interpretazione dei risultati del dipstick in relazione al peso specifico.

PS	Risultati del Dipstick Urinario		
	0+ (0 mg/dl)	1+ (30 mg/dl)	≥2+ (≥100 mg/dl)
< 1012	NP	UPC	UPC
> 1012 e < 1030	NP	NP	UPC
≥ 1030	NP	NP	UPC

NP: non proteinurico; UPC: approfondimento diagnostico mediante UPC

modificato da Zatelli A. et al., 2010

Miyazaki e collaboratori hanno pubblicato nel 2011 uno lavoro sull'utilizzo del dipstick come metodo semi-quantitativo per il riscontro di proteinuria nel gatto, dopo aver rimosso dalle urine dei gatti la cauxina. La cauxina, glicoproteina di 70 kDa presente nelle urine dei gatti, reagisce con il blu di tetrabromofenolo allo stesso modo dell'albumina, dando risultati falsi positivi alla determinazione della proteinuria con il dipstick. La cauxina è secreta dalle cellule del tubulo contorto prossimale in relazione al sesso e all'età del gatto: si osserva una maggiore escrezione di cauxina in gatti adulti e interi rispetto a giovani castrati o a femmine. L'eliminazione della cauxina nelle urine dei gatti aumenta l'accuratezza del dipstick per la misurazione della proteinuria in gatti proteinurici (Miyazaki et al 2011; Jepson et al 2010).

Il multistix PRO è un altro metodo semi-quantitativo poco utilizzato in medicina veterinaria. E' un nuovo dipstick, in grado di misurare le concentrazioni di proteine urinarie e di creatinina urinaria in soli 60 secondi (**Figura 7**). In medicina umana è stato dimostrato che i valori di UPC ottenuti da campioni di urine con il multistix PRO hanno una correlazione significativa con i valori di UPC ottenuti con metodi quantitativi (Kaneko et al 2005).

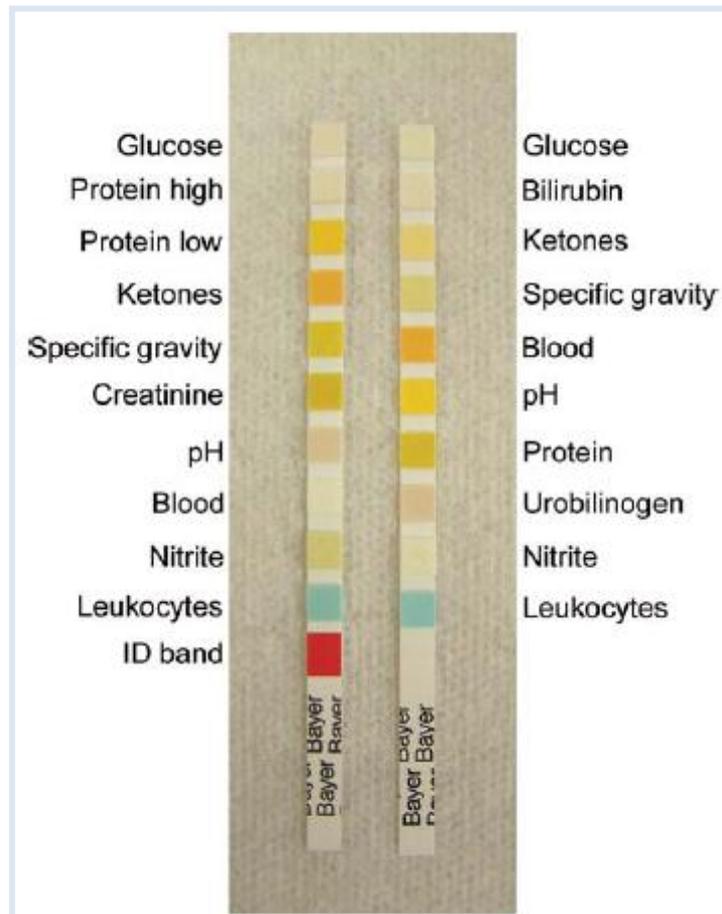


Figura 7: multistix PRO Dipstick a sinistra. dipstick convenzionale a destra (Welles et al 2006)

In medicina veterinaria, Welles e collaboratori, in uno studio del 2006, hanno messo a confronto i risultati di UPC del multistix PRO con i risultati ottenuti con metodi quantitativi nel cane e nel gatto. L'UPC ottenuto con multistix PRO ha una correlazione statisticamente significativa con l'UPC ottenuto con metodo quantitativo nel cane e ha una specificità del 93,1% e sensibilità del 91,2% per la diagnosi di proteinuria. Nel gatto, invece, l'UPC ottenuto con multistix PRO non è statisticamente correlato con il valore di proteinuria ottenuto con metodo quantitativo (Welles et al 2006).

L'SSA o metodo turbidimetrico con acido sulfosalicilico è un test turbidimetrico semi-quantitativo per la misurazione delle proteine urinarie, semplice e rapido da effettuare, ma fortemente soggetto a errore da parte dell'operatore. Il test viene effettuato miscelando quantità uguali di suranante urinario e di acido sulfosalicilico al 3% o al 5% in un tubo di vetro e misurando il gradiente di precipitazione proteica in relazione al grado di torbidità

della soluzione in una scala da 0 a 4+ (**Figura 8**). Oltre all'albumina, l'SSA misura anche le globuline e le proteine di *Bence Jones*. Falsi positivi si osservano in urine contenenti agenti di contrasto radiografici, penicilline, cefalosporine, sulfisoxazolo, timolo oppure in urine torbide non centrifugate. La sensibilità del test SSA è di circa 5 mg/dl di contenuto proteico urinario e aumenta per concentrazioni proteiche > 5 mg/dl. La sensibilità dell'SSA per l'albuminuria nel cane e nel gatto è rispettivamente del 73% e del 58%, ma la specificità è rispettivamente del 64% e del 25% (Grauer 2011; Harley et al 2012). Se il dipstick urinario o l'SSA risultano maggiori o uguali a 2+, è altamente probabile che il paziente sia albuminurico, mentre se il dipstick misura 30 mg/dl, l'SSA deve essere effettuato per confermare o meno la proteinuria. Se il dipstick e l'SSA vengono fatti contemporaneamente e danno esito positivo, la loro concomitante interpretazione aumenta la specificità di entrambi i test. Se entrambi i test danno esito negativo o di 1+, l'eventuale proteinuria deve essere confermata con metodi quantitativi (Lyon et al 2010; Grauer et al 2011).

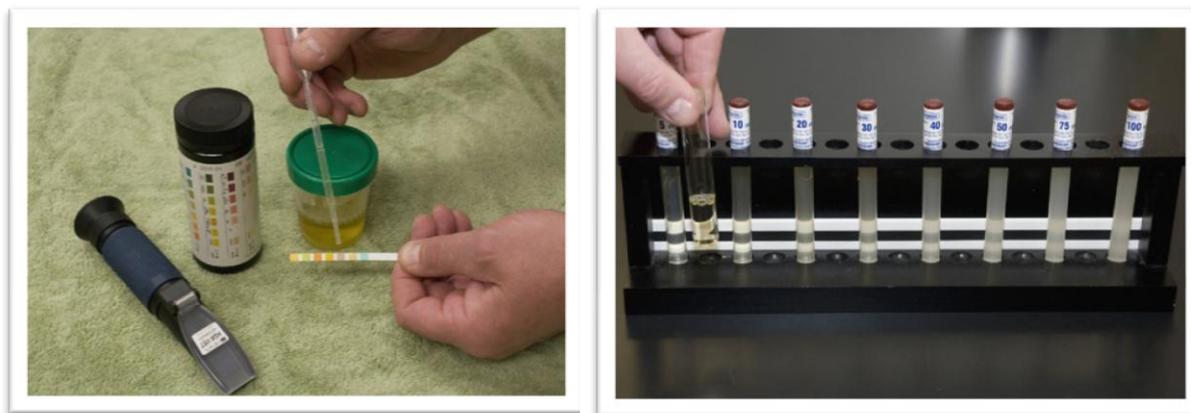


Figura 8 : a sinistra, **dipstick** convenzionale per la misurazione della proteinuria. A destra, metodica **SAA** con valutazione della torbidità (da Grauer , 2002).

Numerosi studi in medicina umana sottolineano, comunque, l'importanza delle misurazioni quantitative della proteinuria per i limiti dei metodi semi-quantitativi soprattutto nei

pazienti albuminurici , *border-line* proteinurici e per il monitoraggio della proteinuria nel tempo (Nagrebetsky et al 2012; Samal et al 2013).

L'UPC è il gold standard in medicina veterinaria per la misurazione della proteinuria. E' un metodo quantitativo che si dovrebbe effettuare in tutti i cani e i gatti, che risultano positivi al dipstick e/o all'SSA. Il riscontro di un'aumentata escrezione proteica ha sia un importante valore diagnostico che prognostico in presenza di una patologia renale e la quantificazione della proteinuria è fondamentale per impostare un corretto protocollo terapeutico e per monitorare la progressione del danno renale. La *National Kidney Foundation* sottolinea, inoltre, che il monitoraggio dell'aumentata escrezione proteica può essere utilizzato come screening nei pazienti a rischio di sviluppare una malattia renale (Price et al 2005; Bermudez et al 2011; De Goeij MC et al 2012; Di Bartola 2010; Lavey et al 2011; Lavey et al 2012). Idealmente, la proteinuria dovrebbe essere misurata in un periodo di 24 ore, perché l'escrezione proteica varia notevolmente durante la giornata in relazione alla variazione dell'assunzione di acqua, alla frequenza della diuresi, all'esercizio fisico, al decubito e al tipo di dieta, ma la raccolta di urine nelle 24 ore negli animali non è di semplice attuazione se non mediante cateterismo urinario permanente o gabbia metabolica. Comunque studi di medicina umana dimostrano che la misurazione dell'UPC di singoli campioni di urina prelevati a meno di 24 ore l'uno dall'altro, ha una stretta correlazione con la proteinuria delle 24 ore (Harley et al 2012; Matar et al 2012; Fine DM et al 2009; Price et al 2005; Xin et al 2004). Mentre in medicina umana il rapporto UPC viene espresso in mg di proteine su grammo di creatinina (mg/g), in medicina veterinaria il rapporto è espresso con la stessa unità di misura(es. mg/dl) (Lees 2004).

Nel cane e nel gatto il prelievo delle urine per la misurazione dell'UPC può essere effettuato per minzione spontanea, mediante cateterismo urinario oppure per cistocentesi. In letteratura l'UPC è considerato attendibile solo per campioni di urina prelevati per cistocentesi, ma tale tecnica ha molti limiti nella pratica clinica, quali ad esempio la necessità di immobilizzare il paziente, il rischio di rottura della vescica durante il prelievo di urina e la difficoltà di localizzare correttamente la vescica in alcuni cani (Willard et al 2004; Beatrice et al 2010). Sono pochi e datati gli studi in medicina veterinaria sull'accuratezza della misurazione dell'UPC in urine prese per caduta. Beatrice e collaboratori hanno pubblicato uno studio nel 2010 che mette a confronto l'UPC di campioni di urina prelevati per cistocentesi e per minzione spontanea in 115 cani. Per ogni cane incluso nello studio, il prelievo delle urine viene effettuato sia mediante cistocentesi

sia per caduta. Sono stati esclusi dallo studio cani con sedimento urinario attivo. I cani sono stati classificati in base all'UPC ottenuto da urine prelevate per cistocentesi, come non proteinurici (UPC<0,2), *borderline* proteinurici (UPC tra 0,2 e 0,5) e proteinurici (UPC>0,5), in accordo con l'*International Renal Interest Society* (IRIS). E' stata dimostrata una forte correlazione tra gli UPC ottenuti dal campione di urina prese per caduta e per cistocentesi ($r^2=0,90$) e il 92,6% dei cani inclusi nello studio ha un UPC, ottenuto con entrambi i metodi di prelievo urinario, che classifica i soggetti nello stesso stadio IRIS (**Figura 9, Tabella 5**) (Beatrice et al 2010; Maddens et al 2011).

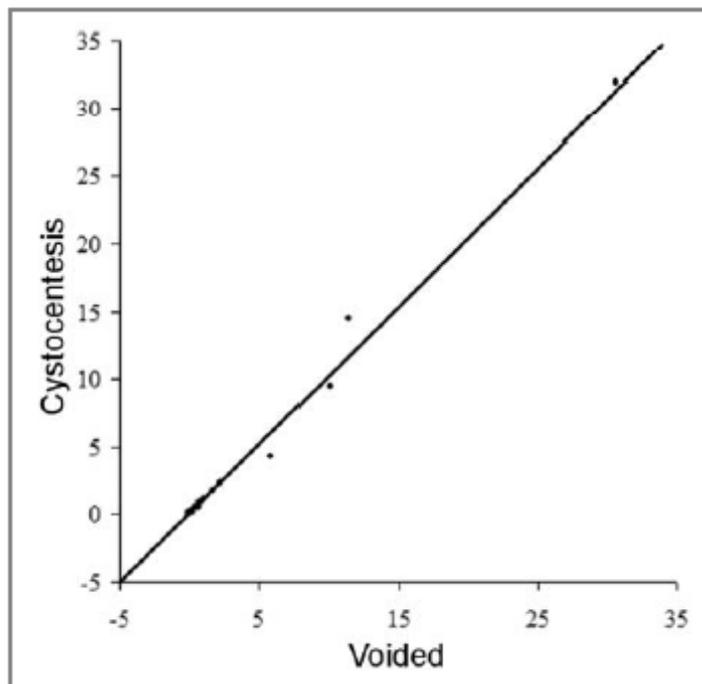


Figura 9: correlazione tra UPC di campioni di urina ottenuti da 81 cani (Beatrice et al, 2010)

Tabella 5: Classificazione della proteinuria in 81 cani in relazione all'UPC di campioni di urine ottenute con cistocentesi messi a confronto con l'UPC di campioni di urina ottenute per minzione spontanea nella fase centrale della minzione (Beatrice et al, 2010)

Urina-per cistocentesi				
Urina-per caduta	Non proteinurico	Borderline proteinurico	Proteinurico	Totale
Non proteinurico	57*	1	0	58
Borderline proteinurico	3	5*	1	9
Proteinurico	0	1	13	14
Totale	60	7	14*	81

*risultati in accordo con la classificazione IRIS nel cani in relazione all'UPC dei campioni di urina prelevati per cistocentesi e per caduta.

Modificata beatrice et al, 2010

Gli autori concludono, quindi, che, in presenza di un sedimento spento, è possibile misurare l'UPC indifferentemente da urine prese per caduta e per cistocentesi (Beatrice et al 2010).

La misurazione dell'UPC può essere influenzata da fattori preanalitici, tra i quali lo stoccaggio del campione di urine dopo il prelievo. Nelle prime 4 ore dal prelievo di urina conservata a temperatura ambiente, si osserva un aumento dell'UPC lieve e non significativo rispetto al valore ottenuto con misurazione effettuata immediatamente dopo il prelievo. L'aumento dell'UPC diventa significativo a 12 ore dal prelievo di urina. Nelle urine, conservate a temperatura ambiente, si dovrebbe osservare un calo della concentrazione proteica urinaria per la denaturazione delle proteine. La disidratazione del campione di urine durante lo stoccaggio determina, però, un aumento della concentrazione di creatinina, minimizzando la variazione dell'UPC. Nelle urine stoccate a 4°C le proteine sono molto più stabili. Si osserva un lieve e progressivo aumento dell'UPC dopo 12 ore di stoccaggio a 4°C fino a oltre 1 settimana. In campioni stoccati a -20°C la variabilità preanalitica della misurazione dell'UPC è minima (Rossi et al 2012). Altro fattore preanalitico che può influenzare la misurazione dell'UPC è il tipo di sedimento urinario. Le infiammazioni delle basse vie urinarie, per le quali è possibile riscontrare nel sedimento urinario batteri, globuli rossi e leucociti, determinano variazioni nella misurazione della

proteinuria (Vaden et al 2004). Nel gatto è stato dimostrato che modificazioni della dieta possono alterare l'UPC in modo significativo. In studi sperimentali nei quali è stata indotta malattia renale cronica nei gatti, nel 56% dei gatti alimentati con dieta proteica, il rapporto UPC aumentava da 0.13 a 0.36, mentre tale aumento si evidenziava solo nel 28% dei gatti alimentati con dieta a basso contenuto di proteine (Chew et al 2011). Anche la somministrazione di alcuni farmaci può influenzare la proteinuria. In uno studio di Pascale e collaboratori del 2012 è stato valutato l'effetto della somministrazione di idrocortisone sulla funzionalità renale nei cani di razza Beagle. Gli autori dimostrano che la somministrazione di idrocortisone determina un calo del GFR e un significativo aumento della proteinuria. I possibili meccanismi, con cui l'idrocortisone causa proteinuria, comprendono alterazioni emodinamiche che esitano in ipertensione glomerulare e in alterazioni strutturali della barriera glomerulare, quali glomerulo sclerosi, *affacement* dei processi podocitari e modificazioni della membrana basale glomerulare. Gli autori non hanno dimostrato la persistenza o meno delle lesioni renali dopo interruzione della somministrazione di idrocortisone (Pascale et al 2012).

L'*Internationa Renal Interest Society* ha proposto degli intervalli di riferimento per l'UPC nel cane e nel gatto per l'identificazione dei pazienti proteinurici in corso di stadiazione della malattia renale cronica. I cani vengono definiti non proteinurici quando l'UPC è < 0.2, borderline proteinurici per valori di UPC compresi tra 0.2 e 0.5, proteinurici per valori di UPC > 0.5. I gatti vengono definiti non proteinurici quando l'UPC è < 0.2, *borderline* proteinurici per valori di UPC compresi tra 0.2 e 0.4, proteinurici per valori di UPC > 0.4 (Figura 10).

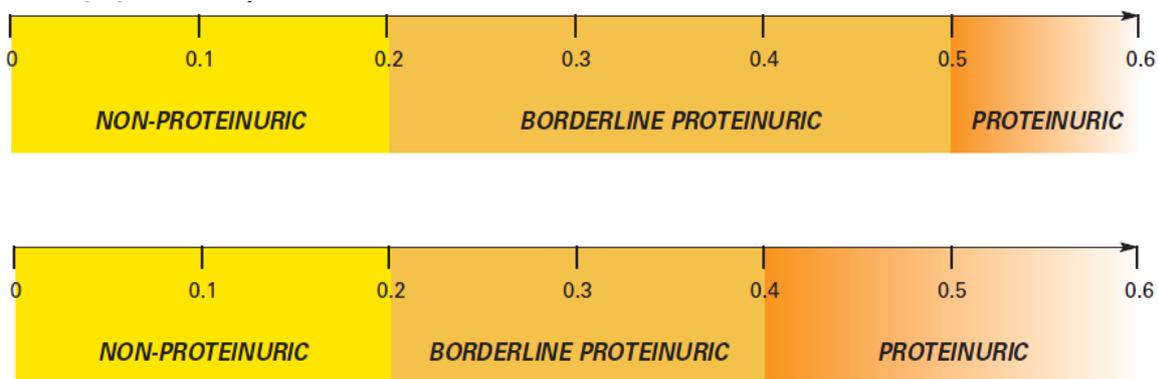


Figura 10: valutazione della proteinuria in relazione all'UPC nel cane (sopra) e nel gatto (sotto)

In medicina veterinaria è stato definito come valore di riferimento in corso di patologia glomerulare un UPC > 3 (Welles et al 2006; Klosterman et al 2011). Valori di UPC, compresi tra 1 e 3, si possono riscontrare in pazienti che presentano tubulopatie con perdite proteiche tubulari o con perdita della capacità tubulare di riassorbire le proteine filtrate dal glomerulo, a causa di una eccessiva filtrazione glomerulare di proteine a basso peso molecolare, come le proteine di *Bence Jones*, la mioglobina o i dimeri di mioglobina (Welles et al 2006). Frequentemente in cani con glomerulonefriti si osserva un UPC >5 e tipicamente superiore a 18 in cani con amiloidosi renale in cui si ha un grave coinvolgimento del glomerulo (Welles et al 2006; Segev 2010; Segev et al 2012).

Nel cane e nel gatto viene definito come valore di riferimento per identificare pazienti non proteinurici UPC < 0.2, mentre in pazienti albuminurici l'UPC dà molti falsi negativi, se confrontato con metodiche immunotubidimetriche (**Tabella 6**) (Gentilini et al 2005; Murgier et al 2009; Grauer 2011).

Tabella 6: Pu/Cu nel cane e nel gatto (390 campioni di cane, 317 campioni di gatto)

	Cane		Gatto	
	Pu/Cu ≥ 0.2	Pu/Cu ≥ 0.5	Pu/Cu ≥ 0.2	Pu/Cu ≥ 0.4
Sensibilità	47.9 %	28.7 %	32.7 %	2.04 %
Specificità	98.6 %	99.7 %	90.8 %	99.2 %
Valore Predittivo Positivo	91.8 %	96.4 %	74.4 %	66.7 %
Valore Predittivo Negativo	85.6 %	81.5 %	62.1 %	55.1 %

Modificato da Grauer 2011

L'UPC è stato ampiamente studiato nei pazienti con malattia renale cronica come indice diagnostico e prognostico. Jacob e collaboratori, in uno studio prospettico di coorte del 2005, hanno valutato l'associazione tra proteinuria e morbidità o morte in cani con malattia renale cronica. Nello studio è stato definito come nei cani un UPC pari o superiore a 1.0, nel momento in cui viene diagnosticata malattia renale cronica, sia associato ad un aumentato rischio di sviluppare crisi uremiche, morte e progressione del danno renale. 45

cani sono stati divisi in due gruppi in base ai risultati dell'UPC: UPC < 1.0, UPC uguale o superiore a 1.0. E' stato dimostrato che cani, con UPC maggiore o uguale a 1.0, avevano un rischio tre volte superiore di morire o di sviluppare crisi uremiche rispetto ai cani con UPC < 1.0. Il rischio relativo di una prognosi infausta era di 1.5 volte superiore per ogni aumento di UPC di 1. Cani con UPC maggiore o uguale a 1.0 hanno manifestato una riduzione della funzionalità renale più rapida rispetto all'altro gruppo. La determinazione dell'UPC in cani con malattia renale cronica ha quindi un importante significato prognostico (Jacob et al 2005; Buranakarl et al 2007; Wehner et al 2013; Cravedi et al 2013; Adams et al 1992).

L'elettroforesi delle proteine urinarie è comunemente utilizzata per il riscontro di immunoglobuline a catena leggera come le proteine di *Bence Jones* e per la valutazione di proteine a basso peso molecolare, che si evidenziano prevalentemente in corso di proteinuria tubulare. Tale tecnica diagnostica permette, comunque, una corretta analisi qualitativa di tutte le proteine urinarie a basso e ad alto peso molecolare e permette una diagnosi precoce e un corretto monitoraggio delle patologie renali. Le tecniche elettroforetiche utilizzate più comunemente per la valutazione delle proteine urinarie sono tre: SDS-AGE (*Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis*); SDS-PAGE (*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*) e HRE (*High resolution electrophoresis*) (Tietz 2008; Giori et al 2013).

L'SDS-PAGE è una tecnica analitica che permette l'analisi di estratti proteici. Il principio su cui si basa tale tecnica elettroforetica è l'attività denaturante dell'SDS, che è in grado di interagire con le proteine in un rapporto costante di 1.4 grammi di SDS per ogni grammo di proteina. Nell'SDS-PAGE viene utilizzato il poliacrilamide, polimero preparato mediante il riscaldamento dell'acrilamide. Il gel di poliacrilamide, termostabile, trasparente, resistente nel tempo, relativamente inerte dal punto di vista chimico e fortemente ionico, conferisce, infatti, una carica elettrica negativa in media ogni 2 residui di amminoacidi. Viene preparato con pori di diverse dimensioni: le dimensioni medie dei pori di un gel di poliacrilamide al 7,5% sono di circa 5nm, sufficientemente larghe da permettere il passaggio della maggior parte delle proteine sieriche, ma di dimensioni tali da impedire il passaggio di proteine di dimensioni maggiori a 5 nm (fibrinogeno, β 1-lipoproteine, α 2-macroglobulina, γ -globuline). Le proteine vengono, quindi, separate in un campo elettrico in relazione alle dimensioni molecolari, perché il rapporto carica-massa per

ogni proteina denaturata con SDS rimane costante. Quando il poliacrilamide viene utilizzato per la separazione degli acidi nucleici, è in grado di discriminare molecole di DNA che differiscono solo di un 2% in lunghezza. Il poliacrilamide, inoltre, analizza fino a più di 10µg di campione nello stesso slot (Tietz 2008; Stellwagen 2009; Nancy 2009). L'SDS-PAGE come analisi qualitativa delle proteine urinarie permette così di definire la localizzazione della proteinuria in relazione al peso molecolare delle proteine: le proteine a basso peso molecolare ($M_r < 66.000$) sono di origine tubulare (β 2-microglobulina, lisozima, retinol-binding proteine, α 1-microglobulina, α 1 glicoproteina acida), mentre quelle a medio e alto peso molecolare hanno un'origine glomerulare ($M_r > 66.000$). Questa tecnica elettroforetica è utile per definire il tipo di danno renale e per una corretta valutazione della funzionalità renale (Suhail et al 2011; Bricon et al 1998; Marshall et al 1999; Sufi et al 2011).

Brown e collaboratori hanno sottolineato, in uno studio del 2009, che l'SDS-PAGE ha una sensibilità diagnostica paragonabile a quella della biopsia renale. Lo studio mette a confronto i risultati ottenuti con l'elettroforesi urinaria SDS-PAGE con i risultati istologici e con i dati clinico patologici di cani affetti da patologia renale. La migrazione delle proteine urinarie lungo il gel elettroforetico di poliacrilamide permette, infatti, di discriminare la proteinuria glomerulare da quella tubulare. La specificità dell'SDS-PAGE, però, è bassa e non è stata evidenziata una elevata correlazione tra SDS-PAGE e gravità del danno renale. L'SDS-PAGE è, comunque, considerato uno strumento molto sensibile per discriminare proteinuria renale, tubulare e mista ed è tuttora ampiamente utilizzata in medicina umana per monitorare i pazienti con patologie renali e per valutare la risposta ai diversi protocolli terapeutici (Giori et al 2011).

Schultze e collaboratori, in uno studio del 1998, hanno utilizzato l'SDS-PAGE delle proteine urinarie per l'analisi e la differenziazione della proteinuria tubulare da quella glomerulare. Nello studio sono stati inclusi 6 cani sani non proteinurici e 12 cani proteinurici. Sono stati evidenziati 4 cani con proteinuria glomerulare, 2 con proteinuria tubulare e 6 con proteinuria mista, in relazione al peso molecolare delle proteine urinarie. In 6 cani proteinurici, la localizzazione della lesione renale è stata confermata con esame istologico ottenuto mediante biopsia renale o mediante esame autoptico (Schultze et al 1998).

Nell'SDS-PAGE viene utilizzato l'agarosio purificato, ovvero separato dall'agaropectina. Poiché i pori dell'agarosio sono di dimensioni tali da permettere il passaggio di tutte le

proteine (il diametro medio dei pori del gel di agarosio 1% è di circa 100 nm), la loro separazione dipende esclusivamente dal rapporto tra carica e massa di ogni frazione proteica. I vantaggi dell'utilizzo dell'agarosio consistono nella sua bassa affinità per le proteine e la sua trasparenza dopo essiccazione che permette quindi un eccellente esame sensitometrico. L'agarosio non presenta gruppi ionizzabili. La quantità di campione necessaria per l'analisi in SDS-AGE è di 5-7 µl su ogni fessura. In un tempo di circa 5 minuti il campione diffonde lungo il gel di agarosio. Il movimento delle molecole di DNA nel gel di agarosio è fortemente dipendente dal campo elettrico applicato al gel (Tietz 2008; Stellwagen 2009).

L'SDS-AGE è una tecnica elettroforetica che ha due principali vantaggi rispetto all'SDS-PAGE: permette la separazione anche delle proteine di grosse dimensioni ed ha minore tossicità. Zini e collaboratori hanno messo a confronto i risultati ottenuti mediante SDS-AGE delle proteine urinarie con l'istologia renale in 49 cani azotemici o proteinurici. Gli obiettivi dello studio erano di valutare l'efficacia dell'SDS-AGE nel definire lesioni glomerulari o tubulo interstiziali, di studiare i patterns delle proteine ad alto peso molecolare per distinguere le diverse patologie glomerulari e di stimare le proteine a basso peso molecolare come *markers* di gravità del danno tubulo interstiziale. Sulla base del peso molecolare le proteine ad alto peso molecolare (superiore o uguale a 69 kd) sono state considerate indicative di danno glomerulare, mentre quelle a basso peso molecolare (< 69 kd) sono state considerate indicative di danno tubulare. I preparati istologici renali sono stati esaminati con microscopio a luce polarizzata. La sensibilità dell'SDS-AGE per la diagnosi di patologie glomerulari è del 100%, per la diagnosi di patologie tubulo interstiziali del 92,6%. La specificità è del 40% e del 62,5% rispettivamente. Le proteine ad alto peso molecolare non sono associate in maniera significativa al tipo di lesione glomerulare, mentre le proteine a basso peso molecolare sono associate significativamente al grado di danno tubulo interstiziale. Il riscontro di proteine di 12 kDa e/o di 15 kDa è altamente indicativo di danno tubulo interstiziale. Gli autori concludono che l'SDS-AGE delle proteine urinarie nel cane rappresenta un test non invasivo con un'alta sensibilità nell'identificare i danni glomerulari e tubulo interstiziali, ma la sua bassa specificità limita la validità di questa metodica come unico test da utilizzare per definire il tipo di danno renale. Il test è particolarmente utile per identificare cani con lesioni tubulo interstiziali gravi, ma non può essere utilizzato per caratterizzare il tipo di patologia glomerulare (Zini et al 2004).

L'SDS-AGE presenta limiti nella determinazione delle proteine urinarie per valori di UPC < 0.2. Giori e collaboratori, in un recente studio del 2013, hanno evidenziato una quantità di falsi positivi significativamente elevata in campioni di urine con UPC < 0.2 e peso specifico > 1.030 rispetto a campioni con UPC < 0.2 e peso specifico < 1.030. L'elevata frequenza di falsi positivi è legata alla sensibilità analitica della tecnica elettroforetica, che misura piccole quantità di proteine (1-10 ng di proteine per campione). Tali conclusioni suggeriscono che la soglia stabilita dalla classificazione IRIS per definire i pazienti non proteinurici e *borderline* proteinurici potrebbe non essere adeguata e suggerisce anche che cani, con UPC < 0.2, potrebbero essere considerati proteinurici, quando con l'SDS-PAGE vengono riscontrate proteine glomerulari e/o tubulari. Purtroppo, in questo studio, non sono state effettuate biopsie renali per confermare la localizzazione del danno renale e i pazienti non sono stati monitorati nel tempo. Inoltre, l'elevata frequenza di falsi positivi potrebbe essere correlata all'elevata concentrazione delle urine. La misurazione, quindi, del peso specifico è fondamentale per la corretta interpretazione dei risultati che si ottengono con l'SDS-AGE e sarebbe importante riuscire a definire un valore cut off di peso specifico, che riduca il rischio di falsi positivi in cani con UPC < 0.2. Sicuramente, quando l'SDS-AGE delle proteine urinarie dà esito negativo, la probabilità che il paziente non sia proteinurico è di più dell'85%, mentre la probabilità che un campione positivo all'SDS-AGE abbia un UPC > 0.2 è inferiore all'80%. Ciò significa che circa il 20% dei cani con UPC < 0.2 potrebbe avere una proteinuria glomerulare, tubulare o mista e che la capacità dell'SDS-AGE di identificare pazienti con UPC > 0.2 è limitata. L'SDS-AGE, quindi, è una tecnica elettroforetica con alta sensibilità e bassa specificità (Giori et al 2013).

In medicina umana, sono stati definiti numerosi limiti di questa tecnica elettroforetica tra cui l'incapacità di distinguere proteine monoclonali da policlonali e la difficoltà di quantificazione delle proteine di *Bence Jones* (Bricon et al 1998).

L'HRE è una tecnica elettroforetica applicata a fluidi che contengono una bassa concentrazione di proteine come le urine e il liquido cefalorachidiano. E' una elettroforesi zonale in cui le proteine migrano in relazione alla loro carica, volume e massa. Rispetto all'SDS-AGE, nell'HRE si utilizza un buffer più alcalino (pH 8.6 rispetto al pH 8.5 dell'SDS-AGE), un contenuto differente di barbitale (0.18% rispetto a 0.61%) e un differente voltaggio per ora (40V/hr rispetto a 36 V/hr) a 20°C. Queste differenti condizioni analitiche permettono una separazione più efficace delle globuline rispetto alle

tecniche elettroforetiche standard. HRE, inoltre, è completamente automatizzata, standardizzata ed effettua l'esame in tempi molto rapidi, oltre ad essere meno costosa dell'SDS-AGE. Le bande proteiche presenti sul gel sono trasformate da un soft-ware in picchi corrispondenti a gruppi di proteine caratterizzate dalla stessa massa, volume e peso. Specifici *soft-ware* calcolano la percentuale dell'area sotto la curva. In medicina veterinaria, l'HRE è stata utilizzata per la ricerca di gammopatie monoclonali nel cane in uno studio retrospettivo di Giraudel e collaboratori del 2002 e in uno studio di Giori e collaboratori del 2011 per l'analisi qualitativa delle proteine urinarie (Giori et al 2011; Giraudel et al 2002).

L'HRE ha una elevata frequenza di falsi negativi in campioni di urina con UPC < 0.2, mentre una positività è frequentemente correlata a UPC > 0.2. Ha alta specificità, ma bassa sensibilità. L'HRE è, pertanto, un test molto utile e poco costoso in grado di prevedere i risultati dell'SDS-AGE nel definire l'origine della proteinuria: è, infatti, in grado di rivelare un'elevata quantità di albumina in corso di patologie glomerulari e un'elevata quantità di α 1-globulina in corso di patologie tubulari, perciò le performance diagnostiche dell'HRE sono migliori utilizzando il rapporto albumina/ α 1-globulina per distinguere una proteinuria tubulare da una proteinuria glomerulare. L'aumento di questo rapporto identifica una proteinuria glomerulare, mentre la riduzione del rapporto può identificare una proteinuria tubulare e valori di cutoff di 2 una proteinuria mista (**Tabella 7**) (Giori et al 2011)

Tabella 7: capacità diagnostica in percentuale di albumina e α_1 -globulina e del rapporto tra albumina e α_1 -globulina determinati con elettroforesi ad alta risoluzione per diagnosticare proteinuria glomerulare o tubulare utilizzando SDS-AGE come metodo di riferimento

	Parametri	Cut-off	Sensitività (%)	Specificità (%)	PPV (%)	NPV (%)	LR +
Glomerulare	Albumina	>41.4%	72.7	75.0	50.0	89.0	2.91
	α_1 -globulina	<29.3%	72.7	75.0	50.0	89.0	2.91
	Rapporto Alb/ α_1	>1.46	81.8	81.3	60.0	92.9	4.36
Tubulare	Albumina	<36.3%	60.0	60.6	31.6	83.3	1.52
	α_1 -globulina	>40.8%	70.0	69.7	41.8	88.5	2.31
	Rapporto Alb/ α_1	<0.84%	70.0	69.7	41.2	88.5	2.31

Modificata Giori et al, 2011

* PPV = *positive predictive value*; NPV = *negative predictive value*; LR+ = *positive likelihood ratio*

Modificata Giori et al, 2011

CAPITOLO II

Albuminuria

L'albuminuria, in medicina umana, è considerata un marker di progressione del danno renale e di aumento del rischio di mortalità cardiovascolare (Singh et al 2011). Il termine albuminuria è stato definito da Ruggenti e collaboratori in uno studio pubblicato su *Kidney International* nel 2008 in sostituzione del termine microalbuminuria, ampiamente utilizzato da numerosi autori negli anni precedenti (Gorriz et al 2012; Ruggenti et al 2006).

In medicina veterinaria, l'albuminuria gioca un ruolo importante nella progressione del danno renale e ha un ruolo patogenetico in condizioni patologiche associate a danno renale (Raila et al 2010). L'aumento dell'escrezione urinaria dell'albumina può essere conseguenza di un danno glomerulare e/o tubulare. In corso di glomerulopatia, l'aumentata filtrazione dell'albumina determina una saturazione dei siti tubulari di legame dell'albumina con un'incapacità di riassorbimento tubulare e, conseguentemente, con una aumentata escrezione urinaria di questa proteina. In corso di tubulopatia, si riduce la capacità di riassorbimento tubulare dell'albumina che viene, quindi, eliminata con le urine. La massima capacità di riassorbimento dell'albumina del tubulo contorto prossimale è di 0.05 ng/min di albumina per mm di lunghezza tubulare (Gekle 2005).

2.1 Fisiologia, fisiopatologia e meccanismi dell'albuminuria

L'albumina è la frazione proteica più abbondante nel sangue: rappresenta, infatti, il 60% delle proteine plasmatiche, ha un peso molecolare di 69.000 kDa, un diametro di 3.8 nm e una lunghezza di 15 nm. Le catene amminoacidiche sono organizzate in nove anse che

formano tre domini sferici chiamati I, II, III con cariche differenti, rispettivamente -9, -8 e +2, ottenendo così una carica netta di -15 (**Figura 11**) (Tojo et al 2012).

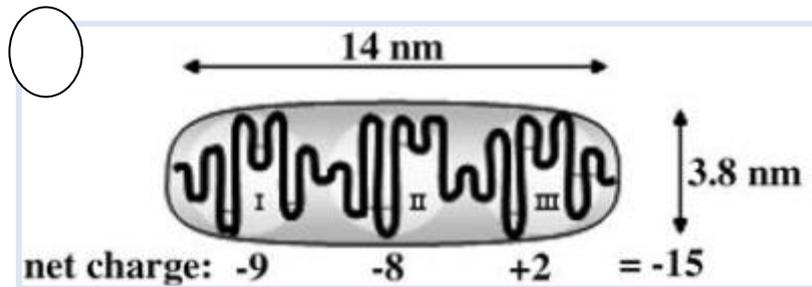


Figura 11: Dati e configurazione dell'albumina sierica (Genkle, 2005)

Il precursore dell'albumina, la prealbumina, viene processata dagli epatociti e secreta come albumina matura costituita da 585 amminoacidi ed è altamente solubile in acqua. L'albumina è stabilizzata da 17 ponti disolfossido e contiene molte strutture ad alfa elica che le danno una buona resistenza alla denaturazione. La sua forma allungata e le sue dimensioni sono fondamentali per ridurre al minimo la sua filtrazione glomerulare. L'albumina ha più di 6 siti di legame per acidi grassi a lunga catena. Nel plasma, normalmente, c'è un acido grasso per ogni molecola di albumina. In presenza di stress, di esercizio fisico intenso o di terapia eparinica, l'albumina può legare più molecole di acidi grassi a lunga catena. L'albumina è un carrier anche per molte piccole molecole organiche come la Tiroxina e per ioni come calcio e cloro e il legame con queste strutture può modificare la conformazione dell'albumina. La bilirubina occupa solo una piccola quantità delle molecole di albumina, tranne in corso di iperbilirubinemia, in cui più della metà delle albumine plasmatiche lega la bilirubina. Il sito I e II, infine, sono in grado di legare numerosi farmaci (salicilati, sulfamidici, penicilline) e composti endogeni (Miller et al 2009).

La membrana glomerulare presenta una struttura tale da permettere il passaggio di molecole con diametro inferiore o uguale a 3.5 nm, come descritto nel Capitolo 1. Mediante misurazioni effettuate con la tomografia elettronica, infatti, è stato visto che i pori dello *slit*

diaphragm presentano un diametro di 3.5 nm, ma le strutture misurate con questa tecnica tomografica vengono normalmente sottostimate in dimensione: è, quindi, possibile che i pori della superficie di filtrazione glomerulare abbiano dimensioni maggiori di quelle riportate in letteratura. Conseguentemente, alcune molecole di albumina riescono a superare i pori dello slit diaphragm, grazie anche alla flessibilità e alla forma elicoidale di questa molecola proteica. Studi sui ratti hanno dimostrato quali siano le concentrazioni fisiologiche di albumina nei diversi tratti del nefrone per valutare fisiologicamente la quantità di albumina filtrata dal glomerulo e riassorbita nei diversi segmenti tubulari del nefrone (**Figura 12**) (Tojo et al 2012).

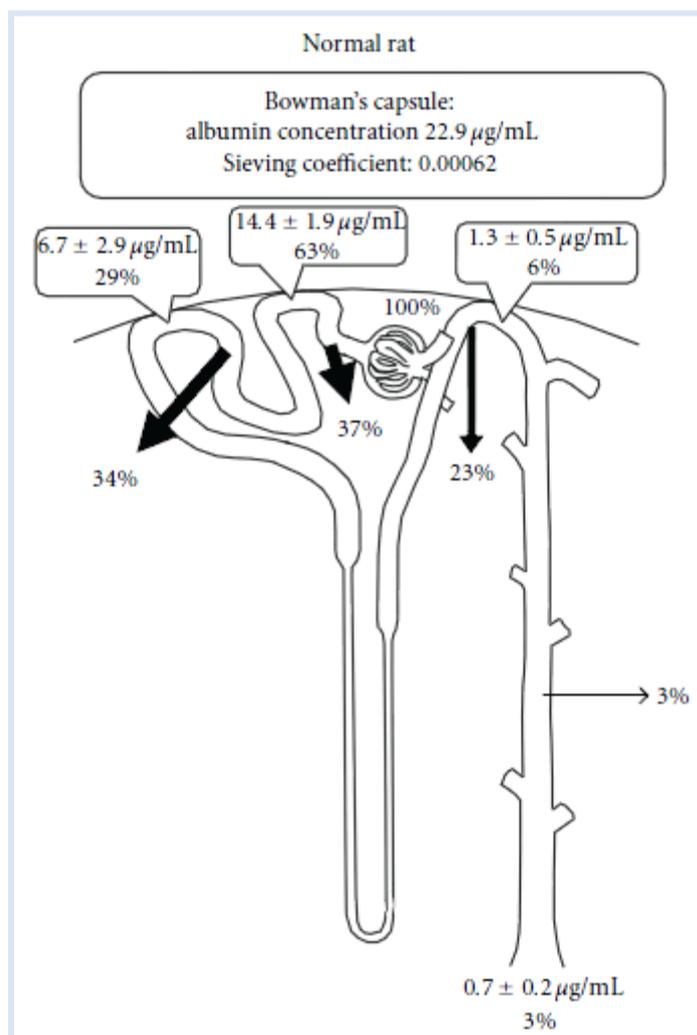


Figura 12: concentrazione di albumina lungo il nefrone calcolata con i dati ottenuti da studi di micropuntura frazionale sui ratti (Tojo et al, 2012)

La concentrazione di albumina in condizioni fisiologiche nella capsula di Bowman nel ratto è di 22.9 µg/ml, mentre la concentrazione nelle urine è di 0.2 µg/ml ± 0.7. Il riassorbimento tubulare dell'albumina avviene prevalentemente a livello di tubulo contorto prossimale, ma in minima parte anche nei segmenti distali del nefrone. Studi di medicina umana hanno stimato la quantità di albumina filtrata dal glomerulo e riassorbita a livello tubulare in 24 ore (**Tabella 8**) (Tojo et al 2012).

Tabella 8: filtrazione glomerulare e riassorbimento di albumine e di proteine a basso peso molecolare nell'uomo, stimate grazie ai dati ottenuti da studi di micropuntura sul ratto.

	Albumina	LMWP
Concentrazione nella capsula di Bowman	22.9 µg/mL	72.1 µg/mL
Concentrazione plasmatica	37.0 mg/mL	73.0 µg/mL
Sieving coefficient	0.00062	0.987
Filtrazione glomerulare stimata nell'uomo	22.9 µg/mL x 100mL/min x 24 h x 60 min = 3.3 g/day	72.1 µg/mL x 100 mL/min x 24 h x 60 min = 10.4 g/day
Riassorbimento tubulare stimato nell'uomo	3.2 g/day	9.6 g/day

LMWP, *low molecular weight protein*

Modificata Tojo et al, 2012

Hausmann e collaboratori hanno dimostrato, in uno studio del 2012, pubblicato sul *Current Opinion Nephrology Hypertension*, che i meccanismi di filtrazione glomerulare non sono dipendenti esclusivamente dalle dimensioni dei pori nello *slit diaphragm* e dalle cariche elettriche, ma sono anche regolati dalla forza di convezione, di diffusione e dalla differenza di potenziale trans membrana, che genera un flusso elettroforetico. Il flusso convettivo è conseguenza dalla differenza pressoria ai due lati della membrana glomerulare e avviene mediante il passaggio di molecole d'acqua. Il flusso diffusivo, che dipende dalla differenza di concentrazione tra i capillari glomerulari e l'urina contenuta nella capsula di Bowman, consente il meccanismo di filtrazione anche in assenza della pressione di filtrazione. Questi due meccanismi spiegano come le albumine possano in minima parte attraversare il filtro glomerulare. Hausmann e collaboratori ipotizzano la presenza di una differenza di potenziale ai due lati del capillare glomerulare, legata al passaggio più rapido attraverso il glomerulo di Cl⁻ e HCO³⁻ rispetto a Na⁺ e K⁺. Il flusso elettroforetico è

conseguenza di questa differenza di potenziale e impedisce alle albumine di essere filtrate (Hausmann et al 2012).

Nell'uomo è stato stabilito che, in condizioni fisiologiche la concentrazione di albumina, riscontrata nella capsula di Bowman, è di circa 1 mg/dl o lievemente superiore, mentre tutte le proteine a basso peso molecolare (inferiore a 40.000 D, raggio di 3 nm) come la β 2-microglobulina (raggio di 1.18 nm) vengono filtrate liberamente e riassorbite a livello tubulare (**Figura 13**) (D'Amico et al 2003).

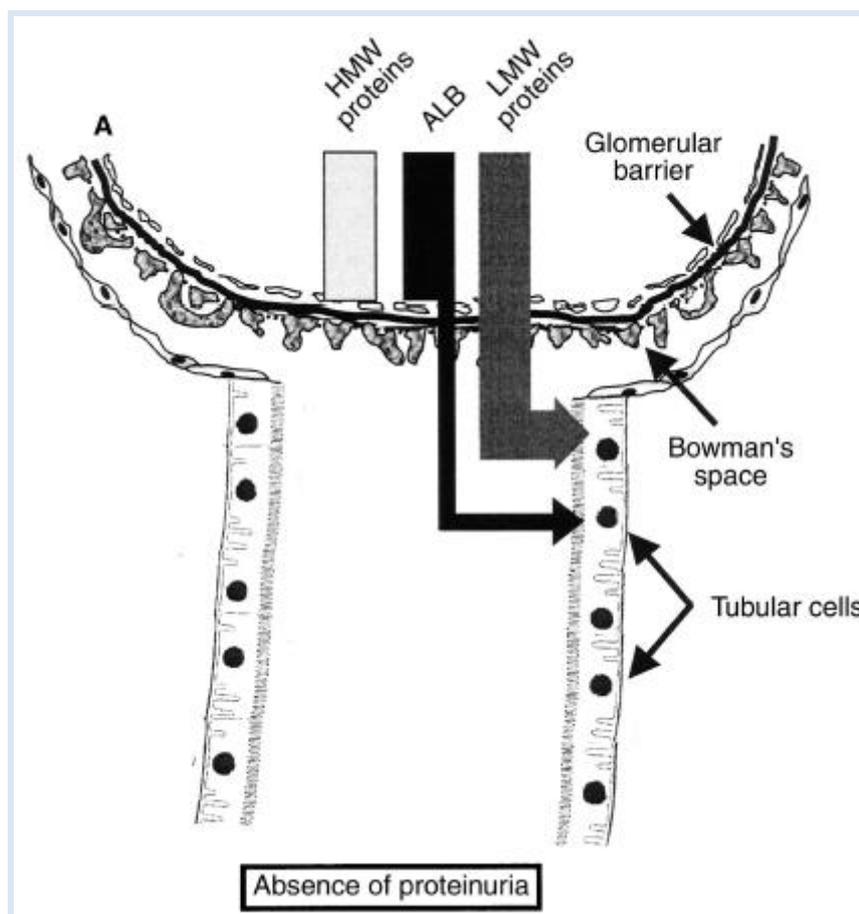


Figura 13: rappresentazione schematica del passaggio delle molecole proteiche dai capillari glomerulari al lume tubulare, riassorbimento tubulare ed escrezione urinaria. In condizioni fisiologiche, tutte le proteine LMW e una frazione di albumina passano attraverso la barriera di filtrazione glomerulare e sono completamente riassorbite dalle cellule tubulari (D'Amico et al, 2003)

Il riassorbimento tubulare delle proteine filtrate avviene prevalentemente nei segmenti S1 e S2 del tubulo contorto prossimale e in misura minore nel segmento S3. Le cellule epiteliali di questi segmenti contengono un apparato adibito all'endocitosi molto esteso e

caratterizzato da endosomi rivestiti e liberi, da prelisosomi e da lisosomi che permettono l'endocitosi delle proteine luminali, le quali vengono così concentrate all'interno di vescicole lungo il margine apicale della cellula tubulare. Gli endosomi contenenti le proteine migrano all'interno della cellula tubulare dove si fondono con lisosomi contenenti idrolasi acida che idrolizza le proteine. Gli aminoacidi prodotti attraversano la membrana tubulare "controluminale" e vengono reimmessi nella circolazione. Recentemente è stato visto che vi è competizione per il riassorbimento tubulare tra proteine aventi le stesse dimensioni e la stessa carica, perché il sistema di trasporto tubulare possiede una elevata capacità di trasporto, ma una bassa affinità. Nel caso dell'albumina, è stata evidenziata una bassa capacità di trasporto tubulare a basse concentrazioni di albumina presenti nel lume tubulare. Inoltre, il riassorbimento tubulare dell'albumina, come quello di tutte le altre proteine, lungo il segmento del tubulo contorto prossimale, è recettore-mediata. Megalina e cubilina, che sono localizzate nella porzione apicale dell'apparato endofitico, sono recettori ampiamente presenti sulle cellule tubulari, come già descritto nel Capitolo 1, e responsabili del legame con le proteine. Sono recettori che cooperano tra loro durante il riassorbimento proteico e sono, inoltre, poco selettivi nei confronti delle differenti frazioni proteiche. L'affinità di legame dipende dalla carica delle molecole proteiche. Le IgG, ad esempio, sono cariche positivamente e si legano, quindi, molto più rapidamente alla porzione apicale della cellula tubulare, che è carica negativamente: le proteine, pertanto, cariche positivamente vengono riassorbite a livello tubulare molto più rapidamente rispetto alle proteine cariche negativamente, come l'albumina. Questo meccanismo di competizione influisce sulla concentrazione nell'urina delle proteine filtrate (D'Amico et al 2003). L'interazione dell'albumina con la cellula tubulare non si limita al solo meccanismo di riassorbimento: sia le albumine che alcune sostanze legate alle albumine (come ad esempio gli acidi grassi) hanno uno stimolo profibrotico e proinfiammatorio sulla cellula tubulare, come descritto in seguito (Gekle 2005; Gorriz et al 2012; Birn et al 2006; Skalova 2005).

L'aumento dell'escrezione di proteine dipende, come già descritto nel Capitolo 1, da una aumentata filtrazione glomerulare per alterazioni della permeabilità della parete capillare, oppure dall'alterazione del riassorbimento tubulare. Le alterazioni della permeabilità sono secondarie alle modificazioni di cariche elettriche e all'aumento delle dimensioni dei pori per mutazioni a carico dei componenti dello slit diaphragm (nefrina, podocina, actina) e della membrana basale glomerulare (laminina) con conseguente

passaggio di albumine e di proteine ad alto peso molecolare (D'Amico et al 2003; Comper et al 2008).

Sono molte le alterazioni della barriera di filtrazione glomerulare che determinano perdita attraverso le urine di proteine e/o di albumina. Il danno alle cellule endoteliali contribuisce all'aumento della permeabilità all'albumina ed è secondario all'azione di citochine proinfiammatorie, di radicali liberi dell'ossigeno, dell'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, della dislipidemia e dell'iperglicemia. Difetti dei glicocalici endoteliali, contenenti eparan solfato proteoglicani, primariamente responsabili della carica negativa del filtro glomerulare, determinano una aumentata permeabilità proteica. In misura minore, anche le alterazioni della membrana basale glomerulare, contenente collagene e laminina, contribuiscono al passaggio delle proteine. Infine, le modificazioni dei podociti, caratterizzate da mutazioni di proteine podocita specifiche (es. nefrina), determinano proteinuria e/o albuminuria soprattutto nella nefropatia diabetica. In corso di nefropatia diabetica, infatti, si osservano una riduzione in numero e densità dei podociti, un allargamento dello spazio tra i processi pediformi, alterazioni dello *slit diaphragm*, alterazioni del citoscheletro di actina e una riduzione della carica negativa. Tutti questi cambiamenti a carico dell'endotelio, della membrana basale glomerulare e dei podociti sono il trigger per il passaggio dell'albumina nella capsula di Bowman. I fattori, che causano le modificazioni di queste strutture, sono le citochine proinfiammatorie e le adipochine. Il *Tumor Necrosis Factor* (TNF- α) provoca un aumento della permeabilità endoteliale, distrugge i glicocalici e aumenta la produzione di molecole di adesione alle cellule endoteliali. Le adipochine, la leptina e l'adiponectina determinano un aumento di dimensioni delle cellule adipose causando, in pazienti diabetici, uno stato proinfiammatorio con conseguente aumento dei livelli di TNF- α e di IL-6. La leptina aumenta la permeabilità vascolare e stimola il VEGF. Nei pazienti diabetici, l'iperglicemia determina un'alterata regolazione della produzione di alcuni mediatori come il TNF- α e stimola la produzione di radicali liberi dell'ossigeno che danneggiano in maniera diretta i glicocalici dell'endotelio glomerulare e alterano la comunicazione tra podociti e cellule endoteliali, determinando così albuminuria (Gorriz et al 2012; Hart 2005; Lees 2011; Hammelgarn et al 2010).

La presenza nelle urine di albumina e di proteine a intermedio peso molecolare viene definita proteinuria "selettiva". Queste proteine passano attraverso il filtro glomerulare e sono in quantità tale da superare la capacità di riassorbimento tubulare (**Figura 14**) (D'Amico et al 2003).

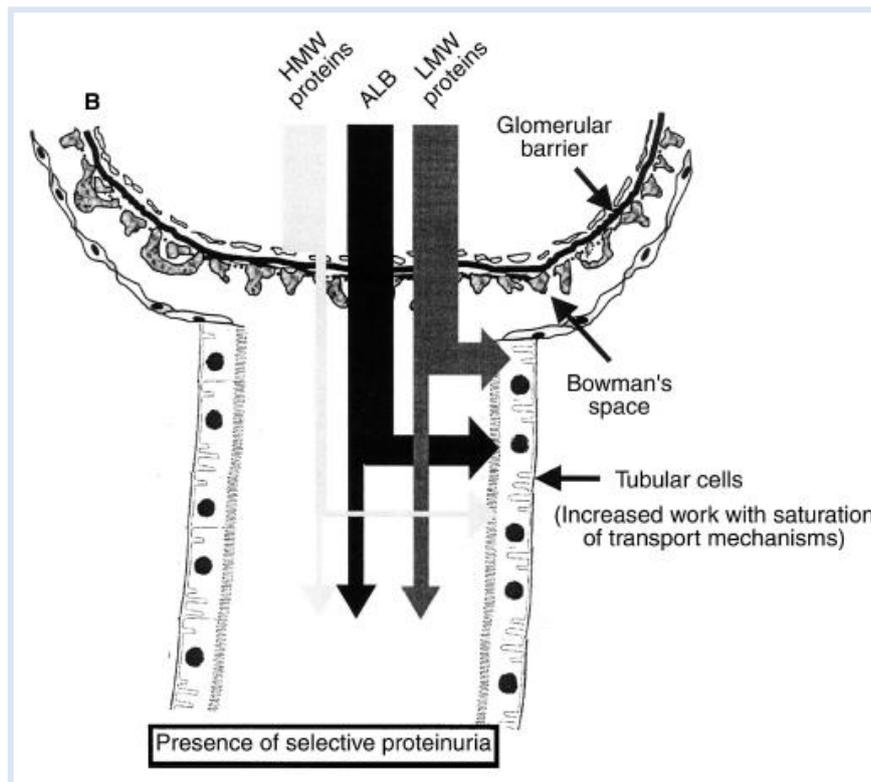


Figura 14: rappresentazione schematica del passaggio delle molecole proteiche dai capillari glomerulari al lume tubulare, riassorbimento tubulare ed escrezione urinaria. Quando l'alterazione della permeabilità della barriera di filtrazione glomerulare è moderata, si osserva un maggiore passaggio dal glomerulo al lume tubulare di proteine cariche negativamente (soprattutto di albumine): l'albumina e una piccola quantità di proteine HMW raggiungono il lume tubulare e saturano la capacità di riassorbimento delle cellule tubulari, determinando una perdita urinaria soprattutto di proteine LMW e di albumine e in minima parte anche di proteine HMW (proteinuria selettiva) (D'Amico et al, 2003)

Nel 1964 è stato definito il *selective index* (SI) che si ottiene confrontando la clearance delle IgG, come marker di proteine ad alto peso molecolare, con la clearance della transferrina, come marker di proteine a intermedio peso molecolare. Da allora si definisce proteinuria selettiva la presenza di un SI inferiore a 0.2. Le alterazioni patologiche, che esitano in proteinuria selettiva, sono caratterizzate da modificazioni di carica del filtro glomerulare e da alterazioni della dimensione dei pori dello slit diaphragm. Il danno a carico del glomerulo, infatti, determina una modificazione della barriera elettrostatica con conseguente riduzione delle cariche negative e passaggio dell'albumina. Studi di medicina umana hanno ampiamente documentato la perdita delle cariche anioniche e l'aumento delle

dimensioni dei pori nella *Minimal Change Nephropathy* e nello stadio albuminurico della nefropatia diabetica. La proteinuria “non selettiva”, invece, è caratterizzata da una quantità variabile di proteine ad alto peso molecolare che raggiungono il lume tubulare, in relazione all’entità del danno a carico del filtro glomerulare e alle modificazioni di carica dello stesso (**Figura 15 e 16**) (D’Amico et al 2003).

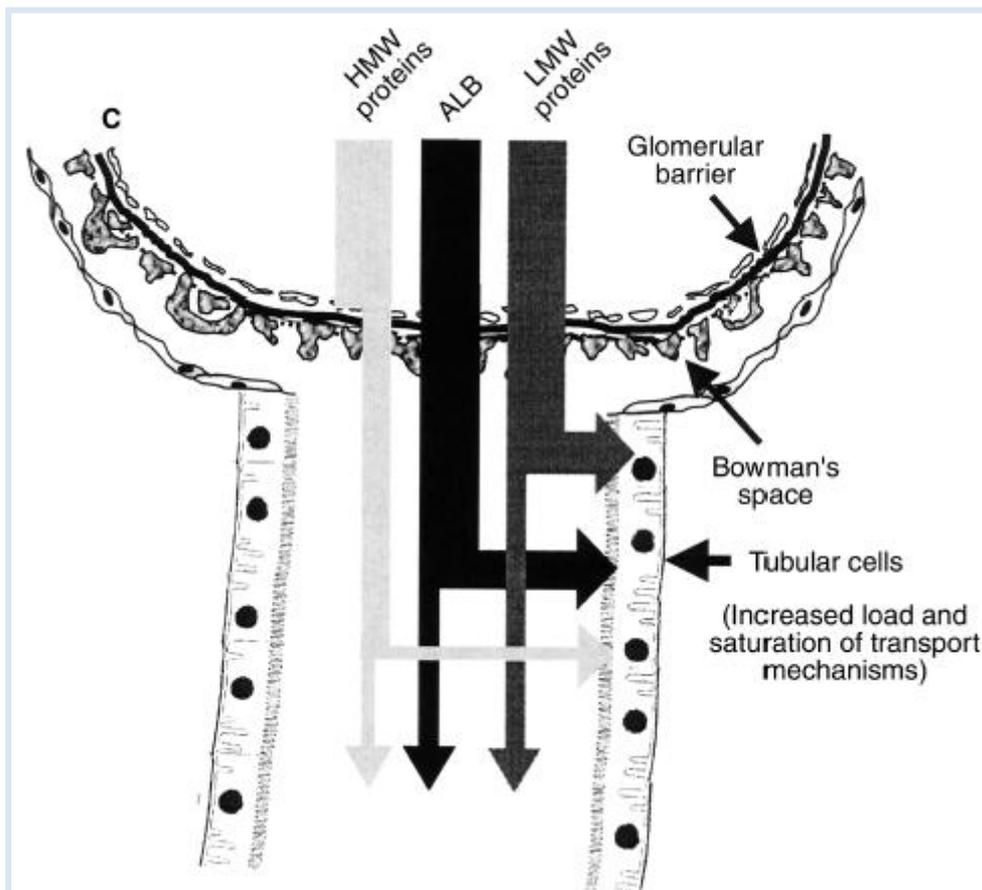


Figura 15: rappresentazione schematica del passaggio delle molecole proteiche dai capillari glomerulari al lume tubulare, riassorbimento tubulare ed escrezione urinaria. Un danno progressivamente più grave della barriera di filtrazione glomerulare aumenta la permeabilità a molecole proteiche di dimensioni sempre maggiori e, a causa della saturazione dei meccanismi di riassorbimento tubulari, una elevata percentuale di proteine HMW è escreta nelle urine (proteinuria non selettiva) (D’Amico et al, 2003).

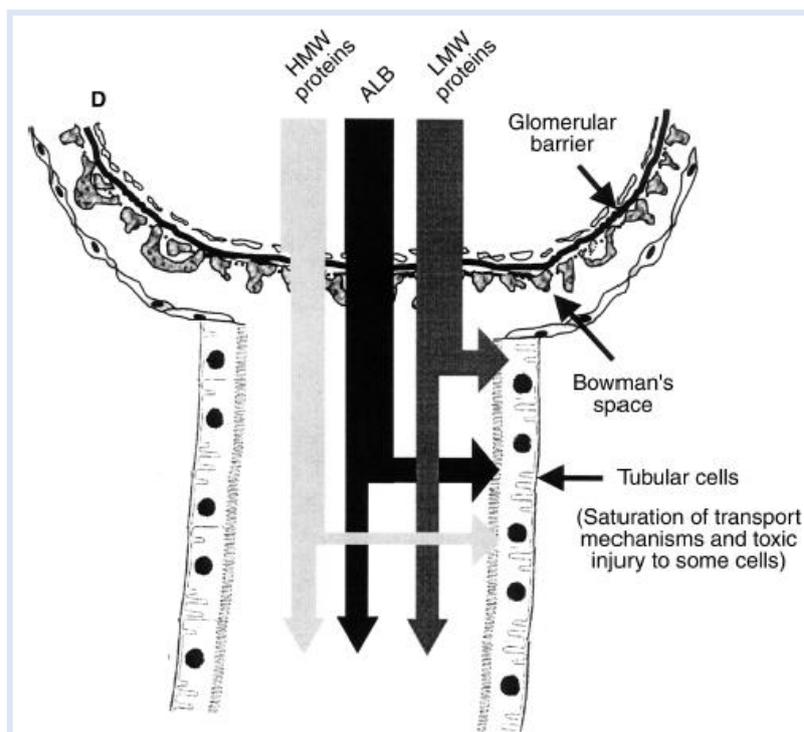


Figura 16: rappresentazione schematica del passaggio delle molecole proteiche dai capillari glomerulari al lume tubulare, riassorbimento tubulare ed escrezione urinaria. Un ulteriore aumento della permeabilità della barriera di filtrazione glomerulare e un massivo riassorbimento tubulare determina lesioni tossiche a carico delle cellule tubulari riducendo la loro capacità di riassorbimento proteico. Aumenta, quindi, l'escrezione urinaria di albumine, proteine LMW e HMW. Queste proteine rappresentano un *marker* di gravità del danno glomerulare e tubulare (D'Amico et al, 2003).

Studi di medicina umana sui ratti hanno, infine, dimostrato che, oltre alle alterazioni glomerulari di carica e strutturali, l'aumentata permeabilità glomerulare alle macromolecole è causata anche da alterazioni emodinamiche. La filtrazione delle proteine, infatti, dipende anche dal GFR dei singoli nefroni: flusso ematico glomerulare (QA), differenza di pressione idraulica transcapillare glomerulare (ΔP), concentrazione proteica plasmatica a livello di arteriola afferente (CA). E' chiaro, quindi, come alterazioni emodinamiche di pressione o di flusso possano influenzare direttamente la permeabilità del filtro glomerulare mediante modificazione delle dimensioni dei pori e alterazioni della concentrazione di cariche negative (D'Amico et al 2003; Gorriz et al 2012).

La quantità, il peso molecolare e il raggio delle proteine, che raggiungono il lume tubulare, aumentano progressivamente con l'aggravarsi del danno a carico della parete dei capillari glomerulari con la conseguente alterazione della Permeabilità. Nei casi meno gravi di proteinuria selettiva, passa attraverso il filtro glomerulare solo l'albumina (peso molecolare 69 kD; raggio 3.6 nm) (**Figura 14**). Con il peggioramento delle lesioni glomerulari, si riscontra un aumento progressivo di proteine ad alto peso molecolare nella capsula di Bowman: IgG (peso molecolare 150 kD; raggio 5.5 nm) (**Figura 15**); nei casi più gravi, si riscontrano nel lume tubulare anche molecole proteiche come l' α 2-macroglobulina (peso molecolare 720 kD; raggio 9 nm) e le IgM (peso molecolare 900 kD; raggio 12 nm) (**Figura 16**) (D'Amico et al 2003).

In condizioni fisiologiche, le proteine ad alto peso molecolare non riescono a raggiungere il lume tubulare (**Figura 13**). Le albumine, invece, si concentrano nello spazio di Bowman fino ad una quantità superiore ad un 1 mg/dl. Le proteine a basso peso molecolare (inferiore a 40 kD con raggio inferiore a 3 nm) passano liberamente attraverso il filtro glomerulare. In presenza di alterazioni strutturali e di carica del filtro glomerulare, aumenta la filtrazione delle proteine ad intermedio e ad alto peso molecolare, che rientrano nei meccanismi di riassorbimento da parte del tubulo contorto prossimale assieme alle proteine a basso peso molecolare. La saturazione dei siti recettoriali tubulari di legame con le proteine determina la perdita da parte del rene di proteine di tutte le dimensioni (**Figura 14 e 16**). Le albumine, captate dai recettori megalina e cubilina, entrano nelle cellule tubulari 6-15 minuti dopo la filtrazione e la loro degradazione avviene dopo 30-120 minuti. La quantità di proteine, riassorbite a livello tubulare, non è proporzionale alle frazioni filtrate: infatti, il processo di riassorbimento tubulare è influenzato dalla carica proteica: le IgG, cariche positivamente, sono riassorbite più facilmente delle albumine, cariche negativamente. Proteinurie massive e protratte nel tempo, secondarie ad un danno glomerulare cronico, esitano in alterazioni tubulari. Le cellule tubulari del tubulo contorto prossimale, infatti, subiscono alterazioni morfologiche e di funzionalità lisosomiale: eccessiva dilatazione delle vescicole endosomiali e perdita dell'orletto a spazzola apicale. Tali alterazioni determinano una riduzione del riassorbimento proteico di tutte le proteine filtrate, a cui segue una escrezione urinaria sempre maggiore di proteine a basso peso molecolare (**Figura 15 e 16**). La riduzione del riassorbimento di proteine a basso peso molecolare è direttamente correlata all'estensione del danno tubulare e tubulo interstiziale. Studi di medicina umana hanno dimostrato che la tossicità tubulare non è solo secondaria all'overload proteico, ma è anche dovuta ad alcune sostanze legate all'albumina, come ad

esempio gli acidi grassi, e al rilascio di citochine proinfiammatorie e a fattori di crescita, direttamente responsabili della risposta interstiziale infiammatoria e profibrotica. L'espressione o l'attivazione di alcune molecole segnale, quali NF- κ B, AP1, ERK1/2, stimola le cellule del tubulo contorto prossimale a sintetizzare diversi ormoni e citochine (es., RANTES, ET-1, MCP-1; IL-6; TNF- α) che trasducono il segnale dell'albumina nel tessuto interstiziale, dove il richiamo delle cellule infiammatorie e la stimolazione dei fibroblasti stimola la fibrosi tubulo interstiziale e la riduzione dell'apporto ematico alla midollare. Inoltre, le cellule del tubulo contorto prossimale, esposte ad elevate quantità di albumina, contribuiscono direttamente alla formazione di matrice extracellulare mediante secrezione di collagene tipo I, III e IV sotto lo stimolo di NF- κ B, PKC e PKA. Tutti questi meccanismi spiegano il motivo per cui la proteinuria è il più importante fattore di progressione delle patologie renali. E' fondamentale ricordare che è l'assorbimento dell'albumina da parte delle cellule tubulari la causa di tutte le alterazioni fisiopatologiche appena descritte. Infatti, è stato dimostrato che l'assenza di cubilina e di megalina, recettori tubulari che, legandosi all'albumina, ne determinano l'endocitosi, comporta una importante riduzione dell'infiammazione interstiziale. Lo stimolo profibrotico e proinfiammatorio è, quindi, indotto dall'endocitosi dell'albumina. Ciò spiega il motivo per cui non si riscontrano alterazioni patologiche in altri tessuti che hanno una concentrazioni simili di albumina nello spazio interstiziale. Inoltre, l'esposizione delle cellule del tubulo contorto prossimale all'albumina determina una aumentata produzione di TGF- β che induce una aumentata filtrazione di albumine e nello stesso tempo inibisce l'endocitosi mediata da megalina e cubilina. (D'Amico et al 2003; Gekle et al 2005; Tojo et al 2012; Gorriz et al 2012; Kerl 2010, Lee et al 2013; Storm et al 2012).

Le forme molecolari dell'albumina urinaria differiscono da quelle dall'albumina plasmatica, perché la filtrazione glomerulare e il riassorbimento tubulare causano modificazioni di questa proteina e il passaggio attraverso le vie urinarie può indurre proteolisi. Nelle urine molto concentrate, ossidanti, radicali liberi e altri ligandi possono esitare in modificazioni chimiche dell'albumina e anche lo stoccaggio può alterare la sua struttura. Il pH fisiologico dell'urina (pH 5-8) non determina modificazioni di forma dell'albumina, mentre pH inferiori a 4 e superiori a 8 determinano modificazioni conformazionali e spesso reversibili di questa proteina. L'albumina contiene un dominio di membrana Cisteina-34 che, se subisce modificazioni conformazionali, conferisce alla molecola di albumina la capacità di legarsi con diversi tipi di molecole. L'albumina ha, nel sangue circolante, un'emivita plasmatica di circa 20 giorni, durante i quali può subire

modificazioni chimiche: le reazioni con amminoacidi a catena laterale producono gruppi carbossilici e carbossimetilisina. Nel plasma dall'1 al 10% delle molecole di albumina sono glicate con il glucosio e la concentrazione di albumina glicata aumenta nei pazienti diabetici. La concentrazione maggiore di albumina glicata nelle urine rispetto al plasma è conseguenza della bassa efficienza tubulare nel riassorbimento dell'albumina glicata. Molti studi di medicina umana hanno evidenziato frammenti di albumina di dimensioni maggiori a 5 kDa nelle urine e la quantità di questi frammenti è maggiore in presenza di patologie renali e in stoccaggi prolungati a - 20 °C. Tali frammenti sono stati sequenziati e alcuni sono stati riscontrati anche nel plasma. Frammenti di dimensioni comprese tra 500 e 5.000 Da sono stati identificati sia nelle urine che nel plasma in pazienti con malattia renale cronica. La filtrazione glomerulare è influenzata dalla carica e dalla dimensione della molecola, come precedentemente descritto, quindi frammenti di albumina carichi positivamente, che si sono formati nel plasma, vengono rapidamente eliminati con le urine nel rene sano. Nel plasma sono stati evidenziati diversi frammenti di albumina deleva per gli amminoacidi 1 o 2 N-terminali oppure 1,6 o 13 C-terminali. Nel plasma di un paziente sano il 4-15% di albumina è deleva per il residuo di leucina C-terminale, mentre nei pazienti critici questa forma di albumina è quella maggiormente riscontrata nel plasma e nelle urine. Proteasi contenute nella vie urinarie possono determinare la formazione di frammenti di albumina o possono modificarli sia nelle vie urinarie sia durante lo stoccaggio. Infine, molte albumine riassorbite dalle cellule tubulari vengono solo parzialmente digerite e alcuni frammenti vengono escreti nelle urine (Miller et al 2009; Johnson et al 2010).

2.2 Importanza clinica dell'albuminuria

Le implicazioni cliniche dell'albuminuria sono state ampiamente studiate in medicina umana negli ultimi anni. E' stato osservato che l'albuminuria può essere associata a ipertensione, a iperlipidemia, a infiammazione, a diabete mellito tipo I, a resistenza all'insulina in pazienti con diabete mellito tipo I e II e in pazienti non affetti da diabete mellito, a malattia renale cronica. Può essere considerata come marker predittivo di ischemia cardiaca e spesso è concomitante alla presenza e alla progressione di calcificazioni cardiovascolari. Inoltre, l'albuminuria è correlata ad anomalie funzionali dei vasi sanguigni: tecniche diagnostiche specifiche hanno confermato una associazione tra albuminuria e riduzione della vasodilatazione periferica, dovuta probabilmente a una riduzione della produzione di ossido nitrico endoteliale. La presenza di piccole quantità di albumina nelle urine, definita come *Low Grade Albuminuria* (LGA), può essere fisiologica, secondaria, quindi, al tipo di esercizio fisico, alla postura eretta, al ritmo circadiano, all'ipossia da altitudine e all'ischemia miocardica. Questo tipo di albuminuria, normalmente, si risolve una volta eliminata la causa scatenante. Non ci sono in letteratura studi che correlino la LGA con l'istologia renale, quindi non si sa come le alterazioni sistemiche appena descritte possano modificare la struttura nel nefrone. Comunque, la maggior parte delle condizioni patologiche che esitano in albuminuria influiscono sull'emodinamica renale, determinando una riduzione della vasoregolazione intrarenale, ipertensione e iperfiltrazione glomerulare (Danziger 2008; Zamora et al 2009; Hartmann et al 2008).

E' ampiamente descritta, in medicina umana, l'associazione tra albuminuria e complicanze cardiovascolari, secondarie all'arterosclerosi e all'ipertensione, sia in pazienti con malattia renale cronica sia nella popolazione generale. Hillege e collaboratori, in un lavoro del 2002 in cui hanno considerato alcuni dati ottenuti con lo studio PREVEND (*Prevention of Renal and Vascular End Stage Renal Disease*), hanno valutato l'associazione tra rischio cardiovascolare a albuminuria nella popolazione e hanno sottolineato che un aumento da 5 a 10 mg/L di albumina nelle urine è associato a un aumento del 29% di rischio di morte per patologie cardiovascolari (Danziger 2008; Smink et al, PREVEND Study, 2012; Singh et al 2011; Konta et al 2013; Van Der Velde et al 2011). Nello studio RENAAL del 2004, che ha randomizzato 1.513 pazienti affetti da diabete di tipo II, in un gruppo placebo e in un

gruppo trattato con Losartan, si osserva che per ogni 50% di riduzione dell' albuminuria si verificano una riduzione del 18% di rischio cardiovascolare e del 24% di sviluppo di insufficienza cardiaca. Risultati simili sono stati ottenuti dal trial clinico LIFE, in cui le variazioni di albuminuria sono state messe in relazione al rischio cardiovascolare come endpoint primario, dimostrando che il rischio cardiovascolare diminuiva con la riduzione dei livelli di albuminuria nel follow up (Cravedi et al 2013; Luczak et al 2011; Peixoto et al 2013).

La valutazione della funzionalità renale nei pazienti con malattia renale cronica e patologie cardiovascolari è fondamentale nella pratica clinica per il suo valore diagnostico e soprattutto prognostico. Il rischio di complicanze cardiovascolari aumenta in concomitanza di un calo del GFR sotto i $75 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ e del riscontro di LGA. E' nota una stretta correlazione tra funzionalità renale e escrezione delle albumine e rischio cardiovascolare. Pazienti con una grave riduzione della funzionalità renale ($\text{GFR} < 45 \text{ mL/min/1.73 m}^2$) e un rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria (ACR) nella norma ($\text{ACR} < 5 \text{ mg/g}$ nell'uomo, $\text{ACR} < 7 \text{ mg/g}$ nella donna), non hanno un rischio statisticamente significativo di sviluppare patologia cardiovascolare, mentre pazienti con una riduzione della funzionalità renale e albuminuria hanno un rischio 5-8 volte superiore di sviluppare patologia cardiovascolare. E' chiaro, quindi, che parte dell'aumentato rischio di sviluppare patologie cardiovascolari in pazienti con malattia renale cronica è legato alla presenza dell'albuminuria. Negli stadi iniziali di malattia renale cronica, l'aumento dell'escrezione urinaria di albumina sembra più significativa della riduzione del GFR (Danziger 2008; Waheed et al 2012; Gupta et al 2012; Levey et al 2012; Konta et al 2013; Wei et al 2012). In medicina umana già dal 1991, in uno studio di Woo e collaboratori, è stato stabilito che la presenza di proteine urinarie a basso peso molecolare aveva una associazione significativa con l'aumentata incidenza di malattia renale cronica dopo 6 anni di follow up. Numerosi studi hanno ottenuto, negli anni successivi, gli stessi risultati. La presenza nelle urine di proteine a basso peso molecolare, infatti, è in grado di prevedere la progressione della malattia renale cronica, perché è associata in modo significativo all'aumento dei livelli sierici di creatinina, ad una proteinuria più marcata e ad un danno tubulo interstiziale più grave (D'Amico et al 2003; Kronenberg et al 2009). I meccanismi, con cui la proteinuria accelera la progressione del danno renale fino all'*End Stage Renal Disease* (ESRD), includono l'induzione dell'espressione di chemochine tubulari, l'attivazione del complemento e l'attivazione di NF-kB con conseguente infiltrazione di cellule infiammatorie nell'interstizio e fibrogenesi come descritto precedentemente. Johnson e

collaboratori, nel 2012, pubblicano una *position statement* riguardo la misurazione dell'albuminuria o della proteinuria in pazienti a rischio di malattia renale cronica o affetti da tale patologia, per i quali il gruppo di lavoro raccomanda la misurazione dell'albumina urinaria piuttosto che della proteinuria. Infatti, è stato visto che l'albuminuria identifica il rischio di sviluppare danno renale cronico e patologie cardiovascolari; trial interventistici hanno dimostrato gli effetti renoprotettivi associati alla riduzione dell'escrezione urinaria di albumina. La popolazione a rischio di malattia renale cronica comprende pazienti con diabete mellito, ipertesi, obesi, fumatori, affetti da patologie cardiovascolari o con una storia familiare di malattia renale cronica. I fattori da considerare nell'interpretazione dell'albuminuria in questi pazienti sono anche il sesso e l'età: l'escrezione urinaria di creatinina è influenzata dalla massa muscolare, quindi nell'uomo sarà maggiore del 40%-50% rispetto alla donna. L'albuminuria può essere transitoria, pertanto l'interpretazione della misurazione ottenuta deve tenere presente i fattori che, oltre alla malattia renale cronica, possono influenzare l'escrezione dell'albumina: infezioni della vie urinarie, elevato apporto dietetico di proteine, insufficienza cardiaca congestizia, patologie febbrili, intenso esercizio fisico che supera le 24 ore, ciclo mestruale o alterazioni vaginali, farmaci (antiinfiammatori non steroidei, ACE inibitori, bloccanti i recettori dell'angiotensina) (Johnson et al 2012, Schiffrin et al 2007; Hall et al 2011). Connell e collaboratori, nel 2013, pubblicano un *executive summary* dei dati riportati dallo studio KEEP (*Kidney Early Evaluation Program*) del 2012, che raccoglie i dati relativi alla diagnosi precoce, alle complicanze e alla mortalità della malattia renale cronica. I dati forniti dallo studio KEEP evidenziano che il calo concomitante del GFR con il riscontro di albuminuria è un fattore prognostico negativo in corso di malattia renale cronica, determinando un aumento del rischio di mortalità e di progressione a ESRD, rispetto alla presenza di una sola delle due alterazioni clinico patologiche. L'albuminuria prevede la mortalità in pazienti con malattia renale cronica, mentre il calo del GFR è un forte indicatore di progressione a ESRD. L'albuminuria, infatti, è un indicatore predittivo di mortalità più forte rispetto al calo del GFR. In studi precedenti allo studio KEEP, l'efficacia prognostica dell'albuminuria in pazienti non diabetici era modesta, ovvero il rischio di mortalità era solo di 1.5-2 volte superiore rispetto al calo del GFR. Astor e collaboratori, in uno studio del 2008, utilizzando i dati dello studio NHANES (*National Health and Nutrition Examination Survey*), riscontrano un rischio di morte doppio in pazienti albuminurici in 9 anni di follow up. Nello studio KEEP si definisce come l'impatto prognostico dell'albuminuria sia nettamente superiore rispetto a quello del GFR (Connell et al 2012; Amin et al 2013;

Chang et al 2012; Amin et al 2012; Astor et al 2011; Johnson et al 2012; Meda et al 2013, Shalipak et al 2005, Jong et al 2009).

L'albuminuria è stata ampiamente studiata, in medicina umana, anche come fattore prognostico in pazienti con Diabete mellito tipo I e II per il suo ruolo nella patogenesi e nella progressione della malattia renale cronica. I meccanismi eziopatogenetici, causa di albuminuria nei pazienti diabetici, comprendono danni a carico di tutte le strutture del nefrone riassunti in **Tabella 9** (Jefferson et al 2008; Kim et al 2012). I fattori scatenanti la nefropatia diabetica comprendono iperglicemia, insulino resistenza, ipertensione, dislipidemia, anemia, stato procoagulante, fattori etnici, fumo di sigaretta (Bloom et al 2013; Peres et al 2013; Saraheimo et al 2008). Newman e collaboratori, in una systematic review del 2005, analizzano i dati presenti in letteratura sulla misurazione dell'albumina urinaria come fattore prognostico indipendente per lo sviluppo delle complicazioni diabetiche, delle nefropatie e delle retinopatie. In pazienti con diabete mellito tipo I, l'albuminuria ha un significato prognostico debole per l'incidenza della retinopatia e non ci sono evidenze che dimostrino la sua capacità di permettere di prevedere lo sviluppo di tale complicanza. L'albuminuria, invece, ha un forte significato prognostico per lo sviluppo di retinopatia proliferativa. In pazienti con diabete mellito tipo II, non ci sono evidenze che dimostrino il significato prognostico dell'albuminuria sull'incidenza di retinopatia e la correlazione tra albuminuria e progressione della retinopatia o sviluppo di retinopatia proliferativa è debole. In pazienti con diabete mellito tipo I e II, ci sono evidenze che dimostrano un calo significativamente maggiore del GFR in presenza di albuminuria e una più rapida progressione della malattia renale cronica a ESRD (Newman et al 2005; Hellemons et al 2012; Sacks et al 2011).

Tabella 9: eziopatogenesi della proteinuria in corso di nefropatia diabetica

Site of Injury	effetti	Meccanismi eziopatogenetici
Alterazioni emodinamiche glomerulari	Iperfiltrazione glomerulare	Vasodilatazione arteriola afferente Vasocostrizione arteriola efferente Aumento della pressione glomerulare
Cellule endoteliali glomerulari	Danno alle cellule endoteliali	Iperglicemia, AGE; ROS
GMB	Riduzione dei glicocalici endoteliali Alterazione del segnale VEGF Assottigliamento irregolare	Danno alle cellule endoteliali Perdita o danno podocitario ↓ della produzione e/o ↑ della degradazione della matrice extracellulare
	Riduzione delle cariche negative	↓ della produzione e/o ↑ della degradazione di HSPG
Podociti	Podocitopenia	Distacco, apoptosi, mancata proliferazione
	Perdita dell'integrità dello slit diaphragm Allargamento dei processi pediformi	Riduzione o cambiamenti di localizzazione della nefrina Distruzione del citoscheletro di actina Perdita dell'integrità dello slit diaphragm Mancata interazione tra podociti
	Perdita di cariche negative	↓ podocalicina
Tubulo contorto prossimale	Riduzione del riassorbimento proteico	Danno tubulare e fibrosi interstiziale

Modificata Jefferson et al 2008

AGE, Advanced Glycosylation End products; GBM, glomerular basement membrane; HSPG, heparin sulfate proteoglycan; ROS, reactive oxygen species; VEGF, vascular endothelial growth factor

In medicina veterinaria, gli studi inerenti l'importanza clinica della misurazione dell'albuminuria nel cane e nel gatto per la diagnosi precoce e soprattutto come fattore prognostico di malattia renale cronica, diabete mellito e patologie cardiovascolari sono limitati. Inoltre, non è ancora stato determinato come l'identificazione precoce di pazienti albuminurici possa influire sul trattamento terapeutico e sulla prognosi. Uno studio epidemiologico su più di 3.000 cani dimostra che la prevalenza dell'albuminuria è del 24.7%. La prevalenza è significativamente più bassa in cani giovani rispetto agli anziani (4% a 1 anno di vita, 55% a 15 anni di vita) (Radecki et al 2003; Polzin 2010; Polzin 2011). Studi relativamente recenti dimostrano che l'albuminuria è un buon indicatore di

danno renale precoce nel cane, soprattutto in presenza di patologie glomerulari. Lees e collaboratori, nel 2002, pubblicano un lavoro sulla misurazione dell'albuminuria persistente in cani maschi affetti da nefropatia ereditaria *X-Linked*, nella quale la rapida progressione della patologia glomerulare è causata da un difetto del collagene tipo IV della membrana basale glomerulare. Nei cani inclusi nello studio, le lesioni alla membrana basale glomerulare iniziano a manifestarsi a 8 settimane di vita. Albuminuria persistente è stata riscontrata tra le 8 e le 23 settimane di vita, da 0 a 16 settimane prima dell'insorgenza di proteinuria, che ha iniziato a manifestarsi a 14-30 settimane di vita. Gli autori concludono che l'albuminuria può essere considerata come un marker precoce di sviluppo di malattia renale (Lees et al 2002; Grauer 2007; Nabity et al 2007; Nabity et al 2012). Nello stesso anno, Grauer e collaboratori studiano lo sviluppo di albuminuria in 12 cani con filariosi cardiopolmonare. Tutti i cani hanno sviluppato albuminuria, ma nell'82% di cani è stata riscontrata la presenza di albumina urinaria dopo 14-23 mesi dall'infezione. In questi pazienti, è stato osservato che l'albuminuria peggiora nel tempo e che precede lo sviluppo di proteinuria. L'istologia renale ha evidenziato la presenza di glomerulopatia (Grauer et al 2002; Grauer 2007; Nabity 2011). Vaden e collaboratori nel 2001, in uno studio longitudinale, hanno valutato la presenza di albuminuria nei Soft-Coated Wheaten Terriers, razza a rischio di sviluppo di enteropatia proteino-disperdente. La gravità dell'albuminuria aumentava nel tempo e il 43% dei cani albuminurici hanno poi sviluppato proteinuria. Grazie a prelievi biotici renali gli autori hanno dimostrato che l'insorgenza di albuminuria persistente corrispondeva all'insorgenza di glomerulosclerosi e a ipercellularità mesangiale (Vaden et al 2001; Grauer 2007; Nabity et al 2011). Syme e collaboratori, in uno studio del 2006, valutano la relazione tra proteinuria e sopravvivenza in gatti con malattia renale cronica ipertesi o non ipertesi e dimostrano che la proteinuria e la concentrazione plasmatica di creatinina sono correlate con la sopravvivenza (Syme et al 2006). Bacic e collaboratori pubblicano nel 2010 uno studio che valuta l'albuminuria in relazione alla pressione sistolica in corso di malattia renale cronica nel cane. L'obiettivo dello studio è di determinare la prevalenza e l'entità dell'albuminuria nei cani e di comprendere come l'ipertensione sia associata ad un aumento dell'escrezione urinaria di albumina. Nello studio vengono inclusi 39 cani sani e normotesi nel gruppo di controllo e 40 cani affetti da malattia renale cronica. In tutti i cani viene effettuata un'analisi delle urine, viene misurata la pressione sistolica e l'albuminuria mediante elettroforesi, ELISA e UAC. Gli autori riscontrano una differenza statisticamente significativa nell'UAC tra cani affetti da malattia renale cronica e gruppo di controllo. Il 32,5% dei cani con malattia

renale cronica ha un UAC tra 0.03 e 0.3, mentre il 50% ha un UAC > 0.3. Il 16% dei cani con malattia renale cronica ha una pressione sistolica maggiore di 180 mmHg e in questi cani l'UAC è statisticamente più alto rispetto ai cani con malattia renale cronica non ipertesi (pressione sistolica < 180 mmHg). Cani ipertesi con malattia renale cronica e UPC > 1.0 hanno anche un UAC > 0.3, mentre quelli con UPC compreso tra 0.5 e 1.0 hanno un UAC compreso tra 0.03 e 0.3. Cani con UPC < 0.5 non sono albuminurici. Gli autori concludono che l'UAC in cani ipertesi con malattia renale cronica è più elevato rispetto a cani non ipertesi (Bacic et al 2010; Raila et al 2010; Raila et al 2011; Stevens et al 2010).

La nefropatia diabetica non viene diagnosticata di routine in medicina veterinaria. Nel gatto, a volte, non viene definita la causa di malattia renale cronica, ma studi datati hanno evidenziato in gatti diabetici alterazioni glomerulari paragonabili a quelle che vengono riscontrate in medicina umana in corso di nefropatia diabetica. Inoltre, in cani e gatti diabetici si possono osservare alcuni fattori di rischio e alcune alterazioni clinico-patologiche compatibili con la classificazione della nefropatia diabetica dell'ADA (*American Diabetes Association*), quali azotemia renale, proteinuria e ipercolesterolemia. In letteratura veterinaria, c'è un solo studio, pubblicato da Ghazlat e collaboratori nel 2011, sulla prevalenza dell'albuminuria e della proteinuria in gatti con diabete mellito effettuato confrontando i risultati con quelli ottenuti dal gruppo di gatti sani e dal gruppo di gatti affetti da altre patologie. Lo studio dimostra una prevalenza del 70% dell'albuminuria in gatti diabetici, significativamente più alta rispetto al gruppo di controllo di gatti sani (18% albuminurici) e al gruppo di gatti affetti da altre patologie (45.7% albuminurici). La prevalenza dell'albuminuria, in gatti affetti da altre patologie, è in accordo con quanto riportato in letteratura in uno studio del 2004 di Turman e collaboratori, che evidenziano una prevalenza del 70% dell'albuminuria in gatti in terapia intensiva. Inoltre, il 65% dei gatti diabetici ha un UPC > 0.4, significativamente più elevato rispetto al gruppo di controllo. Gli autori sottolineano una debole correlazione tra UPC e albuminuria. Il 38% di gatti con UPC < 0.4 sono albuminurici. Lo studio dimostra che i gatti diabetici hanno una prevalenza di albuminuria maggiore rispetto ai gatti sani (Ghazlat et al 2011; Bloom et al 2013; Ruggenti et al 2012; Wheeler et al 2013).

Recentemente, la proteinuria è stata studiata anche in corso di SIRS nel cane. La massiva produzione di citochine proinfiammatorie e l'attivazione della cascata coagulativa determinano trombosi microvascolari, danni alle cellule endoteliali con aumento della permeabilità capillare cui segue tissutale e insufficienza multiorganica. A livello renale, le alterazioni a carico dei capillari glomerulari determinano una aumentata escrezione

urinaria di proteine plasmatiche. Vaden e collaboratori, nel 2010, studiano la prevalenza dell'albuminuria in cani e gatti ricoverati in terapia intensiva o sottoposti a protocolli anestesiológicos, riscontrando albuminuria nel 70% dei cani inclusi nello studio. Dimostrano, inoltre, una maggiore prevalenza di albuminuria in cani che muoiono o che vengono soppressi entro tre giorni dall'ammissione in terapia intensiva rispetto a cani che vivono per più di tre giorni (Vaden et al 2010; Schaefer et al 2011; Cho et al 2013). Schaefer e collaboratori, nel 2011, pubblicano uno studio sulla valutazione qualitativa e quantitativa delle proteine urinarie in cani con SIRS evidenziando un aumento dei livelli di UPC, UAC e URBPC, ma non danno un significato prognostico a tali alterazioni clinico patologiche (Schaefer et al 2011). Whittemore e collaboratori, nello stesso anno, dimostrano una associazione statisticamente significativa tra albuminuria e sopravvivenza in cani in terapia intensiva (Whittemore et al 2011; Whittemore et al 2011).

La correlazione tra albuminuria e ipertensione, in medicina veterinaria, è stata anche riportata in corso di iperadrenorticismo in uno studio di Lien e collaboratori del 2010 che evidenzia una maggiore incidenza di albuminuria in cani affetti da tale patologia rispetto a cani sani (Lien et al 2010; Yu-Hsin et al 2010; Smets et al 2010; Caldi net al 2009; Wehener et al 2008).

Studi più datati riportano misurazioni dell'albuminuria in cani che effettuano attività fisica intensa. Gary e collaboratori analizzano gli effetti dell'esercizio fisico sull'escrezione urinaria di albumina in 26 cani sani e concludono che i cani che sviluppano albuminuria dopo esercizio fisico intenso variano tra lo 0 e il 15% (Gary et al 2004).

In letteratura veterinaria, sono pochi gli studi sull'albuminuria nel cane in corso di patologie sistemiche. Whittemore e collaboratori nel 2006 pubblicano un lavoro sulla misurazione dell'albuminuria in cani affetti da patologie neoplastiche, infettive, immunomediate, infiammatorie e da infezioni delle vie urinarie (Pressler et al 2003; Whittemore et al 2006).

2.3 Metodi di misurazione e implicazioni cliniche

L'albuminuria, come la proteinuria, può essere misurata con metodi semiquantitativi, quantitativi e qualitativi, in parte descritti nel Capitolo 1. In medicina umana, Gorriz e collaboratori pubblicano, nel 2012, le raccomandazioni generali per la misurazione della proteinuria e/o dell'albuminuria. Gli autori raccomandano tale misurazione in pazienti con malattia renale cronica e a rischio di malattia renale cronica per identificare il rischio di progressione del danno renale e per valutare morbilità e mortalità cardiovascolari. La misurazione e il monitoraggio devono essere di tipo quantitativo negli adulti utilizzando le urine del mattino, nei bambini non affetti da patologia diabetica e nei bambini affetti da diabete mellito da almeno 5 anni dopo la pubertà. Gli autori consigliano il monitoraggio dell'albuminuria con metodi qualitativi in pazienti con malattia renale cronica proteinurica e raccomandano l'utilizzo delle prime urine del mattino per la buona correlazione dimostrata con l'escrezione di albumina e di proteine delle 24 ore. Se le urine non vengono immediatamente analizzate devono essere conservate a -70°C e scongelate a temperatura ambiente. La concentrazione di proteine e/o di albumine deve essere sempre confrontata con l'escrezione urinaria di creatinina e i risultati devono essere espressi in mg/gr oppure mg/mmol (Gorriz et al 2012; Montero et al 2012). Gli autori fanno riferimento alle linee guida, alle raccomandazioni e alle *position stateret* pubblicate da 7 organizzazioni nel 2002 (Miller et al 2009).

Nel cane e nel gatto è indicato misurare l'albumina urinaria quando si sospettano falsi positivi con la misurazione della proteinuria, quando cani e gatti anziani sani non risultano negativi alla misurazione della proteinuria, quando cani e gatti giovani e sani sono negativi alla misurazione della proteinuria, ma hanno un rischio familiare di sviluppare patologie renali proteinuriche, quando la misurazione della proteinuria dà esito negativo in cani e gatti con patologie croniche associate a patologie renali proteinuriche e quando misurazioni precedenti dell'albuminuria hanno dato esito positivo ed è quindi necessario monitorare la persistenza o la progressione dell'albuminuria (Grauer 2007).

I fattori preanalitici che possono influenzare l'escrezione dell'albumina urinaria comprendono l'esercizio fisico, la febbre e l'ortostasi (**Tabella 10**) (Miller et al 2009).

Tabella 10: fattori preanalitici che influenzano l'escrezione urinaria di albumine

Fattori preanalitici che influenzano l'escrezione urinaria di albumine		
	Effetto sull'escrezione urinaria di albumine	Conseguenze per la misurazione delle albumine urinarie
Esercizio fisico	Aumento	Non effettuare la misurazione dopo esercizio fisico intenso (evidenze non congruenti)
Febbre	Aumento	Non effettuare la misurazione entro tre giorni dalla scomparsa della febbre
Batteri uria asintomatica	Nessuno	Non è necessario diagnosticare batteriuria asintomatica
Postura (ortostasi)	Aumento	Ripetere l'esame con le prime urine del mattino se si rileva un aumento dell'escrezione urinaria di albumine in un giovane o adolescente

Modificata Miller et al 2009

Questi dati sono stati ottenuti mediante ricerca su *PubMed* utilizzando le parole “*urine albumin*” o “*microalbuminuria*” o “*microalbumin*” in associazione a “*exercise*” o “*fever*” o “*batteriuria*” o “*urine tract infection*” rispettivamente. “*proteinuria*” è stata utilizzata in combinazione con “*orthostatic*” o “*postural*”. Sono stati esaminati tutti gli articoli e le referenze.

Le albumine urinarie possono subire modificazioni legate al prelievo e allo stoccaggio. La superficie dei contenitori per le urine può adsorbire albumine determinandone un calo significativo. Superfici idrofile possono adsorbire una quantità di albumine urinarie inferiore a 1 mg/dl, mentre superfici non idrofile anche fino a 2 mg/dl. L'assorbimento e la successiva denaturazione delle albumine urinarie può essere ridotta utilizzando un detergente non ionico. L'albumina risulta essere relativamente stabile a livello di interfaccia aria-urina, quando si forma schiuma mescolando rapidamente le urine con il detergente non ionico. Per lo stoccaggio a lungo termine e la stabilità del campione di urina per la misurazione dell'albumina, si trovano diverse raccomandazioni in letteratura. I campioni di urina sono stabili per lunghi periodi se stoccati a -80 °C. Lo stoccaggio a temperature superiori ai -80°C, soprattutto a -20°C, determinano diverse modificazioni dell'albumina. Per i test di laboratorio di routine si preferisce l'utilizzo di urine fresche prese per caduta. L'albumina risulta stabile se stoccata a 2-8 °C per 7 giorni. Sembra che i batteri e le proteasi causino modificazioni dell'albumina nei campioni di urine, ma l'effetto sulla misurazione delle albumine da campioni stoccati non è mai stato studiato. Lo scongelamento delle urine a 37 °C aumenta l'attività delle proteasi. Le possibili

interferenze legate alla presenza di batteri e di proteasi si possono evitare centrifugando le urine prima dello stoccaggio (Miller et al 2009; Willard et al 2004; Schults et al 2000).

In medicina veterinaria, i test semiquantitativi disponibili per la misurazione dell'albumina urinaria sono tre: dipstick, SSA e test semi-quantitativi immunoenzimatici rapidi (*point of care* semiquantitativi). Il dipstick è in grado di misurare livelli di albuminuria superiori a 300 mg/dl. Fisiologicamente, da studi di medicina umana, l'escrezione giornaliera massima di proteine urinarie è di 150 mg/dl di cui al massimo 30 mg sono albumine, quindi il dipstick non è in grado di rilevare un'albuminuria patologica compresa tra 30 e 300 mg/dl (Danziger 2008; Smets et al 2011). Nel cane e nel gatto la concentrazione urinaria di albumine considerata normale è inferiore a 1 mg/dl (Harley et al 2012; Lees 2004; Nagrebetsky et al 2012; Samal et al 2013). Nella pratica clinica il dipstick è il metodo più comunemente utilizzato ed è più sensibile alle albumine rispetto alle altre frazioni proteiche, ma la sua sensibilità e specificità, quanto quelle dell'SSA, sono relativamente basse come descritto nel Capitolo 1 (**Tabella 11**) (Grauer 2011).

Tabella 11: risultati di campioni di urina di cane analizzati con il metodo dipstick convenzionale e con l'SSA (599 campioni)

	Dipstick + se ≥ Tr	SSA + se ≥ Tr	Dipstick + se ≥ 2+	SSA + se ≥ 2+
Sensibilità	81.2%	73.3%	32.9%	27.4%
Specificità	47.8%	63.9%	98.9%	99%
PPV *	34%	41.8%	90.7%	90.2%
NPV †	88.5%	87.1%	81.7%	79.4%

Modificata Grauer, 2011

Abbreviazioni: SSA, *Sulfosalicylic acid*; Tr, trace; PPV, *positive predictive value*; NPV, *negative predictive value*.

*animale realmente positive con test positivo

†animale veramente negativo con test negativo

Lyon e collaboratori, nel 2010, pubblicano un lavoro che mette a confronto i principali test utilizzati per la misurazione delle albumine urinarie nel cane e nel gatto: dipstick, SSA, UPC, ELISA. I falsi positivi ottenuti con il dipstick e l'SSA su urine di cane, considerando positive anche le tracce di proteine, sono rispettivamente 52.2% e 36.1%. La specificità è

del 98.9% per il dipstick e del 99.0% per l'SSA, se vengono considerati positivi i campioni con un *cut point* maggiore o uguale a 2+. Nel cane, quindi, considerando questo *cut point*, dipstick e SSA possono essere utilizzati per la ricerca di albumine urinarie, mentre, se si riscontrano tracce o 1+ di albumina, è necessario ricorrere a metodiche quantitative. Nel gatto, invece, i risultati del dipstick e dell'SSA sono molto più difficili da interpretare e hanno un valore diagnostico minimo per l'elevato numero di falsi positivi. Questi due test hanno, infatti, una specificità rispettivamente del 11.0% e del 25.4%. Nel gatto, quindi, la misurazione delle albumine urinarie deve sempre essere effettuata con metodiche quantitative (Lyon et al 2010; Grauer 2011). Come riportato nel Capitolo 1, i risultati ottenuti con questi due metodi semiquantitativi devono sempre essere interpretati in relazione al peso specifico urinario e all'analisi del sedimento. Ad esempio, una positività pari a 1+ del dipstick da urine iperstenuriche può essere la conseguenza della concentrazione urinaria piuttosto che di una reale perdita proteica. Inoltre, una positività al dipstick, in presenza di ematuria o piuria, può essere la conseguenza dell'inflammazione o dell'emorragia, anche se Vaden e collaboratori, in uno studio del 2004, hanno dimostrato che l'ematuria e la piuria hanno una scarsa influenza sulla concentrazione urinaria di albumina (Grauer 2011; Vaden et al 2004).

I metodi di misurazione *point of care* semiquantitativi, in medicina umana, sono scarsamente utilizzati per la misurazione dell'albuminuria e molti studi mostrano risultati contrastanti in termini di accuratezza diagnostica (Sacks et al 2011; McTaggart et al 2012). In medicina veterinaria, Garner e collaboratori pubblicano nel 2007 uno studio che mette a confronto il metodo di misurazione *point of care* semiquantitativo con Dipstick, SSA e UPC per il riscontro dell'albuminuria nel cane. Il test analizzato è il *Canine E.R.D.-Screen Urine Test della Heska Corporation, Fort Collins, CO, USA*. Questo test usa anticorpi specie specifici monoclonali per il riscontro dell'albuminuria nel cane e fornisce risultati negativi, debolmente positivi, moderatamente positivi, positivi, fortemente positivi. Gli autori riscontrano una buona correlazione tra i test utilizzati nello studio per la misurazione dell'albumina e sottolineano l'alta frequenza di falsi positivi (69%) quando il dipstick rileva tracce o 1+ di proteine urinarie. Il metodo *point of care* semiquantitativo utilizzato, rispetto al dipstick e all'SSA, ha una bassa specificità (37% per il cane, 43% per il gatto) e una alta sensibilità (92% per il cane, 82% per il gatto) (Garner et al 2007; Whittermore et al 2006; Malcom et al 2012; Lyon et al 2010).

La misurazione dell'albuminuria con metodi quantitativi nel cane e nel gatto è indicata nelle seguenti situazioni (Grauer 2011):

-quando i test semiquantitativi danno risultati equivoci, conflittuali o quando si sospettano falsi positivi

-quando i metodi semiquantitativi risultano negativi in animali apparentemente sani o anziani

-quando i metodi semiquantitativi sono negativi in animali apparentemente sani o anziani con rischio familiare di sviluppare malattia renale proteinuria

- per confermare o monitorare pazienti in cui era già stata misurata l'albuminuria

In medicina umana, la concentrazione di albumine nelle urine viene misurata di routine con diversi metodi immunologici che comprendono metodi di radioimmunologia (RIA “radioimmunoassay”), immunoturbidimetria (IT “immunoturbidimetry”), immunodiffusione radiale, immunonefelometria (IN “immunonephelometry”) e ELISA (Comper et al 2004).

L'UAC, ottenuta mediante l'utilizzo della metodica immunologica ELISA, specie-specifica per la misurazione delle albumine urinarie, è il metodo quantitativo più sensibile in medicina veterinaria. L'UPC, precedentemente descritto nel Capitolo 1, infatti, come il dipstick e l'SSA per la determinazione dell'albuminuria, dà un importante numero di falsi negativi e non possono essere utilizzati come test di screening nel cane e nel gatto per il riscontro di albumine urinarie in quantità inferiori ai 30 mg/dl (Lyon et al 2010). Il rapporto UAC, ottenuto nei cani e gatti sani, è simile a quello riportato in letteratura umana, ovvero inferiore a 0.03 mg/dl (Bacic et al 2010). La correlazione tra UAC e UPC è significativa in cani e gatti con malattia renale cronica proteinurici, quando l'UPC è superiore a 1 (Kuwahara et al 2008; Syme et al 2006). Se l'UPC è compreso tra 0.5 e 1, è molto probabile che il paziente presenti un UAC compreso tra 0.03 e 0.3. Se l'UPC è inferiore a 0.5, è raccomandata la misurazione dell'UAC per riscontrare un'eventuale iniziale perdita di albumina (Bacic et al 2010). In letteratura veterinaria, gli studi sulla misurazione dell'UAC, come marker diagnostico e prognostico, sono limitati. Nel 2005 è stato validato un metodo immunoturbidimetrico per la misurazione delle albumine urinarie e del liquido cefalorachidiano nel cane, utilizzato in medicina umana per la quantificazione dell'albuminuria. Tale metodica ha una accuratezza del 99.6% e non subisce interferenze legate alla presenza di emoglobina o di glucosio (Gentilini et al 2005). L'UAC è stata valutata in uno studio di Bacic e collaboratori del 2010 in relazione alla pressione sistolica in cani con malattia renale cronica (**Tabella 12**) (Bacic 2010).

Tabella 12: numero e percentuale di cani con malattia renale cronica e ipertensione (pressione sistolica \geq 180 mmHg) o normotesi (pressione sistolica $<$ 180 mmHg) in relazione alla gravità della proteinuria.

UPC	UAC	Gravità dell'albuminuria	Ipertesi (n=24)	Normotesi (n=16)	Totale (n=40)
> 1.0 (n=26)	> 0.3	Macroalbuminuria	15/17 (88.2%)	5/9 (55.6%)	20/26 (76.9%)
	0.03-0.3	Microalbuminuria	2/17 (11.8%)	3/9 (33.3%)	5/26 (19.2%)
	< 0.03	No albuminuria	0/17 (0%)	1/9 (11.1%)	1/26 (3.9%)
0.5 -1.0 (n=8)	> 0.3	Macroalbuminuria	0/4 (0%)	0/4 (0%)	0/8 (0%)
	0.03-0.3	Microalbuminuria	3/4 (75.0%)	4/4 (100%)	7/8 (87.5%)
	< 0.03	No albuminuria	1/4 (25.0%)	0/4 (0%)	1/8 (12.5%)
< 0.5 (n=6)	> 0.3	Macroalbuminuria	0/3 (0%)	0/3 (0%)	0/6 (0%)
	0.03-0.3	Microalbuminuria	1/3 (33.3%)	0/3 (0%)	1/6 (16.7%)
	< 0.03	No albuminuria	2/3 (66.7%)	3/3 (100%)	5/6 (83.3%)

Modificata Bacic, 2010

UPC, urinary protein creatinine; UAC, urinary albumin creatinine.

Gli autori dimostrano che nei cani, con malattia renale cronica, l'UAC è più elevato in pazienti ipertesi rispetto a pazienti normotesi e che l'UAC può essere utilizzato in cani ipertesi con malattia renale cronica e UPC inferiore o uguale a 1 per riscontrare l'insorgenza o l'entità dell'albuminuria. In presenza di una UAC elevata ($>$ 0.3), è sufficiente misurare l'UPC (Bacic et al 2010).

Whittermore e collaboratori nel 2006 pubblicano un lavoro che valuta l'associazione tra albuminuria misurata con metodi semiquantitativi e UAC in cani con patologie sistemiche. Gli autori dimostrano che l'albuminuria può essere associata a patologie neoplastiche, infettive/infiammatorie, immunomediate e a patologie delle vie urinarie e che la misurazione dell'albuminuria con metodi semiquantitativi e quantitativi dovrebbe essere utilizzata, in associazione ad altri test di screening, nell'iter diagnostico di patologie tipiche dell'età anziana (**Tabella 13 e 14**) (Whittermore et al 2006).

Tabella 13: distribuzione dei campioni di urina con risultati positivi per MALB_Q, MALB_E, UPC, UAC con diagnosi clinica, e in tutti i cani (n=352) che sono sani o che hanno una singola patologia in cui il dipstick è negativo. I dati sono riportati in percentuale (numero) di cani.

Diagnosi clinica	MALB _Q	MALB _E	UPC _{0.1}	UPC _{0.5}	UAC ₁₀₀	UAC ₂₀₀	Cani totali *
Sani	6 (7)	4 (4)	16 (39)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	14 (48)
Neoplasia	31 (34)	30 (34)	22 (54)	38 (5)	52 (15)	45 (5)	23 (81)
Infettivo immunomediato	20 (22)	21 (24)	18 (45)	15 (2)	21 (6)	27 (3)	19 (67)
Apparato urinario	14 (16)	13 (15)	12 (29)	15 (2)	3 (1)	0 (0)	13 (45)
Altri	29 (32)	32 (37)	33 (84)	31 (4)	24 (7)	27 (3)	32 (111)
Totale	100 (111)	100 (114)	100 (251)	100 (13)	100 (29)	100 (11)	100 (352)

Modificata Whittemore et al, 2006

*Cani totali con diagnosi clinica.

UPC_{0.1} = Urine protein-creatinine ratio con valore *cutoff* di 0.1. UPC_{0.5} = Urine protein-creatinine ratio con valore di *cutoff* di 0.5. UAC₁₀₀ = Urine albumin-creatinine ratio con valore di *cutoff* di 100. UAC₂₀₀ = Urine albumin-creatinine ratio con valore di *cutoff* di 200.

Tabella 14: sensitività e specificità dei test urinari per il riscontro di patologie sistemiche in 408 cani con una patologia, patologie multiple o assenza di patologie e con risultato del dipstick test negativo per il riscontro di proteine urinarie

Variabili	MALB _Q	MALB _E	UPC _{0.1}	UPC _{0.5}	UAC ₁₀₀	UAC ₂₀₀
Sensitività (%)	35.6	36.9	71.1	4.5	10	3.6
Specificità (%)	85.4	91.7	18.8	100	100	100

Modificata Whittemare et al, 2006

Vedi **Tabella 13** per parole chiave

Whittermore e collaboratori, nel 2011, valutano il significato in termini di morbidità e sopravvivenza dell'albuminuria e della CRP (*C-Reactive Protein*) in 78 cani in terapia

intensiva, affetti da diverse patologie, con un follow up di 30 giorni, basandosi su studi di medicina umana, che dimostrano un'associazione statisticamente significativa tra albuminuria, UAC e sopravvivenza. In medicina umana, la presenza di albuminuria e di un aumento dell' UAC durante l'ospedalizzazione è associata ad una aumentata morbilità e mortalità (Thorevska et al 2003; Abid et al 2001; Whittermore et al 2011). Gli autori dimostrano che albuminuria e UAC sono significativamente più basse nei cani sopravvissuti al follow up di 30 giorni rispetto ai non sopravvissuti (Whittermore et al 2011).

E' stata dimostrata, inoltre, una maggiore incidenza di albuminuria in cani affetti da iperadrenocorticismo rispetto alla popolazione sana. L'albuminuria, in questi pazienti, può essere conseguenza dell'ipertensione, della dislipidemia, della ridotta sensibilità all'insulina, del danno endoteliale, dello stato di ipercoagulabilità e dell'ipercortisolismo. Alterazioni della permeabilità endoteliale a livello glomerulare con conseguente aumentata escrezione proteica sono, infatti, state dimostrate in cani in terapia con corticosteroidi (Lien et al 2010; Mazzi et al 2008; Schellenberg et al 2008; Water set al 1997; Caldi net al 2009).

Diversi studi sottolineano, infine, come infiammazioni e infezioni delle vie urinarie possano essere causa di proteinuria nel cane, alterando i risultati dell'UPC. Vaden e collaboratori, in uno studio del 2004, valutano come le patologie infiammatorie delle vie urinarie possano influenzare l'UAC nel cane.

In medicina umana, le tecniche di laboratorio sviluppate per la quantificazione delle albumine urinarie sono molte e comprendono, oltre a quelle già descritte e utilizzate anche in medicina veterinaria, *immunoessay* competitiva, immunoturbidimetria, *HPLC size-exclusion*, *chip* elettroforesi, LC-MS, cromatografia liquida-tandem spettrometria di massa (LC-MS/MS) (Seegmiller et al 2009; Forcisi et al 2013; Falcò et al 2001; Finco et 1995; Zhang et al 2013). Studi recenti hanno dimostrato che l'albumina urinaria può avere caratteristiche complesse e strutture chimiche differenti rispetto all'albumina plasmatica, come accennato precedentemente. Gli enzimi lisosomiali contenuti nelle cellule tubulari, infatti, modificano la struttura dell'albumina filtrata, determinando l'escrezione di un 1 % di albumina intatta e di un 99% di frammenti di albumina di dimensioni inferiori ai 10 kDa. Le tecniche immunologiche convenzionali sono in grado di misurare solo le albumine intatte o i frammenti di albumina di dimensioni superiori ai 12 kDa. Così, negli ultimi anni, gli studi sono stati finalizzati alla misurazione dell'albumina urinaria mediante tecniche

cromatografiche; in particolare, la cromatografia liquida *high-performance* (HPLC) riesce a misurare anche le albumine non immunoreattive e i frammenti di albumine di dimensioni maggiori a 10 kDa che non vengono misurati con i metodi immunologici (Seegmiller et al 2009; Kevan et al 2006; Glasscock 2010; Compere et al 2004; Tyan et al 2011). Molti studi hanno già dimostrato che la quantità di albumine misurate con HPLC rispetto ai metodi convenzionali è nettamente maggiore (Kevan et al 2006). L'albumina filtrata dal rene viene modificata nella sua struttura chimica da enzimi lisosomiali presenti nelle urine e viene, quindi, escreta intatta in quantità inferiore all'1%, mentre più del 99% dell'albumina urinaria è caratterizzata da frammenti di dimensioni inferiori a 10 kDa. I metodi immunologici convenzionali non sono in grado di misurare né i frammenti di albumine inferiori a 12 kDa né le albumine non immunoreattive. L'origine delle albumine non immunoreattive non è conosciuta, ma si suppone che sia legata a modificazioni conformazionali, conseguenza di una incompleta processazione lisosomiale, come dimostrato nei pazienti diabetici (Comper et al 2004).

L'HPLC è in grado di misurare concentrazioni maggiori di albumine urinarie, fino al 20-30% in più, rispetto alla nefelometria, soprattutto a basse concentrazioni di albumina (Brinkman et al 2004). Inoltre l'HPLC è in grado di misurare una quantità quattro volte superiore di albumine rispetto al metodo immunoturbidimetrico, soprattutto a basse concentrazioni di albumina (Owen et al 2005, Polkinghorne 2006).

Altri studi hanno poi dimostrato l'utilità clinica dell'HPLC, definendo le conseguenze cliniche del riscontro precoce di albuminuria e di una quantità maggiore di albumine. È stato dimostrato, infatti, che il riscontro di albumine con l'HPLC ha una correlazione più forte con l'*ankle brachial index*, un marker di patologia vascolare periferica, rispetto ai metodi di misurazione convenzionali. Utilizzando la stessa tecnica diagnostica, i pazienti albuminurici con l'HPLC rispetto ai non albuminurici hanno un maggiore rischio cardiovascolare e di sviluppare malattia renale, quindi l'HPLC ha un significato importante sia diagnostico che prognostico (Kevan et al 2006; Brinkman et al 2004; Gunasekara et al 2011).

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO III

Obiettivi

Molti studi, sia in medicina veterinaria, che in medicina umana, hanno dimostrato la notevole importanza ricoperta dalla proteinuria e in particolare dall'albuminuria nella progressione della malattia renale cronica (CKD) (Whittemore *et al.*, 2011; Grauer, 2011; Bermudez *et al.*, 2011; Hurley *et al.*, 2012; Schefer *et al.*, 2012; Erkan, 2012; Smink *et al.*, PREVEND STUDY, 2012). Risulta quindi molto importante identificare correttamente e precocemente la proteinuria e l'albuminuria nei cani, in quanto la perdita di proteine nelle urine è altamente associata con la morbilità e la mortalità attribuibile alle crisi uremiche.

A tal proposito, gli obiettivi di questo studio sono quelli di identificare la quantità di proteine ed in particolare di albumine, perse nelle urine, considerata "fisiologica" nel cane e di valutare la capacità di diversi test diagnostici, quali dipstick urinario, rapporto UPC e rapporto UAC, nell'identificazione dei pazienti con proteinuria renale patologica. Questo studio ha, inoltre, lo scopo di valutare "l'efficienza" del dipstick, un test poco costoso di utilizzo comune nella pratica clinica, nell'identificare i cani proteinurici e distinguerli da quelli non proteinurici, utilizzando come criterio di riferimento i *cut-off* di UPC del sistema di classificazione IRIS della progressione della CKD (www.iris-kidney.com, vedi *Appendice I*) ed i *cut-off* di UAC determinati nella prima parte dello studio su pazienti sani.

Inoltre, un ulteriore obiettivo è quello di valutare la concordanza tra il dipstick, il rapporto UPC e il rapporto UAC in relazione al diverso peso specifico, come proposto in un altro studio in medicina veterinaria per i soli dipstick e UPC (Zatelli *et al.*, 2010).

Nell'uomo la valutazione precoce dell'albuminuria e un suo trattamento tempestivo hanno ridotto la progressione della malattia renale (Danziger, 2008). Sfortunatamente, in medicina veterinaria solo pochi studi, non recenti, evidenziano l'importanza di lievi quantità di albuminuria nell'identificare precocemente la CKD (Lees *et al.*, 2002; Grauer *et*

al., 2002). Il proposito di questo studio è quello di identificare gli stadi albuminurici tramite il rapporto UAC e di confrontarli con i *cutoff* di UPC del sistema IRIS.

CAPITOLO IV

Materiali e Metodi

4.1 Selezione dei Soggetti e Criteri di inclusione ed esclusione

I campioni di urine di cani presentati presso l'Ospedale Didattico Veterinario di Ozzano dell'Emilia (BO) da Gennaio 2002 a Dicembre 2012 sono stati analizzati attraverso utilizzando il software *Fenice 3.00*. Tali campioni sono stati associati ad altri, provenienti da cani con proteinuria nefrosica, come definito da Klosterman *et al.*, con UPC > 3,5 (Klosterman *et al.*, 2011^b). I cani, con proteinuria nefrosica, presentati presso l'Ospedale Didattico Veterinario da Gennaio 2010 a Dicembre 2012 sono stati inseriti in gruppo di studio durante il periodo di tesi.

I campioni sono stati esclusi dallo studio secondo i seguenti criteri:

- ✓ senza assenza di analisi del sedimento urinario;
- ✓ senza assenza di analisi della proteinuria;
- ✓ senza assenza di analisi dell'albuminuria;
- ✓ presenza di pigmenturia macroscopica;
- ✓ presenza di pH urinario > 7,5;
- ✓ presenza di sedimento "attivo" (>1 batteri/HPF¹, >250 eritrociti/HPF, > 5 leucociti/HPF).

¹ HPF (*high power field*): campo ad alto ingrandimento al microscopio ottico

4.2 Categorie Diagnostiche

I campioni selezionati sono stati suddivisi in due categorie utilizzando i *cut-off* della proteinuria (UPC) suggeriti della stadiazione IRIS (vedi *Appendice 1*): i pazienti sono stati considerati non proteinurici e proteinurici con un *cut-off* di $UPC > 0,2$.

Inoltre, i campioni selezionati sono stati suddivisi in relazione al peso specifico urinario utilizzando come *cut-off* il valore di 1030, considerato come il valore che suddivide i pazienti con concentrazione delle urine adeguata o inadeguata ovvero con una capacità mantenuta da parte dei reni di concentrare le urine. Inoltre, i soggetti sono stati suddivisi anche in base al *cut-off* di peso specifico di 1012, il valore massimo al quale le urine sono definite come isostenuriche (Stockhame e Scott, 2008).

Sono stati considerati due differenti gruppi di proteinuria in relazione ai risultati del dipstick urinario (vedi Cap. 5.5). Il primo gruppo, in cui i risultati 0 + sono considerati negativi e quelli $\geq 1 +$ positivi. Il secondo gruppo in cui i risultati 0 + o 1+ sono considerati negativi e quelli $\geq 2+$ positivi.

Infine, i campioni sono stati suddivisi in relazione al *cut-off* di UAC che suddivide gli "albuminurici" dai "non albuminurici", valutato in questo studio (UAC 0,025), e il *cut-off* in medicina umana che separa quella che viene definita "*microalbuminuria*" dalla "*overt proteinuria*" (UAC 0.3) (Johnson DW *et al.*, 2012).

Per studio di confronto statistico tra UPC, UAC e proteinuria al dipstick è stato considerato un gruppo di soggetti con campioni di urine dopo il 1 Gennaio 2008 (data di inizio utilizzo del dipstick DIRUI[®], serie H10 da parte del SEPAC VET).

Per lo studio di confronto tra UPC e UAC in campioni di urine con sedimento non attivo è stato considerato un gruppo di soggetti con campioni urinari raccolti dal 1 Gennaio 2002 al 31 Dicembre 2012.

4.3 Gruppo di Controllo

I cani inseriti nel gruppo di controllo sono stati considerati clinicamente sani in base alla visita clinica comprensiva di raccolta del segnalamento e dell'anamnesi, dell'esame fisico diretto, della misurazione della pressione arteriosa, di diagnostica per immagini e indagini clinicopatologiche complete. In riferimento a queste ultime non dovevano essere presenti alterazioni di:

- ✓ esame emocromocitometrico;
- ✓ esame biochimico a 17 parametri (ALT, AST, fosfatasi alcalina, creatinina, urea, fosforo, glucosio, bilirubina totale, acidi biliari, GGT, proteine totali, albumina, rapporto albumina/globuline, calcio, sodio, potassio, cloro);
- ✓ proteina C-reattiva;
- ✓ analisi urinaria;
- ✓ proteinuria espressa come rapporto UPC (UPC<0,2).

4.4 Gruppo di Studio durante il periodo di Tesi

Nello studio sono stati inclusi, secondo i criteri di inclusione, 38 cani con proteinuria nefrosica (UPC > 3,5) presentati presso l'Ospedale Didattico Veterinario di Ozzano dell'Emilia (BO) nel periodo da Gennaio 2010 a Dicembre 2012. I cani sono stati sottoposti all'esame clinico comprensivo di anamnesi, esame fisico diretto, misurazione della pressione arteriosa, diagnostica per immagini e indagini clinicopatologiche. A scopo di studio sono stati prelevati campioni di urine con diverse metodiche.

4.5 Metodo di prelievo, processazione e stoccaggio dei campioni

Sono stati eseguiti prelievi di sangue sui soggetti del gruppo di controllo e prelievi di urine nel gruppo di studio.

I prelievi di sangue sono stati ottenuti tramite agopunzione ed un sistema a vuoto Sarstedt. Sono stati raccolti, quando possibile, un'aliquota di sangue in K₃-EDTA, un' aliquota di sangue senza anticoagulante per ottenere il siero e un'aliquota di sangue con Na-citrato.

I campioni di sangue in K₃-EDTA, raccolti in provette S-Monovette® Sarstedt, sono stati processati entro un'ora dal prelievo per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico.

Prima delle determinazioni i campioni sono stati agitati tramite Vortex (Reamix 2789). L'esame emocromocitometrico è stato ottenuto utilizzando i contaglobuli automatici *Hematology Self Cell Counter* modello Baker System 9120⁺_{ax}, Abbot CELL-DYN 3500 R e Siemens ADVIA2120.

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

Il sangue, raccolto in provette da siero (S-Monovette® Sarstedt con "gel clotting activator"), è stato immediatamente posto all'interno di un termoblocco (THERMOBLOC, FALC) a 37°C e lasciato "sierare" per 30 minuti. La separazione del siero è stata ottenuta tramite centrifugazione per 10 minuti a 3000 × g. Il siero è stato utilizzato per eseguire un profilo biochimico che comprende ALT, AST, fosfatasi alcalina, creatinina, urea, fosforo, glucosio, bilirubina totale, acidi biliari, GGT, proteine totali, albumina, rapporto albumina/globuline, calcio, sodio, potassio, cloro. Tutte le determinazioni sono il risultato di metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS AU 400.

Il sangue in Na-citrato è stato raccolto con provete S-Monovette® Sarstedt (allestite con Na-citrato in soluzione 0,11 mol/l, rapporto Na-citrato/sangue di 1 + 9) ed 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 × 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.

I prelievi di urina sono stati eseguiti tramite minzione spontanea, cistocentesi e cateterismo urinario.

I campioni di urina sono stati sottoposti a valutazione con refrattometro per il peso specifico urinario e sono state eseguite analisi chimico-fisiche tramite strisce reattive DIRUI®, serie H10, sottoposte a lettura da parte di un lettore automatico DIRUI H-500

Urine Analyzer. Ogni campione è stato sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 1000 x g. Il surnatante è stato separato dal sedimento. Il sedimento è stato osservato a fresco al microscopio ottico ed è stato considerato come "attivo" in base alla presenza di leucociti, eritrociti e batteri (>1 batteri/HPF¹, >250 eritrociti/HPF, > 5 leucociti/HPF).

Le matrici di surnatante, qualora necessario, sono state aliquotate e stoccate a -20° o -80°C fino all'esecuzione delle determinazioni richieste nello studio.

4.6 Determinazioni specialistiche dello studio

Esame Chimico-Fisico e del Sedimento Urinario

Il peso specifico urinario dei campioni di urina è stato misurato tramite un refrattometro, calibrato giornalmente con acqua distillata.

Per valutare il pH, le proteine, il glucosio, i corpi chetonici, la bilirubina, i leucociti e l'emoglobina presenti nei campioni sono stati utilizzati dei dipstick. Il dipstick è una metodica semiquantitativa utilizzata di routine nella pratica veterinaria e in medicina umana. Le strisce reattive utilizzate sono le *DIRUI*[®], serie H10. Il test prevede la disposizione di una goccia di campione tramite micropipetta sui tamponi assorbenti della striscia reattiva. In pochi secondi avviene la reazione colorimetrica. Per eliminare gli errori di lettura operatore-dipendenti, per la lettura della variazione colorimetrica è stato utilizzato uno strumento che sfrutta la fotometria a riflessione (*DIRUI H500*).

I risultati ottenuti sono espressi in una scala che identifica il campione come negativo (0+) o positivo, associando valori quantitativi da 1+ a 4+ in relazione alla concentrazione di molecole presenti.

	Leucociti <i>leucociti/μL</i>	Proteine <i>mg/dL</i>	Glucosio <i>mg/dL</i>	Bilirubina <i>mg/dL</i>	Emoglobina <i>eritrociti/μL</i>	C.Chetonici <i>mg/dL</i>
1+	25	30	50	1	10	15
2+	75	100	100	3	25	50
3+	500	500	> 300	6	50	150
4+	-	-	-	-	250	-

L'esame del sedimento è stato effettuato entro 30 minuti dal prelievo, oppure entro 4 ore mantenendo il campione a una temperatura di 4°C. Il sedimento è stato ottenuto centrifugando il campione a 1500xg per 10 minuti. Successivamente è stato rimosso il surnatante e il sedimento è stato valutato al microscopio ottico.

Il sedimento è stato ritenuto "attivo" in base alle seguenti caratteristiche:

- ✓ > 1 batteri/HPF;
- ✓ > 250 eritrociti/HPF;
- ✓ > 5 leucociti/HPF.

Proteine Totali urinarie e rapporto proteine/creatinina urinarie

Le proteine totali urinarie sono state misurate misurata tramite metodica immunoturbidimetrica Olympus System Reagent - Urinary/CSF protein OSR 6170. Questa metodica è nota come "metodo al rosso di pirogallolo".

Meccanismo del test

I reagenti di rosso di pirogallolo e molibdato si combinano per formare un complesso ad assorbanza massima a 470 nm. Quando il complesso rosso di pirogallolo-molibdato si lega agli aminogruppi basici delle molecole proteiche dà origine a un complesso di colore blu-porpora con assorbanza massima a 600 nm. L'assorbanza in questi aggregati risulta essere proporzionale alla concentrazione di proteine nel campione.

Reagenti, calibrazione e controllo di qualità

Reagenti	Rosso di pirogallolo 47 µmol/L Molibdato di Sodio 320 µmol/L Acido succinico 50 mmol/L Benzoato di Sodio 3,5 mmol/L Ossalato di Sodio 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 giorni 15-25 °C fino a 2 giorni
Controllo	Controllo Sentinel Diagnostic Dropper Level 1 e 2	Conservazione: 2-8 °C a confezione integra fino a data di scadenza aperto 90 giorni

Linearità e sensibilità del test

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

Interferenze

Sono state evidenziate interferenze nella lettura della concentrazione delle proteine totali nelle urine nelle seguenti condizioni:

- Bilirubina: interferenze inferiori al 10% fino a 0,3 mmol/L di bilirubina aggiunta
- Glucosio: : interferenze inferiori al 10% fino a 277 mmol/L di glucosio aggiunto
- Acido urico: : interferenze inferiori al 10% fino a 18 mmol/L di acido urico aggiunto

Rapporto proteine totali/creatinina urinaria

$$UPC = \frac{uPt \text{ (mg/dL)}}{uCrea \text{ (mg/dL)}}$$

Albumine urinarie e rapporto albumina/creatinina urinaria

L'albumina è stata misurata tramite metodica immunoturbidimetrica Olympus System Reagent - Microalbumin, OSR 6167. Questa metodica viene utilizzata in medicina umana e nel laboratorio del Servizio di Patologia Clinica Veterinaria del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie di Bologna. La metodica è stata validata nel cane da Gentilini *et al.* nel 2005 (Gentilini *et al.*, 2005).

Meccanismo del test

Il campione di urine 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 a un composto di aggregati insolubili che formano una struttura simile ad una rete. L'assorbanza in questi aggregati risulta essere proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione.

Reagenti, calibrazione e controllo di qualità

Reagente 1 Reagente 2	Soluzione tampone Tris (pH 7,6) 71 mmol/L Anticorpi di capra antialbumina umana Conservante	Conservazione: 2-8 ° C a confezione integra fino a data di scadenza aperto 90 giorni
Calibratore	Calibratore allestito presso il laboratorio	
Controllo	Calibratore allestito presso il laboratorio	

Linearità e sensibilità del test

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

Interferenze

Sono state evidenziate interferenze nella lettura della concentrazione di albumina nelle seguenti condizioni:

- Glucosio: interferenze inferiori al 5% fino a 3000 mg/dL di glucosio aggiunto
- Creatinina: interferenze inferiori al 5% fino a 300 g/L di creatinina aggiunto

Rapporto albumina/creatinina urinaria

Il rapporto albumina/creatinina urinaria (UAC) è stato calcolato tramite la seguente formula:

$$UAC = \frac{uAlb (mg/dL)}{uCrea (mg/dL)}$$

La *Creatinina* è stata misurata con metodica immunoturbidimetrica Olympus System Reagent - Creatinine, OSR 6178). Questa metodica, utilizzata sia in medicina umana, che in medicina veterinaria da molti anni, è nota come "metodo di Jaffe".

Meccanismo del test

La creatinina si lega all'acido picrico formando un composto giallo-arancio in un mezzo alcalino. La variazione dell'assorbanza a 520 - 800 nm è proporzionale in relazione alla concentrazione di creatinina nel campione.

Reagenti, calibrazione e controllo di qualità

Reagente	Idrossido di sodio 120 mmol/L Acido picrico 2,9 mmol/L Conservante	Conservazione: 2-8 °C a confezione integra fino a data di scadenza aperti per 14 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR cat. n° 66300	Conservazione: 2-8° C fino a 7 giorni 15-25 °C fino a 2 giorni
Controllo	Controlli OLYMPUS cat. n° ODC0003 e ODC0004	Conservazione: 2-8° C fino a 7 giorni 15-25 °C fino a 2 giorni

Linearità e sensibilità del test

Il metodo è lineare per concentrazioni di creatinina tra 0,06 e 0,25 mg/dL. Il metodo applicato alle urine è lineare tra 1 e 400 mg/dL. La concentrazione minima che viene rilevata utilizzando le impostazioni per la creatinina sierica è di 0,027 mg/dL.

Interferenze

Sono state evidenziate interferenze nella lettura della concentrazione di creatinina nelle seguenti condizioni:

- 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 aggiunti (Intralipid®)
- Proteine: interferenze inferiori al 6% tra 3 e 10 mg/dL di proteine aggiunte

4.7 Analisi statistica

Per l'analisi statistica di questa sperimentazione è stato utilizzato un software di statistica medica MedCalc[®] 12.4.0.0. I dati sono stati espressi come statistica descrittiva. L'*agreement* diagnostico tra i risultati del disptick urinario, del rapporto UPC e dell'UAC è stato valutato attraverso il coefficiente ***κ di Cohen*** che corregge l'*agreement* osservato con la probabilità che l'*agreement* sia avvenuto casualmente. Brevemente, il coefficiente $\kappa \leq 0$ indica che l'*agreement* non è diverso da quello che ci si potrebbe aspettare se avvenisse casualmente; invece un valore di 1.00 indica che esiste una corrispondenza completa. La forza dell'*agreement* viene classificata tra 0.81 e 1.00 per una corrispondenza perfetta, tra 0.61 e 0.80 per una corrispondenza sostanziale, tra 0.41 e 0.60 per una corrispondenza moderata, tra 0.21 e 0.40 per una corrispondenza scarsa e ≤ 0.20 per una minima/assente corrispondenza. Il livello di significabilità tra i risultati del disptick urinario, del rapporto UPC e dell'UAC è stato valutato tramite il test ***Chi-quadrato*** che valuta l'ipotesi che una singola tabella di classificazione abbia la stessa frequenza su tutti i livelli. Se il valore ***P*** calcolato è basso, ovvero $< 0,05$, si può sostenere che non esiste una differenza significativa tra le frequenze dei diversi livelli di classificazione.

Per valutare sensibilità, specificità, valore predittivo e similitudine tra i vari test presi in esame sono state utilizzate le ***Receiver Operating Charateristic curves*** (curve diROC). Le ROC curve comparano le performance di due test diagnostici e in base ai criteri di valutazione considerati classificano i casi in veri positivi, veri negativi, falsi positivi e falsi negativi. Lungo i due assi si possono rappresentare la sensibilità e 1-specificità, come *True Positive Rate* (vero positivo) e *False Positive Rate* (falso positivo). Tramite l'analisi delle ROC curve si ha la capacità di distinguere tra i sani e i malati, andando ad analizzare l'area sottesa dalla curva (*Area Under Curve*, AUC).

Per valutare la correlazione tra i risultati del disptick urinario, del rapporto UPC e dell'UAC è stato utilizzato il **coefficiente di correlazione di Spearman (r)**. Questo indice è una misura statistica non parametrica della correlazione e, quindi, misura il grado di relazione tra due variabili quando la loro distribuzione non è ordinaria, ma continua.

CAPITOLO V

Risultati

5.1 Intervalli di riferimento

Per definire gli intervalli di riferimento è stato selezionato un gruppo di 54 cani clinicamente "sani" di varia età, sesso e razza. Gli intervalli di riferimento sono stati ottenuti attraverso una metodica parametrica e non parametrica del 2,5°-97,5° percentile. I pazienti considerati outlier sono stati esclusi dalla valutazione statistica. L'intervallo di riferimento stabilito per l'abuminuria in termini di UAC nel cane è quindi 0-0,025.

Variable	UAC
Lowest value	0.001000
Highest value	0.02700
Arithmetic mean	0.004687
Median	0.003000
Standard deviation	0.005943
Coefficient of Skewness	2.8097 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	8.1348 (P=0.0002)
D'Agostino-Pearson test for Normal distribution	reject Normality (P<0.0001)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	0.01446
90% CI	0.01144 to 0.01749
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.02440
90% CI	

Tabella 15: intervalli di riferimento UAC

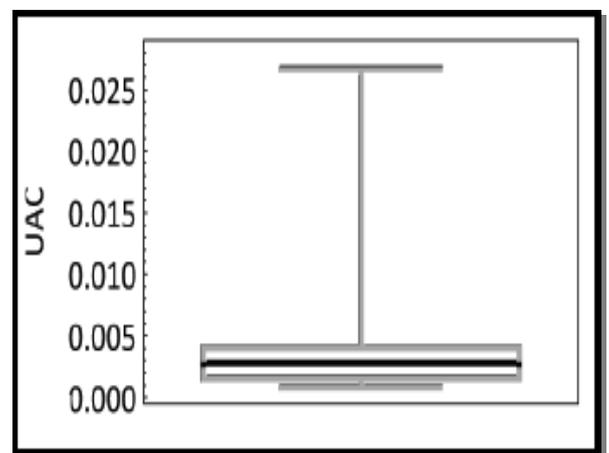


Figura 17: intervalli di riferimento UAC

5.2 Popolazione selezionata per lo studio

Lo studio ha riguardato 3095 soggetti e 7626 campioni raccolti tra Gennaio 2002 e Dicembre 2012, di cui 38 provenienti dal gruppo di studio osservato durante il periodo di tesi (da Gennaio 2010 a Dicembre 2012). Il periodo oggetto dello studio ha durata totale di 10 anni.

La popolazione si presenta eterogenea in termini di età, sesso e razza.

L'età mediana è di 98 mesi (8 anni e 2 mesi) con un intervallo tra 1 mese e 21 anni e 3 mesi. L'età dei pazienti presi in esame è rappresentata nella **Figura 18**.

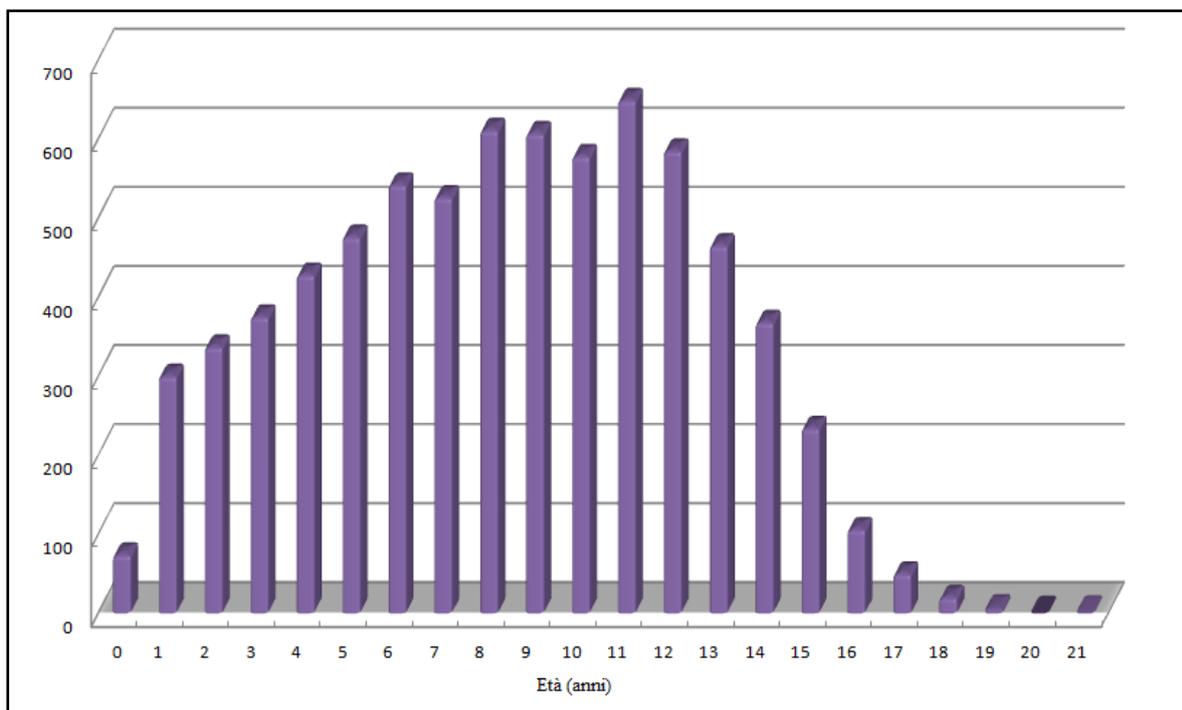


Figura 18: grafico della distribuzione dell'età nella popolazione di studio

La popolazione è suddivisa in base al **sesso** nel 51 % di maschi interi, il 4% di maschi castrati, il 31 % di femmine intere e il 14% di femmine sterilizzate. I cani selezionati per lo studio sono prevalentemente maschi interi ($n = 1562$) e femmine intere ($n = 948$). La popolazione in base al sesso è rappresentata nel grafico della **Figura 19**.

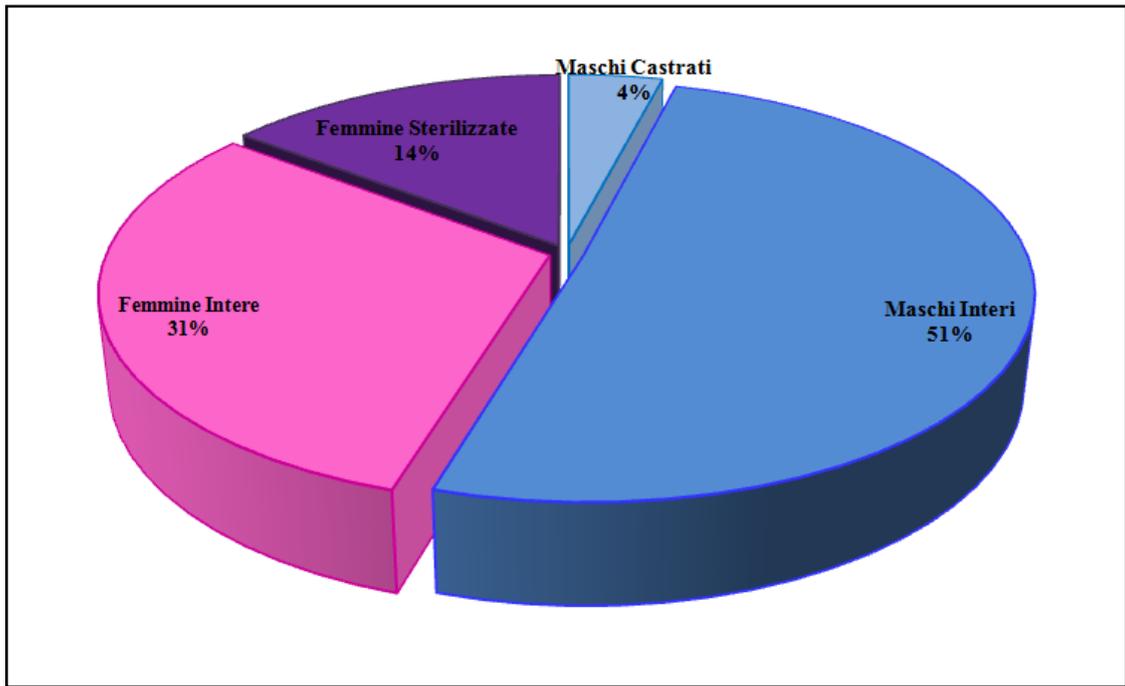


Figura 19: grafico della distribuzione della popolazione in base al sesso

La popolazione è suddivisa in base alla razza per i meticci nel 32% e nessuna razza è sovrarappresentata.

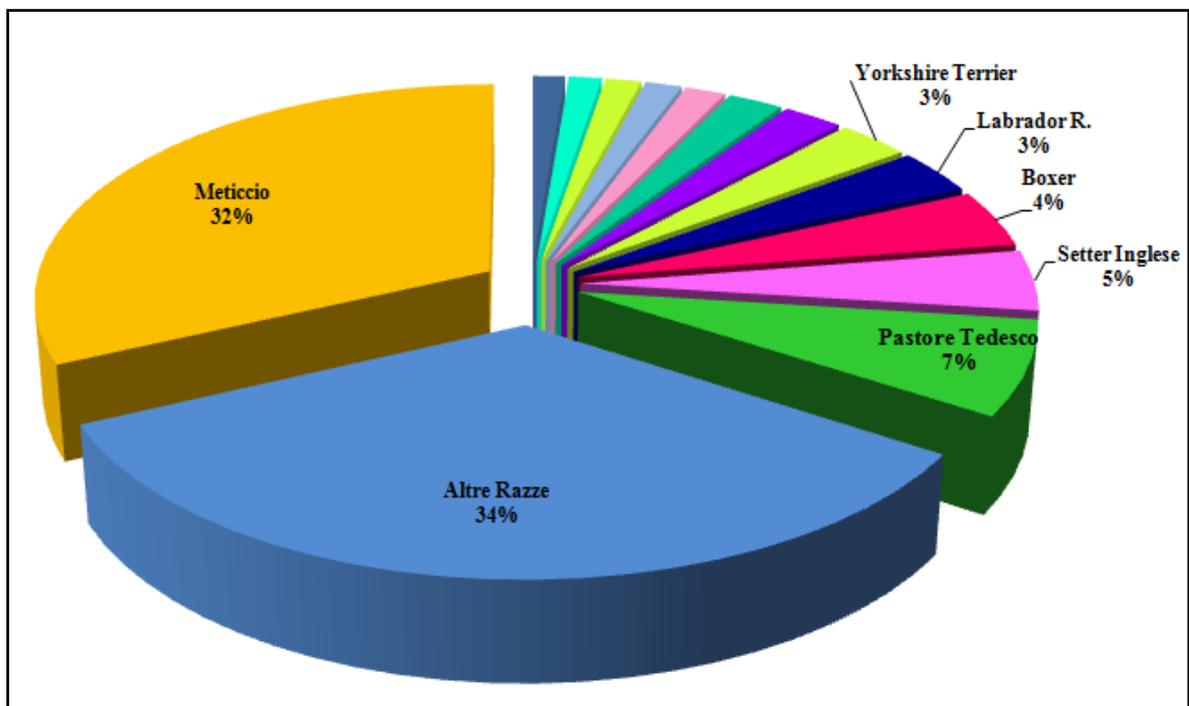


Figura 20: grafico della distribuzione della popolazione in base alla razza

Le razze Pastore Tedesco (7%), Setter Inglese (5%), Boxer (4%), Labrador Retriever (3%), Yorkshire Terrier (3%), Dobermann (2%), Barbone (2%), Shitzu (2%), Rottweiler (1%), Beagle (1%), Bassotto Tedesco (1%), Dalmata (1%) avevano una frequenza tra l'1% e il 7%. Le razze rappresentate con una frequenza minore dell'1% sono state raggruppate in un gruppo definito "altre razze" che rappresenta il 34% del campione totale. Le principali razze dei soggetti presi in esame sono rappresentate nella **Figura 20**.

Metodo di Prelievo

Dei 7626 campioni presi in analisi nel periodo di studio il 24% è stato prelevato per minzione spontanea, il 9% per cistocentesi e il 2% per cateterismo urinario. Per la maggior parte dei campioni (65%, $n = 4946$) non è noto il metodo di prelievo. I metodi di prelievo utilizzati sono rappresentati nella **Figura 21**.

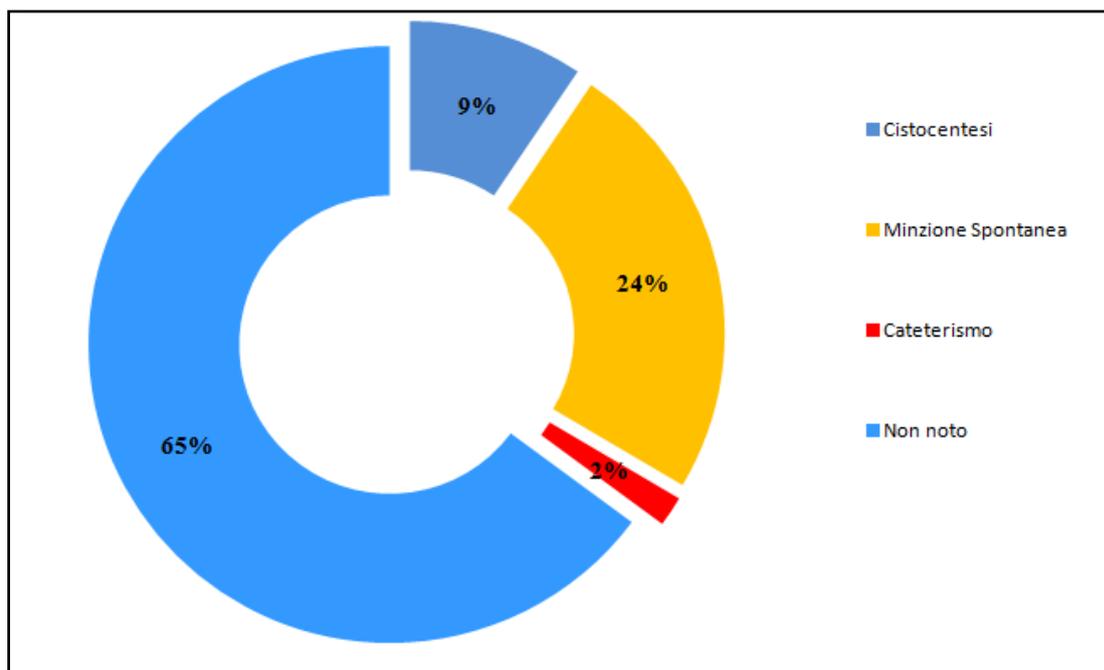


Figura 21: grafico rappresentativo il metodo di prelievo delle urine nel campione in esame

Risultati delle indagini clinicopatologiche urinarie

I dati disponibili dall'analisi urinaria e dalla quantificazione della proteinuria e dell'albuminuria sono riassunti nella **Tabella 16 A, B e C**.

Parametri	Numero di casi sul totale (<i>n</i> = 7626)	Mediana	Minimo	Massimo
pH	5695	6,000	4,000	9,000
Peso Specifico	5706	1024,000	1000,000	1096,000
Proteine Totali stick (mg/dL)	5527	30,000	0,000	500,000
Eritrociti Stick (eritrociti/ μ L)	5538	0,000	0,000	250,000
Leucociti Stick (leucociti/ μ L)	5522	0,000	0,000	500,000
Glucosio Stick (mg/dL)	5543	0,000	0,000	500,000
Chetoni (mg/dL)	5539	0,000	0,000	150,000
Bilirubina (mg/dL)	5543	0,000	0,000	6,000
Eritrociti al sedimento	1567	1,000	0,000	5,000
Leucociti al sedimento	1945	1,000	0,000	5,000
Batteri al sedimento	1204	3,000	0,000	5,000
Cilindri granulosi al sedimento	1703	1,000	0,000	5,000
Cilindri ialini al sedimento	366	1,000	0,000	5,000
Cellule di Sfaldamento	2999	1,000	0,000	5,000
Albumina urinaria	2174	7,335	0,000	2004,800
Creatinina urinaria	2382	93,360	0,400	781,500
Proteine Totali urinarie	2419	52,000	0,000	2408,000
UPC	2443	0,600	0,100	42,000

Tabella 16 A: variabili oggetto di studio, numero di dati disponibili per ciascuna, mediana e valori massimi e minimi

Dei 7626 campioni, considerando quelli dopo l'1 Gennaio 2008, sono stati inclusi nello studio di confronto statistico tra UPC, UAC e proteinuria al dipstick solamente i campioni in cui era disponibile il sedimento urinario e la quantità di proteine al dipstick ($n = 2629$). Secondo i criteri di esclusione sono stati inoltre esclusi dallo studio i campioni con pigmenturia macroscopica, quindi con colore marrone, "coca-cola", rosso, rosa, arancione ($n = 91$), in accordo con la letteratura scientifica (Vaden SL *et al.*, 2004). Sono quindi stati esclusi dallo studio i campioni con sedimento "attivo" ($n = 1657$). Di questi, **550** campioni presentavano l'UPC e UAC.

	Media	SD	Mediana	Minimo	Massimo
pH	5,97	0,72	6,0	5,0	7,5
PS	1023	13,84	1020	1002	1070
Proteine Totali stick (mg/dL)	54,03	116,06	30	0,0	500,0
UPC	1,53	2,8	0,4	0,1	26,1
UAC	0,86	1,74	0,083	0,001	12,4

Tabella 16 B: variabili oggetto di studio, deviazione standard, mediana e valori massimi e minimi su 550 campioni.

Il confronto tra UPC e UAC in campioni di urine con sedimento non attivo è stato, inoltre, effettuato su tutti i campioni urinari raccolti dal 1 Gennaio 2002 al 31 Dicembre 2012 per un totale di **868** campioni.

	Media	SD	Mediana	Minimo	Massimo
UPC	1,832	3,46	0,4	0,1	30,0
UAC	0,993	2,17	0,081	0,001	25,4

Tabella 16 C: variabili oggetto di studio, deviazione standard, mediana e valori massimi e minimi su 868 campioni.

Risultati delle categorie diagnostiche (vedi Cap. 5.2)

I risultati della suddivisione in categorie di campioni "non proteinurici" e "proteinurici", in accordo con le linee guida di stadiazione IRIS (vedi *Appendice 1*) degli 868 campioni, sono rappresentati nella **Figura 22 A**. Percentuale analoghe sono ottenibili valutando i 550 campioni selezionati dal 2008.

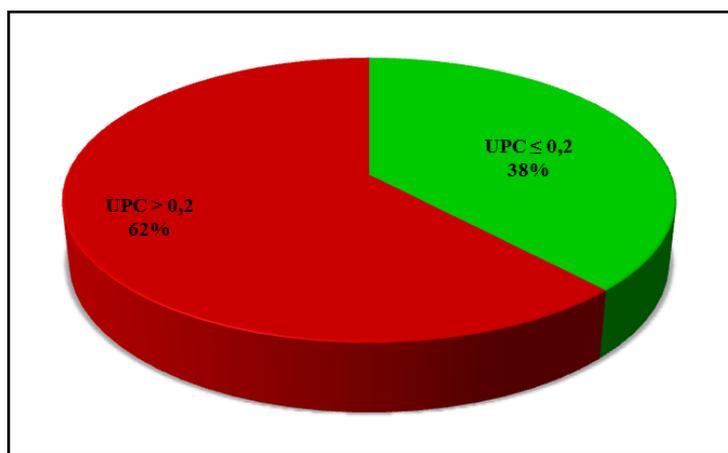


Figura 22: grafico rappresentativo delle due categorie in relazione all'UPC

I risultati della suddivisione in categorie di campioni "non albuminurici" e "albuminurici", sono rappresentati nella **Figura 22 B**.

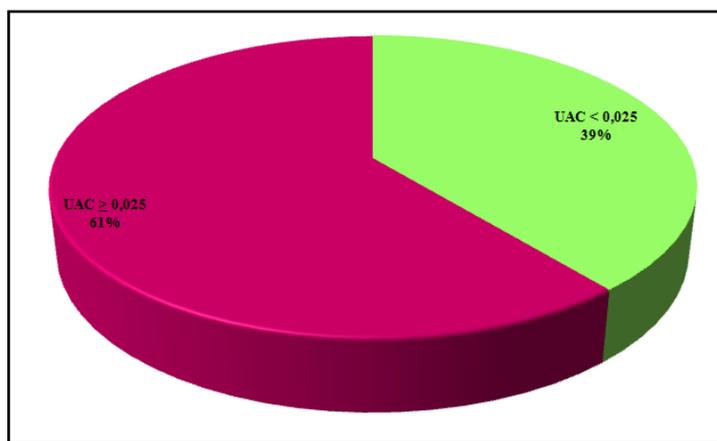


Figura 22 B: grafico rappresentativo delle due categorie in relazione all'UAC

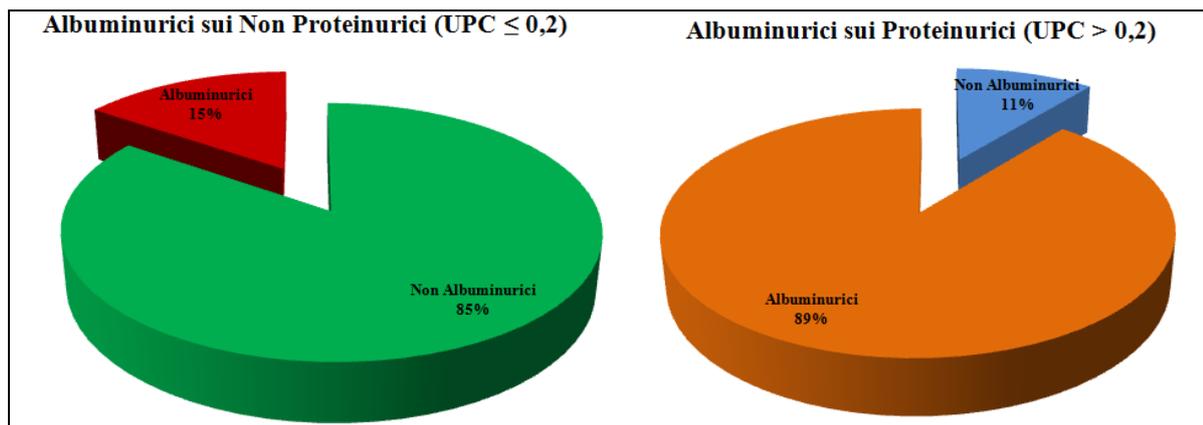


Figura 22 C: grafici rappresentativi dell'albuminuria in confronto ai pazienti "non proteinurici" e "proteinurici"

I risultati della suddivisione in categorie di campioni in relazione al peso specifico, considerando come intervalli di *cut-off* 1030 e 1012, sono rappresentati nella **Figura 23**.

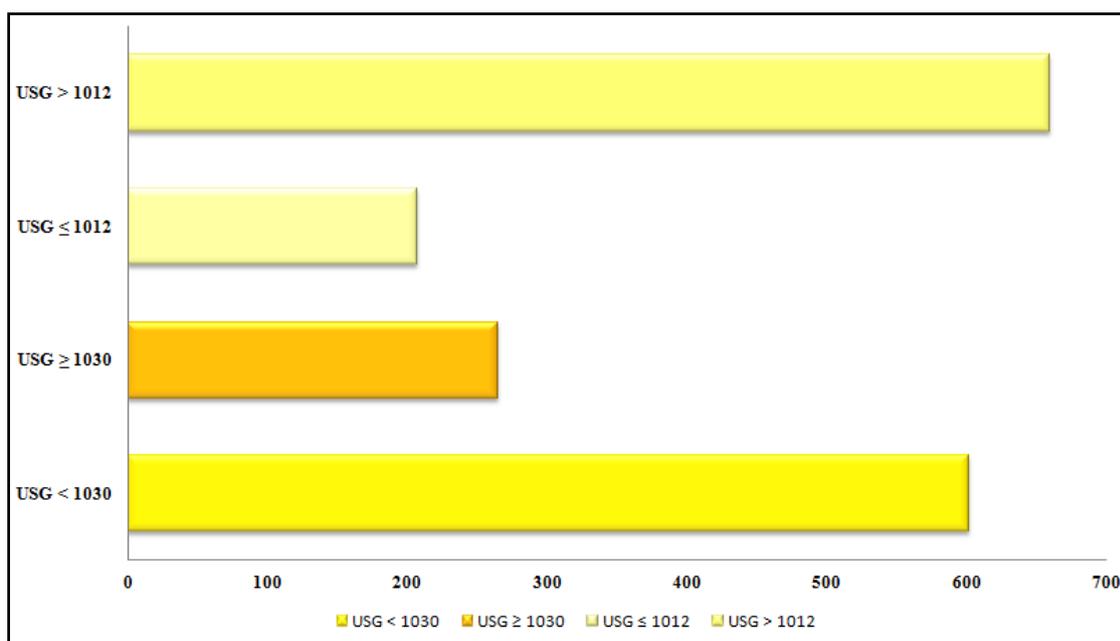


Figura 23: grafico rappresentativo le categorie in relazione al peso specifico (USG). La mediana dell'USG è 1020.

Il numero dei casi in base alle categorie di negatività e di positività al dipstick urinario sono espressi nella **Tabella 17**.

Risultati		Numero di casi sul totale <i>(n = 550)</i>
Negativo	0 +	249
	0 + o 1 +	436
Positivo	$\geq 1 +$	301
	$\geq 2 +$	114

Tabella 17: categorie in base ai risultati del dipstick

Il numero dei casi in base ai *cut-off* di UAC sono espressi nella **Tabella 18**.

	Numero di casi sul totale <i>(n = 550)</i>
<i>cut-off</i> UAC < 0.025	210
<i>cut-off</i> UAC ≥ 0.025	340
<i>cut-off</i> UAC < 0.3	348
<i>cut-off</i> UAC ≥ 0.3	202

Tabella 18: categorie in base all'UAC

Risultati delle corrispondenze diagnostiche

L'*agreement* diagnostico dei 550 campioni di urine tra il dipstick urinario e il rapporto UPC, nell'identificare la proteinuria, è espresso nella **Tabella 19**. Nelle tabelle sono espressi i *cut-off* per definire la proteinuria negativa o positiva in base al dipstick urinario, posti in relazione ai *cut-off* del peso specifico. Inoltre sono espressi il coefficiente κ di Cohen e il valore *P*.

Campioni valutati	Cut-off di proteinuria allo stick		Coefficiente κ (95% CI)	Valore <i>P</i>
	Negativo	Positivo		
Tutti i campioni	0 +	≥ 1+	0.62 (0.56 - 0.69)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.27 (0.22 - 0.32)	< 0.001
PS < 1030	0 +	≥ 1+	0.65 (0.57 - 0.73)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.23 (0.17 - 0.28)	< 0.001
PS ≥ 1030	0 +	≥ 1+	0.56 (0.44 - 0.69)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.39 (0.28 - 0.51)	< 0.001
PS ≤ 1012	0 +	≥ 1+	0.58 (0.45 - 0.70)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.11 (0.05 - 0.16)	< 0.001
PS > 1012	0 +	≥ 1+	0.64 (0.57 - 0.72)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.34 (0.28 - 0.41)	< 0.001

Tabella 19: *agreement* tra dispstick urinario e UPC

L'*agreement* diagnostico degli 550 campioni di urine tra il dipstick urinario e il rapporto UAC con *cut-off* a 0,025, nell'identificare l'albuminuria, è espresso nella **Tabella 20**.

Campioni valutati	Cut-off di proteinuria allo stick		Coefficiente κ (95% CI)	Valore <i>P</i>
	Negativo	Positivo		
Tutti i campioni	0 +	≥ 1+	0.62 (0.55 - 0.69)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.26 (0.21 - 0.31)	< 0.001
PS < 1030	0 +	≥ 1+	0.66 (0.58 - 0.74)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.23 (0.17 - 0.28)	< 0.001
PS ≥ 1030	0 +	≥ 1+	0.53 (0.40 - 0.65)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.35 (0.24 - 0.47)	< 0.001
PS ≤ 1012	0 +	≥ 1+	0.59 (0.47 - 0.72)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.11 (0.05 - 0.17)	< 0.001
PS > 1012	0 +	≥ 1+	0.63 (0.56 - 0.71)	< 0.001
	0 + o 1 +	≥ 2 +	0.33 (0.26 - 0.40)	< 0.001

Tabella 20: *agreement* tra dispstick urinario e UAC con *cut-off* a 0,025

L'*agreement* diagnostico degli 550 campioni di urine tra il dipstick urinario e il rapporto UAC con *cut-off* a 0,3, nell'identificare l'albuminuria, è espresso nella **Tabella 21**.

Campioni valutati	Cut-off di proteinuria allo stick		Coefficiente κ (95% CI)	Valore P
	Negativo	Positivo		
Tutti i campioni	0 +	$\geq 1+$	0.60 (0.54 - 0.67)	< 0.001
	0 + o 1 +	$\geq 2 +$	0.48 (0.37 - 0.52)	< 0.001
PS < 1030	0 +	$\geq 1+$	0.67 (0.60 - 0.74)	< 0.001
	0 + o 1 +	$\geq 2 +$	0.45 (0.37 - 0.53)	< 0.001
PS \geq 1030	0 +	$\geq 1+$	0.45 (0.34 - 0.57)	< 0.001
	0 + o 1 +	$\geq 2 +$	0.44 (0.28 - 0.60)	< 0.001
PS \leq 1012	0 +	$\geq 1+$	0.72 (0.61 - 0.84)	< 0.001
	0 + o 1 +	$\geq 2 +$	0.20 (0.07 - 0.33)	< 0.001
PS > 1012	0 +	$\geq 1+$	0.57 (0.50 - 0.64)	< 0.001
	0 + o 1 +	$\geq 2 +$	0.54 (0.45 - 0.62)	< 0.001

Tabella 21: *agreement* tra dipstick urinario e UAC con *cut-off* a 0,3

Nella **Tabella 22** sono espresse le corrispondenze tra UPC e UAC ai *cut-off* di 0,025 e di 0,3 su tutti i campioni.

	Coefficiente κ (95% CI)
UPC vs UAC 0,025	0.76 (0.70 - 0.81)
UPC vs UAC 0,3	0.54 (0.48 - 0.60)

Tabella 22: *agreement* UPC e UAC con *cut-off* a 0,025 e 0,3

Potere discriminatorio e Accuratezza diagnostica del dipstick urinario

I risultati dell'accuratezza diagnostica e dell'abilità predittiva del dipstick urinario nell'identificare la proteinuria, con il rapporto **UPC** come criterio di confronto, sono esposti nelle **Tabelle** dalla **23** alla **27** e nelle **Figure** dalla **24** alla **28**. Nella **Tabella 28** è riassunto il potere discriminatorio del dipstick urinario su tutti i campioni e sulle categorie di peso specifico.

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,9 - 100,0	0,00	0,0 - 1,7	1,00	
>0	79,64	74,9 - 83,8	84,58	79,0 - 89,1	5,16	0,24
>30	32,93	27,9 - 38,3	99,07	96,7 - 99,9	35,24	0,68
>100	9,58	6,6 - 13,3	100,00	98,3 - 100,0		0,90
>500	0,00	0,0 - 1,1	100,00	98,3 - 100,0		1,00

Tabella 23: accuratezza diagnostica del dipstick, confrontato con l'UPC

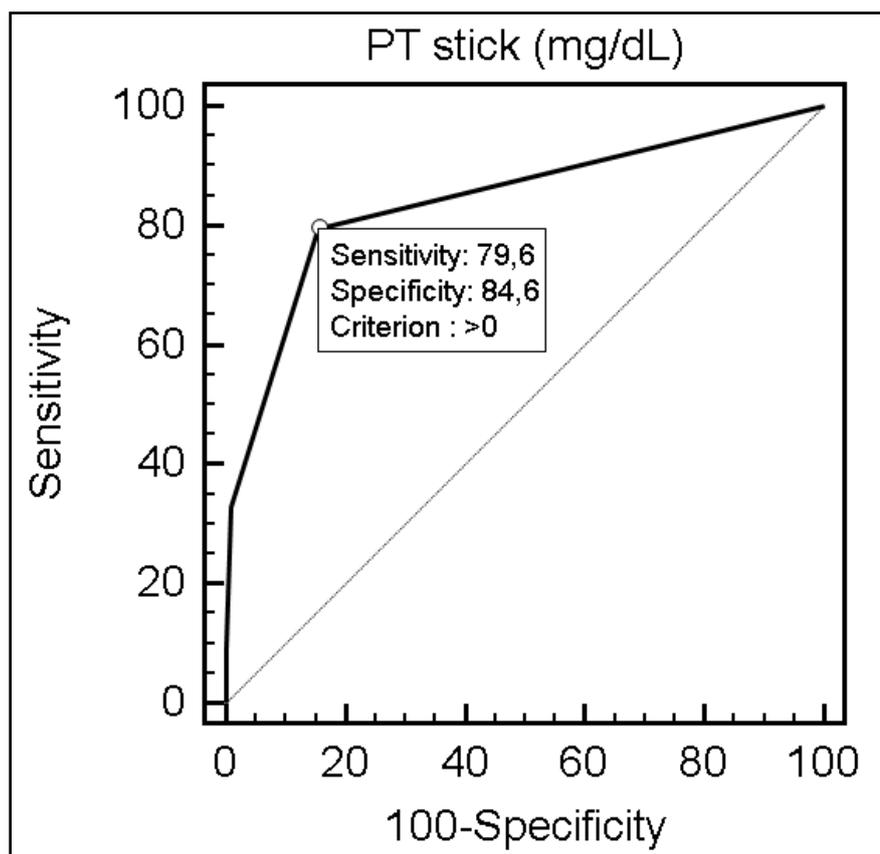


Figura 24: Receiver-operating characteristic curve (ROC curve) del dipstick urinario per i 550 campioni di urine, confrontato con l'UPC. Con AUC 0,84.

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,5 - 100,0	0,00	0,0 - 2,9	1,00	
>0	79,20	73,6 - 84,1	91,13	84,7 - 95,5	8,93	0,23
>30	30,40	24,8 - 36,5	100,00	97,1 - 100,0		0,70
>500	0,00	0,0 - 1,5	100,00	97,1 - 100,0		1,00

Tabella 24: accuratezza diagnostica del dipstick al peso specifico < 1030

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	95,7 - 100,0	0,00	0,0 - 4,0	1,00	
>0	80,95	70,9 - 88,7	75,56	65,4 - 84,0	3,31	0,25
>30	40,48	29,9 - 51,7	97,78	92,2 - 99,7	18,21	0,61
>100	15,48	8,5 - 25,0	100,00	96,0 - 100,0		0,85
>500	0,00	0,0 - 4,3	100,00	96,0 - 100,0		1,00

Tabella 25: accuratezza diagnostica del dipstick al peso specifico ≥ 1030

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	96,2 - 100,0	0,00	0,0 - 8,4	1,00	
>0	70,21	59,9 - 79,2	97,62	87,4 - 99,9	29,49	0,31
>30	15,96	9,2 - 25,0	100,00	91,6 - 100,0		0,84
>500	0,00	0,0 - 3,8	100,00	91,6 - 100,0		1,00

Tabella 26: accuratezza diagnostica del dipstick al peso specifico ≤ 1012

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,5 - 100,0	0,00	0,0 - 2,1	1,00	
>0	83,33	78,0 - 87,8	81,40	74,8 - 86,9	4,48	0,20
>30	39,58	33,4 - 46,1	98,84	95,9 - 99,9	34,04	0,61
>100	12,50	8,6 - 17,4	100,00	97,9 - 100,0		0,88
>500	0,00	0,0 - 1,5	100,00	97,9 - 100,0		1,00

Tabella 27: accuratezza diagnostica del dipstick al peso specifico > 1012

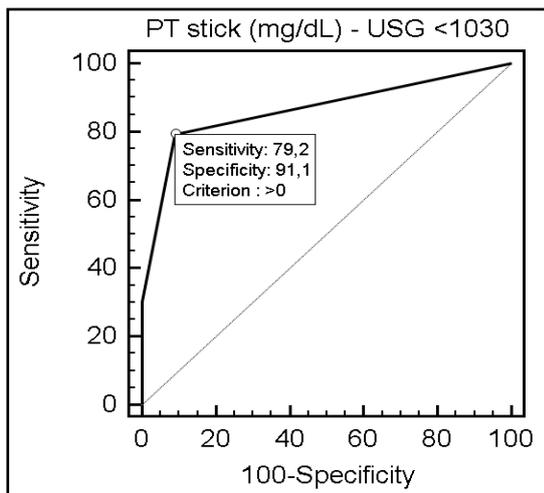


Figura 25: ROC curve con PS < 1030

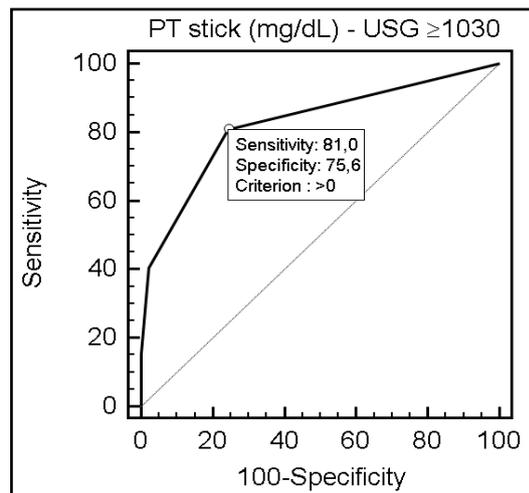


Figura 26: ROC curve con PS ≥ 1030

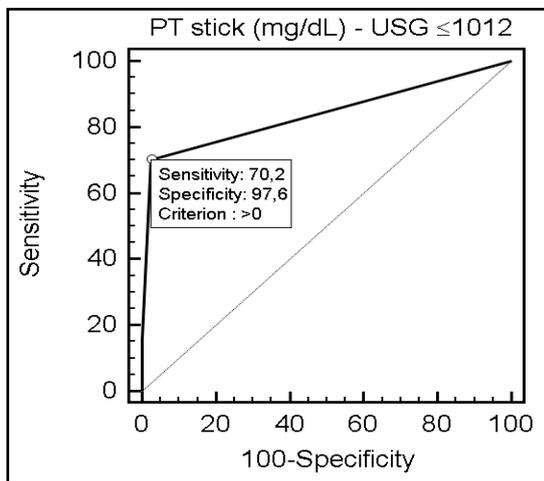


Figura 27: ROC curve con PS ≤ 1012

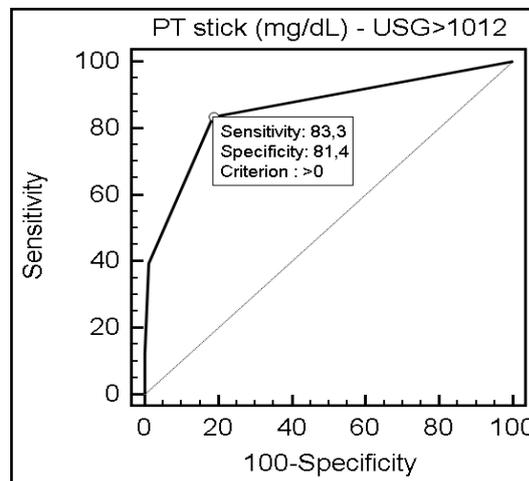


Figura 28: ROC curve con PS > 1012

	AUC (95% CI)	Valore P
Tutti i campioni	0.84 (0.81 - 0.87)	< 0.001
< 1030	0.86 (0.83 - 0.90)	< 0.001
≥ 1030	0.83 (0.76 - 0.88)	< 0.001
≤ 1012	0.84 (0.77 - 0.90)	< 0.001
> 1012	0.86 (0.82 - 0.89)	< 0.001

Tabella 28: potere discriminatorio del dipstick valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

I risultati dell'accuratezza diagnostica e dell'abilità predittiva del dipstick urinario nell'identificare l'albuminuria, con il rapporto UAC al *cut-off* di 0,025 come criterio di confronto, sono esposti nelle **Tabelle** dalla 29 alla 33 e nelle **Figure** dalla 28 alla 32. Nella **Tabella 24** è riassunto il potere discriminatorio del dipstick urinario su tutti i campioni e sulle categorie di peso specifico, in relazione all' UAC al *cut-off* di 0,025.

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,9 - 100,0	0,00	0,0 - 1,7	1,00	
>0	79,28	74,5 - 83,5	84,51	78,9 - 89,1	5,12	0,25
>30	32,43	27,4 - 37,8	98,59	95,9 - 99,7	23,03	0,69
>100	9,01	6,2 - 12,6	99,53	97,4 - 100,0	19,19	0,91
>500	0,00	0,0 - 1,1	100,00	98,3 - 100,0		1,00

Tabella 29: accuratezza diagnostica del dipstick, confrontato con UAC al *cut-off* di 0,025.

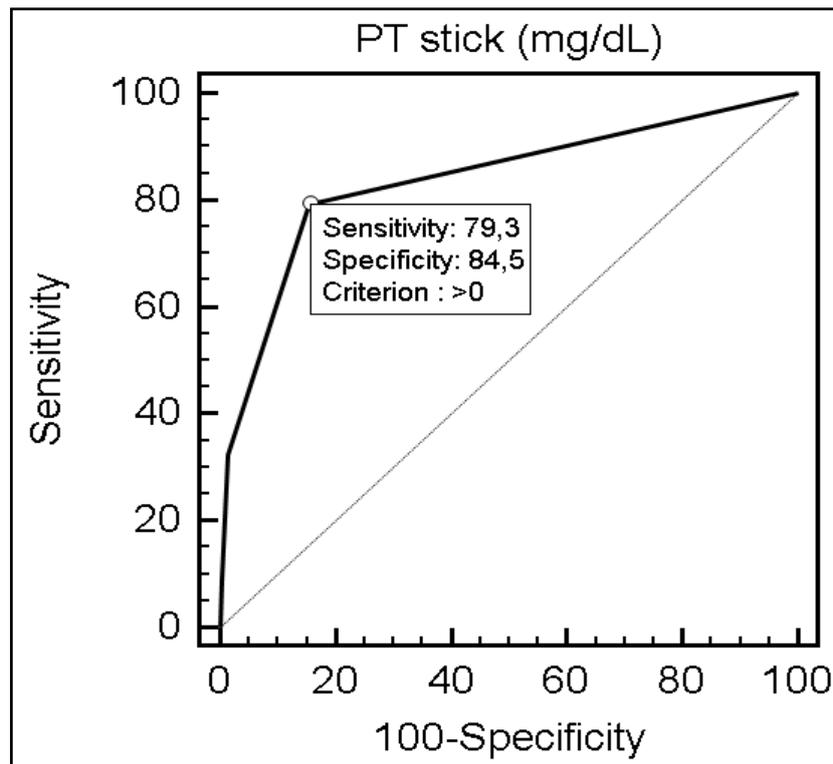


Figura 28: ROC curve del dipstick urinario per i 550 campioni di urine, confrontato con l' UAC al *cut-off* di 0,025. Con AUC 0,84.

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,5 - 100,0	0,00	0,0 - 2,9	1,00	
>0	79,52	74,0 - 84,4	91,94	85,7 - 96,1	9,86	0,22
>30	30,52	24,9 - 36,7	100,00	97,1 - 100,0		0,69
>500	0,00	0,0 - 1,5	100,00	97,1 - 100,0		1,00

Tabella 30: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,025**, al peso specifico < **1030**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	95,7 - 100,0	0,00	0,0 - 4,1	1,00	
>0	78,57	68,3 - 86,8	74,16	63,8 - 82,9	3,04	0,29
>30	38,10	27,7 - 49,3	96,63	90,5 - 99,3	11,30	0,64
>100	13,10	6,7 - 22,2	98,88	93,9 - 100,0	11,65	0,88
>500	0,00	0,0 - 4,3	100,00	95,9 - 100,0		1,00

Tabella 31: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,025**, al peso specifico ≥ **1030**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	96,1 - 100,0	0,00	0,0 - 8,2	1,00	
>0	70,97	60,6 - 79,9	97,67	87,7 - 99,9	30,52	0,30
>30	16,13	9,3 - 25,2	100,00	91,8 - 100,0		0,84
>500	0,00	0,0 - 3,9	100,00	91,8 - 100,0		1,00

Tabella 32: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,025**, al peso specifico ≤ **1012**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,5 - 100,0	0,00	0,0 - 2,1	1,00	
>0	82,50	77,1 - 87,1	81,18	74,5 - 86,8	4,38	0,22
>30	38,75	32,6 - 45,2	98,24	94,9 - 99,6	21,96	0,62
>100	11,67	7,9 - 16,4	99,41	96,8 - 100,0	19,83	0,89
>500	0,00	0,0 - 1,5	100,00	97,9 - 100,0		1,00

Tabella 33: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,025**, al peso specifico > **1012**

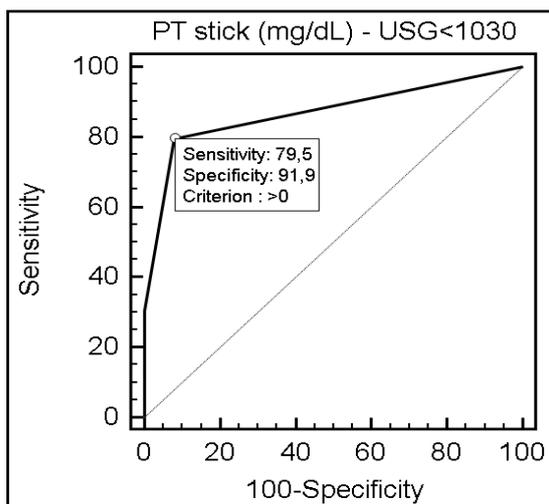


Figura 29: ROC curve con PS < 1030

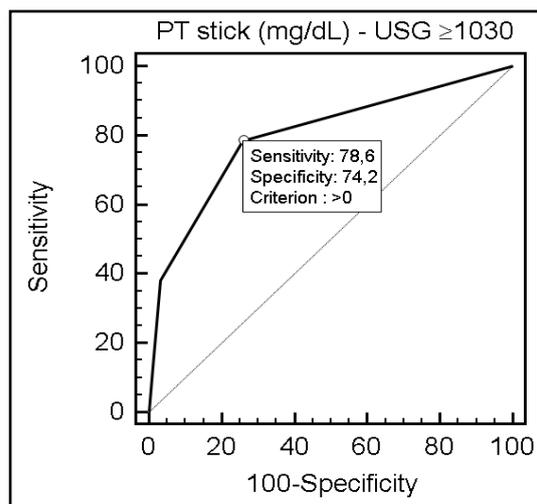


Figura 30: ROC curve con PS ≥ 1030

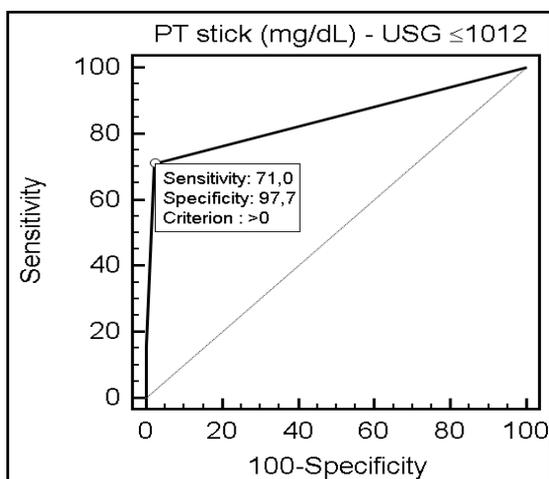


Figura 31: ROC curve con PS ≤ 1012

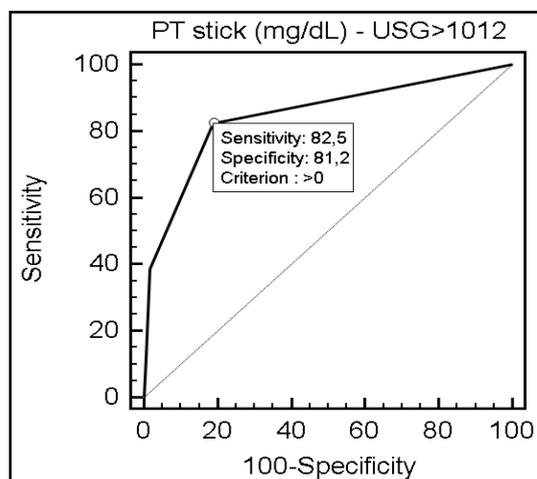


Figura 32: ROC curve con PS > 1012

	AUC (95% CI)	Valore P
Tutti i campioni	0.84 (0.81 - 0.87)	< 0.001
< 1030	0.87 (0.83 - 0.90)	< 0.001
≥ 1030	0.80 (0.73 - 0.86)	< 0.001
≤ 1012	0.85 (0.77 - 0.90)	< 0.001
> 1012	0.85 (0.81 - 0.88)	< 0.001

Tabella 34: potere discriminatorio del dipstick valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

I risultati dell'accuratezza diagnostica e dell'abilità predittiva del dipstick urinario nell'identificare l'albuminuria, con il rapporto UAC al *cut-off* di 0,3 come criterio di confronto, sono esposti nelle **Tabelle** dalla 35 alla 39 e nelle **Figure** dalla 33 alla 37. Nella **Tabella 30** è riassunto il potere discriminatorio del dipstick urinario su tutti i campioni e sulle categorie di peso specifico, in relazione all' UAC al *cut-off* di 0,3.

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0	100,00	98,2 - 100,0	0,00	0,0 - 1,1	1,00	
>0	96,50	92,9 - 98,6	69,94	64,8 - 74,7	3,21	0,050
>30	46,00	38,9 - 53,2	94,51	91,6 - 96,7	8,38	0,57
>100	14,50	9,9 - 20,2	99,42	97,9 - 99,9	25,08	0,86
>500	0,00	0,0 - 1,8	100,00	98,9 - 100,0		1,00

Tabella 35: accuratezza diagnostica del dipstick, confrontato con UAC al *cut-off* di 0,3

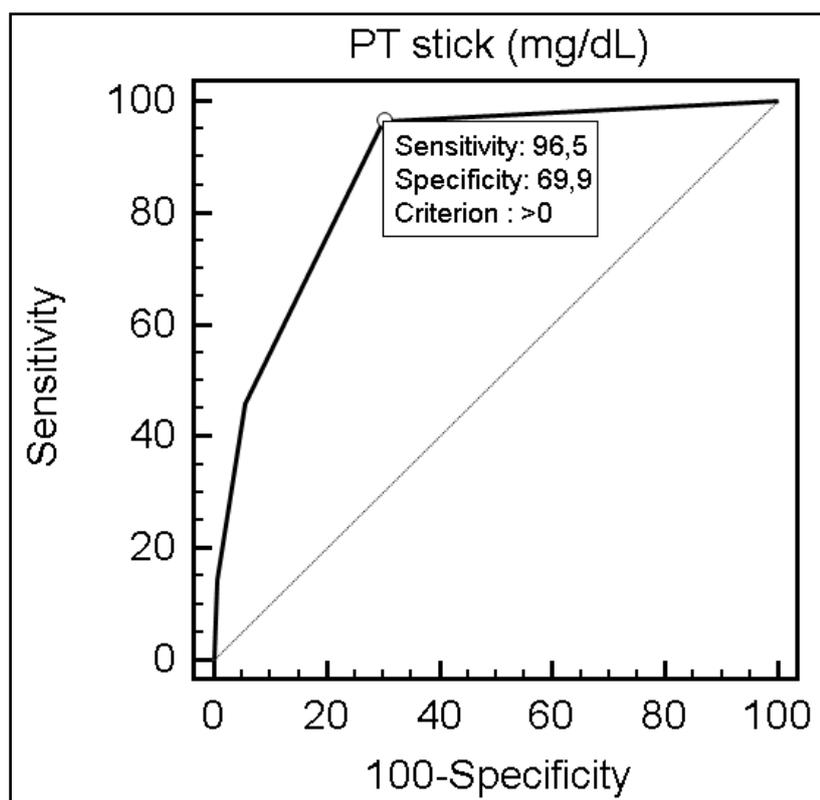


Figura 33: ROC curve del dipstick urinario per i 550 campioni di urine, confrontato con l' UAC al *cut-off* di 0,3. Con AUC 0,89.

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
≥0	100,00	97,7 - 100,0	0,00	0,0 - 1,7	1,00	1,0 - 1,0		
>0	96,18	91,9 - 98,6	73,61	67,2 - 79,4	3,64	2,9 - 4,6	0,052	0,02 - 0,1
>30	44,59	36,7 - 52,7	97,22	94,1 - 99,0	16,05	7,2 - 36,0	0,57	0,5 - 0,7
>100	12,10	7,4 - 18,3	100,00	98,3 - 100,0			0,88	0,8 - 0,9
>500	0,00	0,0 - 2,3	100,00	98,3 - 100,0			1,00	1,0 - 1,0

Tabella 36: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,3**, al peso specifico < **1030**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
≥0	100,00	91,8 - 100,0	0,00	0,0 - 2,8	1,00	1,0 - 1,0		
>0	97,67	87,7 - 99,9	63,85	55,0 - 72,1	2,70	2,1 - 3,4	0,036	0,005 - 0,3
>30	51,16	35,5 - 66,7	90,00	83,5 - 94,6	5,12	2,8 - 9,3	0,54	0,4 - 0,7
>100	23,26	11,8 - 38,6	98,46	94,6 - 99,8	15,12	3,4 - 66,3	0,78	0,7 - 0,9
>500	0,00	0,0 - 8,2	100,00	97,2 - 100,0			1,00	1,0 - 1,0

Tabella 37: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,3**, al peso specifico ≥ **1030**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
≥0	100,00	93,6 - 100,0	0,00	0,0 - 4,5	1,00	1,0 - 1,0		
>0	92,86	82,7 - 98,0	81,25	71,0 - 89,1	4,95	3,1 - 7,9	0,088	0,03 - 0,2
>30	21,43	11,6 - 34,4	96,25	89,4 - 99,2	5,71	1,7 - 19,3	0,82	0,7 - 0,9
>100	3,57	0,4 - 12,3	100,00	95,5 - 100,0			0,96	0,9 - 1,0
>500	0,00	0,0 - 6,4	100,00	95,5 - 100,0			1,00	1,0 - 1,0

Tabella 38: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,3**, al peso specifico ≤ **1012**

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	95% CI	-LR	95% CI
≥0	100,00	97,5 - 100,0	0,00	0,0 - 1,4	1,00	1,0 - 1,0		
>0	97,92	94,0 - 99,6	66,54	60,5 - 72,2	2,93	2,5 - 3,5	0,031	0,01 - 0,10
>30	55,56	47,1 - 63,8	93,98	90,4 - 96,5	9,24	5,6 - 15,2	0,47	0,4 - 0,6
>100	18,75	12,7 - 26,1	99,25	97,3 - 99,9	24,94	6,0 - 103,4	0,82	0,8 - 0,9
>500	0,00	0,0 - 2,5	100,00	98,6 - 100,0			1,00	1,0 - 1,0

Tabella 39: accuratezza diagnostica del dipstick, con UAC al *cut-off* di **0,3**, al peso specifico > **1012**

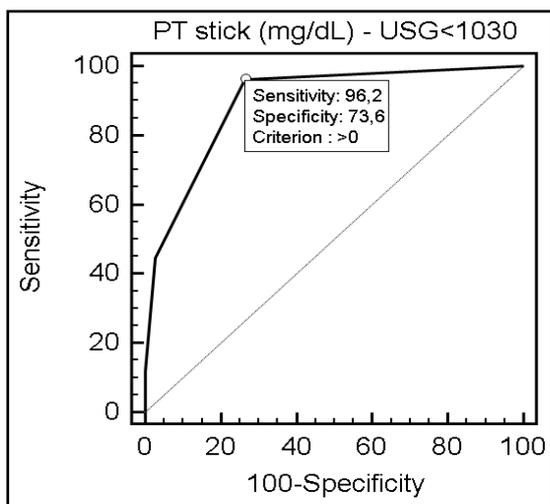


Figura 34: ROC curve con PS < 1030

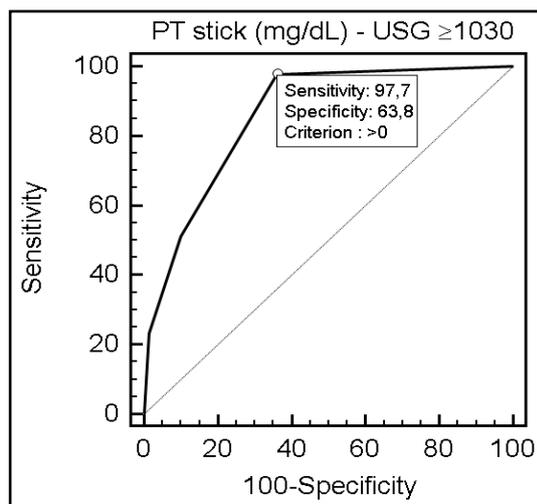


Figura 35: ROC curve con PS ≥ 1030

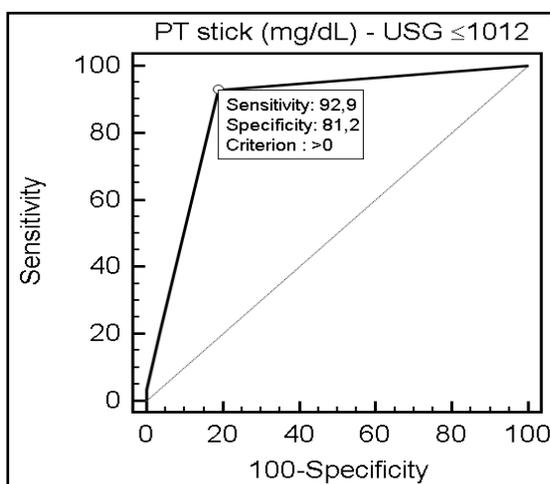


Figura 36: ROC curve con PS ≤ 1012

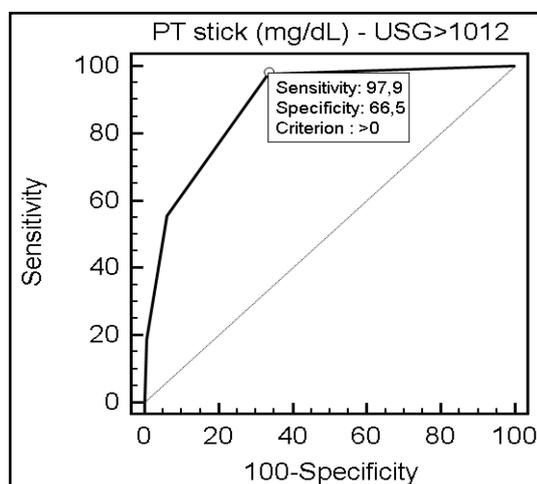


Figura 37: ROC curve con PS > 1012

	AUC (95% CI)	Valore P
Tutti i campioni	0.88 (0.85 - 0.90)	< 0.001
< 1030	0.90 (0.86 - 0.93)	< 0.001
≥ 1030	0.86 (0.80 - 0.91)	< 0.001
≤ 1012	0.87 (0.81 - 0.93)	< 0.001
> 1012	0.89 (0.86 - 0.92)	< 0.001

Tabella 40: potere discriminatorio del dipstick valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

Potere discriminatorio e Accuratezza diagnostica dell'UPC

I risultati dell'accuratezza diagnostica e dell'abilità predittiva dell'UPC nell'identificare l'albuminuria, con il rapporto UAC come criterio di confronto, sono esposti nelle **Tabelle 41 e 42** e nelle **Figure** dalla **33** alla **34**. Nella **Tabella 43** è riassunto il potere discriminatorio dell'UPC su tutti i campioni.

UAC con *cut-off* 0,025 e 0,3

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0,1	100,00	99,3 - 100,0	0,00	0,0 - 1,1	1,00	
>0,1	97,92	96,3 - 99,0	57,69	52,2 - 63,0	2,31	0,036
>0,2	90,55	87,7 - 92,9	83,14	78,7 - 87,0	5,37	0,11
>0,3	82,99	79,5 - 86,1	91,12	87,6 - 93,9	9,35	0,19
>0,4	77,13	73,3 - 80,6	93,49	90,3 - 95,9	11,85	0,24
>0,5	73,72	69,8 - 77,4	94,67	91,7 - 96,8	13,84	0,28
>0,6	70,32	66,2 - 74,2	97,34	95,0 - 98,8	26,41	0,30
>0,7	66,54	62,3 - 70,6	98,22	96,2 - 99,3	37,48	0,34
>0,8	63,71	59,4 - 67,8	98,82	97,0 - 99,7	53,83	0,37
>0,9	60,68	56,4 - 64,9	99,11	97,4 - 99,8	68,37	0,40
>1,2	53,50	49,1 - 57,8	99,11	97,4 - 99,8	60,27	0,47
>1,3	51,98	47,6 - 56,3	99,41	97,9 - 99,9	87,85	0,48
>2	37,43	33,3 - 41,7	99,41	97,9 - 99,9	63,26	0,63
>2,1	36,29	32,2 - 40,6	99,70	98,4 - 100,0	122,68	0,64
>6,1	11,91	9,3 - 15,0	99,70	98,4 - 100,0	40,25	0,88
>6,2	11,72	9,1 - 14,8	100,00	98,9 - 100,0		0,88
>30	0,00	0,0 - 0,7	100,00	98,9 - 100,0		1,00

Tabella 41: accuratezza diagnostica dell'UPC, con UAC al *cut-off* di 0,025

Criterion	Sensitivity	95% CI	Specificity	95% CI	+LR	-LR
≥0,1	100,00	98,9 - 100,0	0,00	0,0 - 0,7	1,00	
>0,3	100,00	98,9 - 100,0	72,63	68,7 - 76,3	3,65	0,00
>0,4	99,37	97,8 - 99,9	79,38	75,7 - 82,7	4,82	0,0079
>0,5	98,43	96,4 - 99,5	82,85	79,4 - 85,9	5,74	0,019
>0,6	96,24	93,5 - 98,0	86,50	83,3 - 89,2	7,13	0,043
>0,7	93,73	90,5 - 96,1	89,23	86,3 - 91,7	8,71	0,070
>0,8	90,60	86,8 - 93,6	90,51	87,7 - 92,8	9,55	0,10
>0,9	87,46	83,3 - 90,9	91,79	89,2 - 93,9	10,65	0,14
>1	84,64	80,2 - 88,4	93,07	90,6 - 95,0	12,21	0,17
>1,1	81,82	77,1 - 85,9	93,80	91,4 - 95,7	13,19	0,19
>1,2	79,94	75,1 - 84,2	94,34	92,1 - 96,1	14,13	0,21
>1,3	78,68	73,8 - 83,0	95,26	93,1 - 96,9	16,58	0,22
>1,4	75,86	70,8 - 80,5	95,62	93,6 - 97,2	17,32	0,25
>1,5	73,98	68,8 - 78,7	96,35	94,4 - 97,8	20,27	0,27
>1,6	71,16	65,9 - 76,1	96,90	95,1 - 98,2	22,94	0,30
>1,7	68,03	62,6 - 73,1	96,90	95,1 - 98,2	21,93	0,33
>1,8	65,52	60,0 - 70,7	97,26	95,5 - 98,5	23,94	0,35
>1,9	62,70	57,1 - 68,0	97,81	96,2 - 98,9	28,63	0,38
>2	59,87	54,3 - 65,3	98,36	96,9 - 99,2	36,46	0,41
>2,1	57,99	52,4 - 63,5	98,54	97,1 - 99,4	39,73	0,43
>2,2	55,80	50,2 - 61,3	98,72	97,4 - 99,5	43,68	0,45
>2,4	51,72	46,1 - 57,3	98,72	97,4 - 99,5	40,49	0,49
>2,5	51,10	45,5 - 56,7	99,09	97,9 - 99,7	56,00	0,49
>2,6	49,84	44,2 - 55,5	99,09	97,9 - 99,7	54,63	0,51
>2,7	49,22	43,6 - 54,8	99,27	98,1 - 99,8	67,43	0,51
>2,8	47,96	42,4 - 53,6	99,27	98,1 - 99,8	65,71	0,52
>2,9	46,39	40,8 - 52,0	99,45	98,4 - 99,9	84,75	0,54
>3	44,20	38,7 - 49,8	99,45	98,4 - 99,9	80,74	0,56
>3,1	42,95	37,4 - 48,6	99,64	98,7 - 100,0	117,67	0,57
>3,5	37,62	32,3 - 43,2	99,64	98,7 - 100,0	103,07	0,63
>3,6	36,68	31,4 - 42,2	99,82	99,0 - 100,0	200,99	0,63
>6,1	19,75	15,5 - 24,5	99,82	99,0 - 100,0	108,23	0,80
>6,2	19,44	15,2 - 24,2	100,00	99,3 - 100,0		0,81
>30	0,00	0,0 - 1,1	100,00	99,3 - 100,0		1,00

Tabella 42: accuratezza diagnostica dell'UPC, con UAC al *cut-off* di **0,3**

	AUC (95% CI)	Valore P
UAC <i>cut-off</i> 0,025	0.94 (0.92 - 0.96)	< 0.001
UAC <i>cut-off</i> 0,3	0.97 (0.96 - 0.98)	< 0.001

Tabella 43: potere discriminatorio del dipstick valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

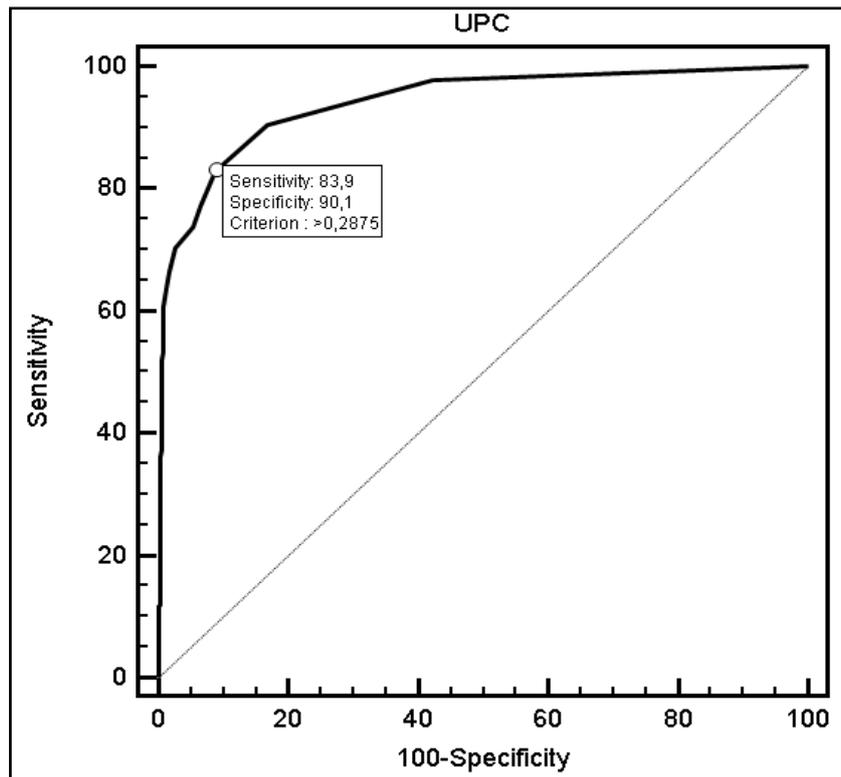


Figura 33: ROC curve dell'UPC per gli 868 campioni di urine, confrontato con l' UAC al *cut-off* di **0,025**. Con AUC **0,94**.

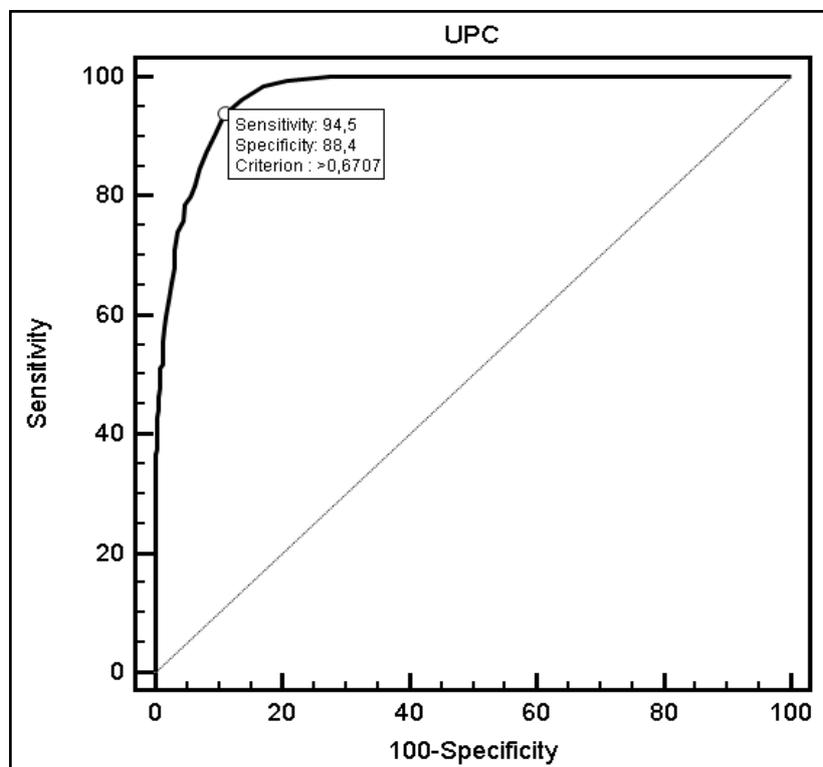


Figura 34: ROC curve dell'UPC per gli 868 campioni di urine, confrontato con l' UAC al *cut-off* di **0,3**. Con AUC **0,97**.

Confronto statistico tra UPC, UAC e Dipstick urinario

I risultati dell'accuratezza diagnostica e dell'abilità predittiva di UPC, UAC e Dipstick urinario messi a confronto, sono esposti nelle **Tabelle** dalla **44** alla **47** e nelle **Figure** dalla **44** alla **48**.

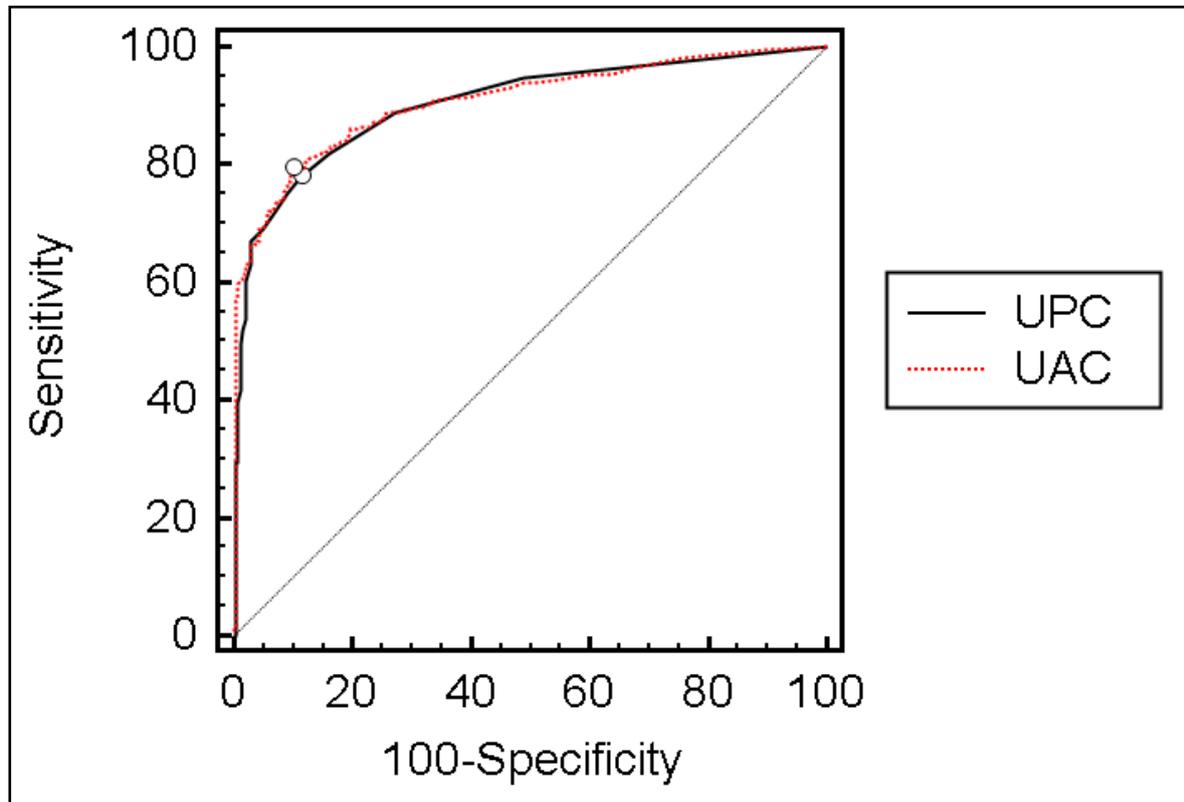


Figura 35: ROC curve di UPC e UAC confrontate con il **Dipstick urinario ≥ 30 mg/dl**

	AUC (95% CI)	Valore <i>P</i>
UPC	0.904 (0.88 - 0.93)	0.67
UAC	0.908 (0.88 - 0.93)	0.67

Tabella 44: potere discriminatorio dell'UPC e dell'UAC confrontate con il **Dipstick urinario ≥ 30 mg/dl** valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

Per il dipstick con il *cut-off* di **30 mg/dl** sono presenti risultati analoghi **non significativi**.

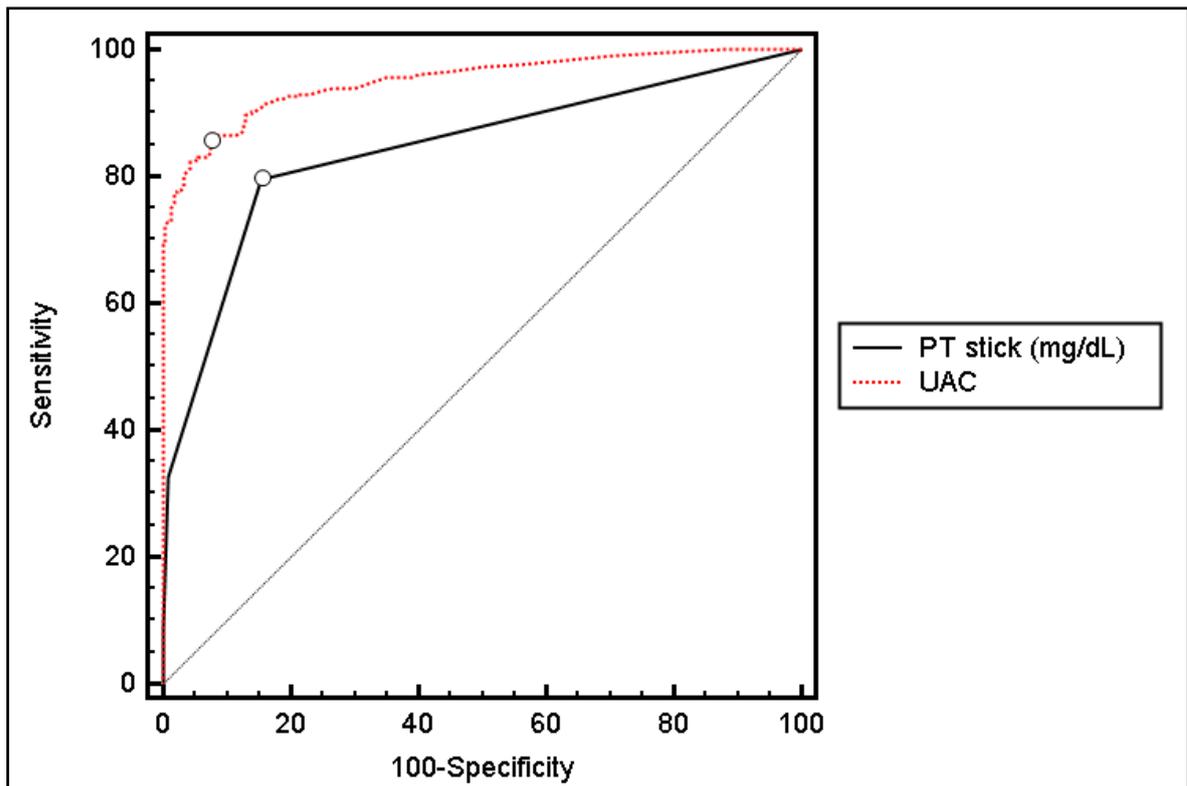


Figura 36: ROC curve del Dipstick e dell'UAC confrontate con l'UPC > 0,2

	AUC (95% CI)	Valore <i>P</i>
Dipstick	0.843 (0.81 - 0.87)	< 0.0001
UAC	0.952 (0.93 - 0.97)	< 0.0001

Tabella 45: potere discriminatorio del Dipstick e dell'UAC confrontate con l'UPC > 0,2 valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

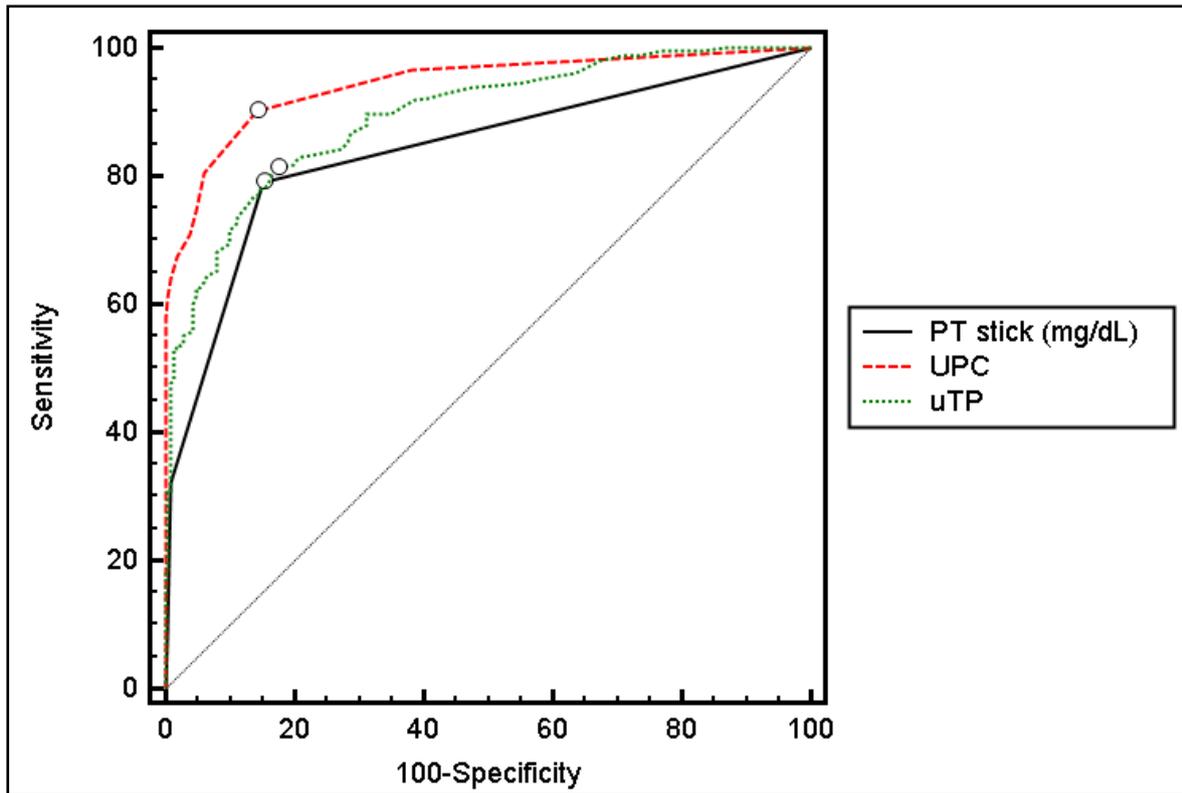


Figura 37: ROC curve di UPC, Proteine Totali urinarie e Dipstick confrontate con l'UAC con *cut-off* di 0.025

	AUC (95% CI)	Valore <i>P</i>
Dipstick	0.841 (0.81 - 0.87)	< 0.0001
UPC	0.944 (0.92 - 0.96)	< 0.0001
uTP	0.894 (0.87 - 0.92)	< 0.0001

Tabella 46: potere discriminatorio di UPC, Proteine Totali urinarie e Dipstick confrontate con l'UAC con *cut-off* di 0.025 valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

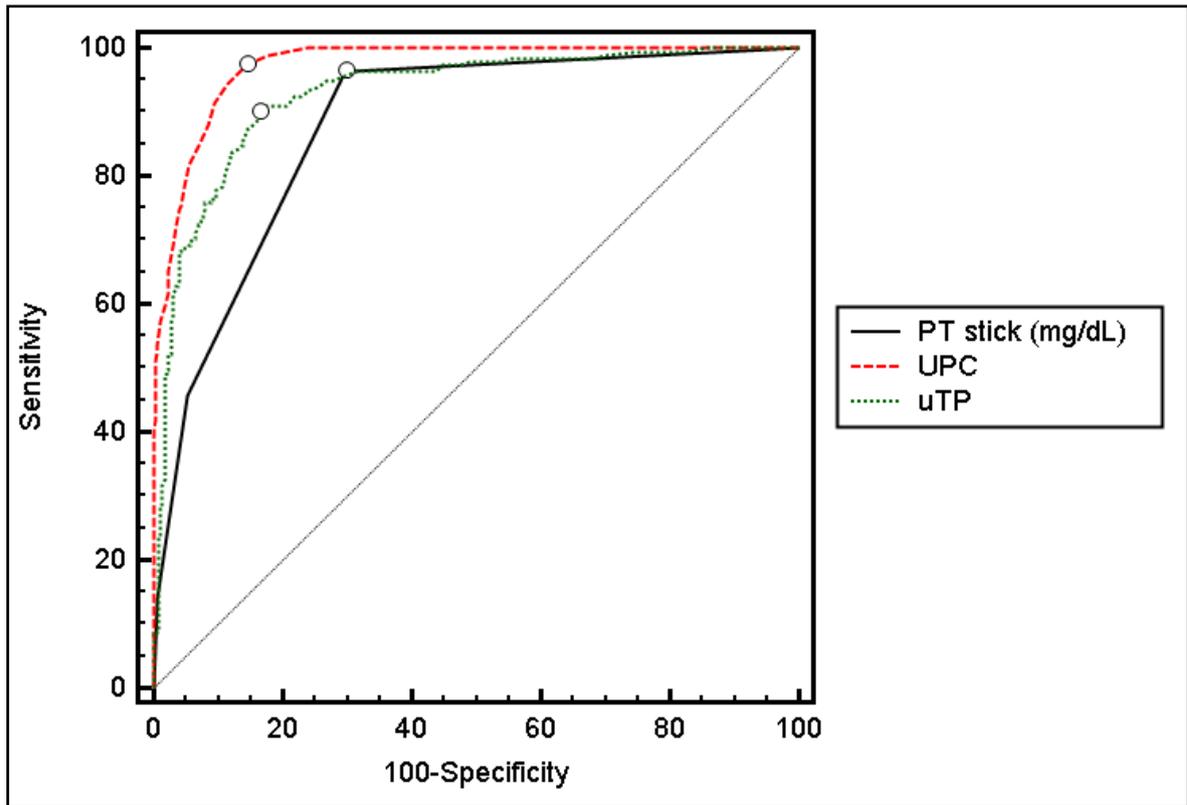


Figura 38: ROC curve di UPC, Proteine Totali urinarie e Dipstick confrontate con l'UAC con *cut-off* di 0.3

	AUC (95% CI)	Valore <i>P</i>
Dipstick	0.879 (0.85 - 0.91)	< 0.0001
UPC	0.972 (0.96 - 0.98)	< 0.0001
uTP	0.929 (0.90 - 0.95)	< 0.0001

Tabella 47: potere discriminatorio di UPC, Proteine Totali urinarie e Dipstick confrontate con l'UAC con *cut-off* di 0.3 valutato tramite l'area sotto la curva (AUC)

Correlazione statistica tra UPC, UAC e Dipstick urinario

I risultati della correlazione statistica tra UPC, UAC e Dipstick urinario, utilizzando il coefficiente di Spearman, sono esposti nella **Tabella 49**. Tutti i risultati hanno un valore **P < 0,001**.

		UPC	UAC	PT Stick
UPC	Tutti i campioni		0,900	0,736
	< 1030		0,917	0,793
	≥ 1030		0,844	0,663
	≤ 1012		0,924	0,815
	> 1012		0,889	0,739
UAC	Tutti i campioni	0,900		0,738
	< 1030	0,917		0,800
	≥ 1030	0,844		0,624
	≤ 1012	0,924		0,805
	> 1012	0,889		0,733
PT Stick	Tutti i campioni	0,736	0,738	
	< 1030	0,793	0,800	
	≥ 1030	0,663	0,624	
	≤ 1012	0,815	0,805	
	> 1012	0,739	0,733	

Tabella 49: correlazione tra UPC, UAC e Dipstick urinario in relazione a tutti i campioni e ai alle diverse categorie in base al peso specifico

CAPITOLO VI

Discussione

Per raggiungere gli obiettivi dello studio è stato necessario ottenere degli intervalli di riferimento e quindi un *cut-off* di albuminuria per discriminare tra pazienti albuminurici e pazienti non albuminurici. Per fare questo sono stati selezionati 54 cani ed è stato ottenuto un valore soglia di rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria (UAC) di 0,024. A nostra conoscenza la letteratura a riguardo è limitata e riporta valori soglia di 0,03 (Mazzi *et al.*, 2008; Yu-hsin *et al.*, 2010), 0,05 (Mastrorilli *et al.*, 2007) e 0,008 (Shaefer *et al.*, 2011) o intervalli trasposti nel cane dalla medicina umana in cui il limite soglia è ben definito ed è di 0,03 (Tvarijonaviciute *et al.*, 2013). Il numero di cani utilizzati per definire l'intervallo di riferimento in questo studio è superiore al numero finora utilizzato in letteratura. Si ritiene, tuttavia, che il gruppo presenti un numero di cani "sani" appena adeguato per poter definire correttamente gli intervalli di riferimento per l'albuminuria e quindi la casistica sarà ampliata in studi successivi.

I pazienti sono stati selezionati per lo studio riguardante il confronto tra Dipstick, UPC e UAC in presenza di sedimento inattivo a partire da Gennaio 2008, data alla quale il Servizio di Patologia Clinica Veterinaria ha iniziato ad utilizzare il dipstick urinario *DIRUI*[®], serie H10. Il confronto di UPC e UAC, in presenza di sedimento inattivo, ha coinvolto un numero maggiore di campioni ed è stato condotto da Gennaio 2002 fino a Dicembre 2012. Entrambe queste casistiche si presentano molto ampie, rispettivamente 550 e 868 campioni, e superiori a quanto riportato in letteratura per studi analoghi (Garner *et al.*, 2007; Zatelli *et al.*, 2010; Lyon *et al.*, 2010). Il numero elevato di campioni e la corretta proporzione tra campioni proteinurici e non proteinurici (mediana UPC 0,4) in analogia con quanto stabilito dall'IRIS-group e come largamente accettato dalla comunità scientifica (UPC > 0,5, vedi *Appendice I*), così come l'adeguata proporzione tra campioni con adeguata/inadeguata concentrazione urinaria (mediana USG 1024), ha consentito diverse categorizzazioni e un'accurata analisi statistica.

La popolazione presa in esame ha un'età mediana di circa 8 anni, prevalentemente di sesso maschile (55%), sono più rappresentati i meticci (32%), i pastori tedeschi, i setter inglesi, i boxer, i labrador e gli yorshire terrier. I campioni di urine sono stati prelevati nel 24% dei casi per minzione spontanea, nel 9% per cistocentesi e nel 2% per cateterismo urinario, ma per il 65% dei campioni non è noto il metodo di prelievo che probabilmente è in larga parte rappresentato da campioni prelevati per minzione spontanea, così come avviene nella pratica clinica. A causa della scarsità di questi dati, non è stato possibile valutare l'influenza del metodo di prelievo sui test diagnostici utilizzati. Tuttavia, nella recente letteratura scientifica, uno studio dimostra che l'UPC non è significativamente influenzata dal metodo di prelievo (Beatrice *et al.*, 2010) e questo potrebbe essere valido anche per il dipstick. L'influenza del metodo di prelievo per quanto riguarda l'albuminuria non è ancora stata valutata in medicina veterinaria, quindi sono necessari ulteriori studi focalizzati soprattutto per i pazienti non proteinurici o con proteinurie lievi ($UPC < 1,0$). Nonostante ciò si ritiene improbabile che le proteine delle vie urinarie inferiori siano in grado di influenzare l'UAC, in quanto, solitamente, se presenti, sono proteine non albuminiche (es. proteine di Tamm-Horsfall).

I cani sono stati inclusi nella popolazione di studio in base alla presenza di almeno un esame delle urine e sono stati esclusi i campioni che non presentavano l'analisi del sedimento urinario, l'analisi della proteinuria, l'analisi dell'albuminuria e quelli che presentavano pigmenturia macroscopica, pH urinario $>$ di 7,5 e un sedimento attivo. In questo studio, i parametri di esclusione in base alla presenza di leucociti e eritrociti sono stati più restrittivi rispetto a quanto riportato in medicina veterinaria e in uno studio si intende come "attivo" un sedimento in presenza di >1 batteri/HPF, >250 eritrociti/HPF, > 5 leucociti/HPF (Vaden SL *et al.*, 2004). L'adozione di criteri così restrittivi ha probabilmente eliminato campioni potenzialmente utili ai fini dello studio, ma ci consente di escludere con ragionevole certezza che la flogosi delle vie urinarie inferiori possa aver determinato una proteinuria extra renale nei campioni inclusi. Tuttavia, uno studio precedente (Vaden SL *et al.*, 2004) ha mostrato che la presenza di urine attive (es. piuria) difficilmente influenza la misurazione della proteinuria che, se elevata, è solitamente un segno di danno renale parenchimale.

Il 61% dei campioni presi in esame presenta una albuminuria al di sopra dell'intervallo di riferimento, come visto nella Figura 18 B. Tramite l'utilizzo dell' UAC, inoltre, all'interno del 38 % dei campioni valutati come "non proteinurici" ($UPC < 0,2$) il 15 % dei campioni risulta in realtà albuminurico. Invece, del 62% dei campioni considerati come

"proteinurici", l'89% risulta effettivamente albuminurico e la restante parte non albuminurica (Figura 18 C). Questo dato preliminare, nuovo per la medicina veterinaria, è interessante, in quanto evidenzia la capacità dell' UAC di individuare in maniera più accurata i pazienti proteinurici e potenzialmente affetti da danno renale all'interno della popolazione di studio. Questi dati si presentano in linea con la letteratura scientifica che individua l'UAC come il gold standard per identificare precocemente i pazienti con CKD in medicina umana (Danziger, 2008). Dati analoghi sono fortemente limitati in medicina veterinaria allo stato attuale (Grauer, 2012).

Tuttavia, è necessario evidenziare come un 11% di campioni proteinurici sono non albuminurici, suggerendo la presenza di proteine urinarie non albuminiche in quantità superiore all'intervallo di riferimento. Questi campioni mostrano valori di UPC superiori a 0,2, ma inferiori a 1,0. Nella pratica clinica, situazioni analoghe sono imputabili a proteinurie renali di origine tubulare, caratterizzate da incrementi lievi o moderati dell'UPC a causa di alterazioni del riassorbimento tubulare di proteine a basso peso molecolare.

Questi risultati suggeriscono che l'uso combinato di UPC e UAC potrà fornire al nefrologo un utile strumento per la diagnosi precoce di nefropatia, sia essa glomerulare o tubulare.

In base alla proteinuria allo stick i pazienti sono stati considerati proteinurici o non proteinurici con due modalità differenti, ovvero, ≥ 30 mg/dl ($n=301$) o <30 mg/dl ($n=249$) e ≥ 100 mg/dl ($n=114$) o < 100 mg/dl ($n=436$). Se nel primo caso questa categorizzazione ha permesso un confronto di gruppi omogenei, nel secondo caso essa ha determinato una netta sproporzione numerica tra i gruppi e questo potrebbe aver avuto ripercussioni sull'analisi statistica per ciò che riguarda il coefficiente di concordanza.

L'utilizzo del coefficiente di concordanza ha permesso di evidenziare come esista una *agreement* sostanziale (0,62) tra la proteinuria al dipstick e l'UPC, considerando come positivi campioni con proteinuria al dipstick ≥ 30 mg/dl. Risultati analoghi sono presenti a tutti i *cut-off* di peso specifico ed in particolare il valore più elevato si verifica per i campioni con un PS <1030 (0,65). Tali risultati sono in analogia con quanto riportato in precedenza e, seppur con alcune differenze, indicano come l'*agreement* tra i due metodi sia moderato o addirittura scarso/minimo se si utilizza un *cut-off* di positività al dipstick ≥ 100 mg/dl. Per ciò che riguarda l'*agreement* tra proteinuria al dipstick e UAC l'analisi statistica ha fornito risultati analoghi ai precedenti evidenziando come la concordanza maggiore si verifica per campioni considerati positivi con proteinuria al dipstick ≥ 30 mg/dl (0,62). Risultati analoghi non sono presenti in letteratura e ci indicano che il dipstick è in grado di diagnosticare correttamente la proteinuria e l'albuminuria in solo 6 casi su 10 con *cut-off* \geq

30 mg/dl. I nostri risultati sono in contrasto con dati precedenti presenti in letteratura per quanto riguarda il *cut-off* di proteinuria al dipstick ≥ 100 mg/dl (Zatelli *et al.*, 2010). Questo risultato potrebbe essere determinato dall'utilizzo di un diverso dipstick, dall'utilizzo di una diversa metodica di prelievo e dal numero diverso di campioni di urine presi in esame. Inoltre, un'altra differenza importante potrebbe risiedere nell'utilizzo di un lettore automatico per il dipstick nel presente studio, a differenza di quanto riportato da Zatelli e collaboratori dove la lettura del dipstick è stata affidata ad un operatore (Zatelli *et al.*, 2010).

L'utilizzo delle curve di ROC ha permesso di evidenziare come il dipstick fornisca una percentuale elevata di diagnosi corrette a prescindere dal peso specifico, se classificato come positivo contro l'UPC $> 0,2$ (AUC 0,84). Tali risultati sono leggermente inferiori, ma analoghi a quanto riportato in uno studio precedente (Zatelli *et al.*, 2010).

Nel nostro studio è stata eseguita una medesima analisi utilizzando, per fornire la diagnosi corretta, l'UAC a due differenti *cut-off* di 0,025 e di 0,3. Le AUC sono in linea con quelle fornite dai risultati dell'UPC, tuttavia il potere discriminatorio del dipstick con un *cut-off* di UAC a 0,3 è maggiore (AUC 0,89). Questo significa che con valori elevati di albuminuria il dipstick presenta un'accuratezza maggiore. In particolar modo il test presenta una specificità del 99% quando il risultato è ≥ 100 mg/dl, indicando che un paziente con un 2+ di proteine al dipstick è sicuramente albuminurico a prescindere dal peso specifico. Se il test viene eseguito in urine con PS < 1012 si raggiunge una specificità del 98% per valori di proteine al dipstick ≥ 30 mg/dl (vedi **Tabelle 50 e 51**).

UPC 0,2			
	0 +	1 +	$\geq 2 +$
≤ 1012	Non Proteinurici	Proteinurici	Proteinurici
> 1012 e < 1030	Non Proteinurici	$\approx 85\%$ Proteinurici	Proteinurici
≥ 1030	Non Proteinurici	$\approx 75\%$ Proteinurici	Proteinurici

Tabella 50: casi "non proteinurici" e "proteinurici" al dipstick, riferiti ai diversi PS, confrontati con l'UPC al *cut-off* di 0,2

UAC 0,025			
	0 +	1 +	≥ 2 +
≤ 1012	Non Albuminurici	Albuminurici	Albuminurici
> 1012 e < 1030	Non Albuminurici	≈ 80% Albuminurici	Albuminurici
≥ 1030	Non Albuminurici	≈ 70 % Albuminurici	Albuminurici

Tabella 51: casi "non albuminurici" e "albuminurici" al dipstick, riferiti ai diversi PS, confrontati con l'UAC al *cut-off* di 0,025

La correlazione tra i diversi metodi ha fornito risultati statisticamente significativi e che dimostrano una correlazione elevata tra i metodi, in particolar modo il coefficiente di correlazione r era di 0,73 dipstick-UPC, 0,73 dipstick-UAC e 0,9 UAC-UPC. Tali risultati sono in analogia con quanto riportato in letteratura (Garner *et al.*, 2007), anche se significativamente superiori. Lo studio infatti riportava valori di r pari a 0,66 dipstick-UPC e 0,72 dipstick-albuminuria e 0,83 UPC-albuminuria. Tali risultati possono essere imputabili all'utilizzo di un diverso dipstick e una diversa metodica per la valutazione dell'albumina urinaria.

I risultati più importanti e innovativi di questo studio sono quelli che provengono dal confronto tra UPC e UAC. Come mostrato in precedenza i due metodi si presentano fortemente correlati ($r = 0,90$) e mostrano un coefficiente di concordanza altrettanto elevato per la diagnosi di albuminuria se si utilizza un *cut-off* di UAC 0.025 ($k = 0,76$). La percentuale di diagnosi corretta in termini di rilievo dell'albuminuria da parte dell'UPC è rispettivamente del 94% e del 97% per *cut-off* di UAC di 0,025 e di 0,3. In particolar modo l'UPC presenta il massimo di sensibilità e specificità tra 0,2 e 0,3 nel diagnosticare l'albuminuria in base ai *cut-off* di UAC definiti in questo studio (0,025). Tale valore rappresenta il valore inferiore di proteinuria riportato nelle guide IRIS (vedi *Appendice D*). Nella pratica clinica l'UPC viene utilizzato più frequentemente per quantificare la proteinuria, rispetto all'UAC. Il sistema IRIS identifica i pazienti con UPC tra 0,2 e 0,5 come *borderline proteinurici*, ovvero pazienti che si trovano in una zona grigia per la quale ancora non si conosce se il paziente è realmente proteinurico o non proteinurico. Nella pratica clinica si è soliti considerare un paziente come proteinurico con un UPC > di 0,4 o > di 0,5. Fino a pochi anni fa, in medicina veterinaria, si consideravano come proteinurici i pazienti con UPC > di 1,0, ma questo limite soglia è stato progressivamente ridotto, così

come avvenuto in medicina umana in cui si tendono a considerare patologiche anche quantità minime di albumina urinaria. Infatti ad oggi, in medicina umana, l'UPC è soppiantato dall'UAC come strumento diagnostico nella valutazione precoce della malattia renale e nel monitoraggio della CKD. Nel nostro studio si evidenzia che campioni con UPC > 0,2 possono presentarsi albuminurici. Nonostante siano state utilizzate metodiche differenti, questi dati sono in analogia con la più recente letteratura scientifica (Lyon *et al.*, 2010). Con *cut-off* di UAC a 0,025, già un valore di UPC > 0,2 presenta una sensibilità del 91% e una specificità dell'83% per la diagnosi di albuminuria. Questo indica che l'UAC può essere un valido strumento per identificare i pazienti con un lieve grado di albuminuria e quindi con una maggiore probabilità di sviluppare una nefropatia, ma se utilizzato con valori soglia più bassi rispetto a quelli finora indicati (IRIS). Con *cut-off* di UAC > 0,3, che diagnostica in umana una *overt albuminuria*, la massima sensibilità e specificità dell'UPC si ottengono per valori di 0,7 (rispettivamente 95% e 88%), indicando come pazienti con un lieve incremento dell'UPC al di sopra del valore soglia di 0,5 possono avere una grave proteinuria.

Il confronto statistico tra i test diagnostici utilizzati mostra che sia l'UPC, che l'UAC (rispettivamente con AUC 0,904 e 0,908) sono metodiche ugualmente accurate per valutare la proteinuria, se confrontate con il dipstick con valori positivi ≥ 30 mg/dl (Figura 31, Tabella 33), in assenza di una differenza statisticamente significativa tra esse ($P = 0,67$). Tale approccio ha l'unica utilità di valutare il potere dell'UPC e dell'UAC in relazione al dipstick per ciò che riguarda la diagnosi di proteinuria (ipotizzando erroneamente che la diagnosi corretta sia ottenuta tramite il dipstick).

Se si utilizza l'UAC come gold standard per la diagnosi di albuminuria con un *cut-off* di 0,025 o di 0,3 e si allestiscono delle curve di ROC e se ne esegue un confronto risulta evidente come l'UPC abbia un'accuratezza significativamente maggiore (AUC 0,944 e 0,972, rispettivamente) rispetto alla proteinuria in valore assoluto (uTP) e alla proteinuria valutata con il dipstick.

In conclusione, secondo il nostro studio, a qualsiasi peso specifico, con valori di proteine di 0 + il dipstick urinario risulta essere molto utile dal punto di vista clinico grazie al suo alto potere predittivo negativo per diagnosticare i pazienti non proteinurici e non albuminurici. Inoltre, cani con valori al dipstick $\geq 2+$ sono sicuramente proteinurici, quindi è necessario quantificare l'albuminuria o la proteinuria tramite UAC e UPC. L'UAC risulta essere il gold standard per la diagnosi dell'albuminuria, anche per i pazienti con gradi lievi di albuminuria e quindi nei pazienti considerati dall'IRIS come *borderline proteinurici*.

L'UPC, nonostante presenti un'accuratezza diagnostica e un'abilità predittiva inferiore rispetto all'UAC, va comunque considerato come un valido strumento diagnostico per diagnosticare l'albuminuria, ma richiede dei *cut-off* inferiori rispetto a quelli proposti dalla letteratura ($UPC < 0,2$).

Infine, in questo studio non sono stati valutati gli andamenti clinici dei pazienti per determinare quali di essi hanno e non hanno sviluppato una malattia renale. Le prospettive di studio future sono quelle di valutare le metodiche analizzate in pazienti con e senza patologie renali, diagnosticate tramite l'utilizzo di biopsie renali e di comparare i risultati dei test dell'albuminuria con i risultati dei test istologici

BIBLIOGRAFIA

- **Abbate *et al.* , 2006**
Mauro Abbate, Carla Zoja, Giuseppe Remuzzi. How Does Proteinuria Cause Progressive Renal Damage?. *Journal of American Society of Nephrology* 17: 2974–2984 2006

- **Adams *et al.* , 1992**
Adams LG, Polzin DJ, Osborne CA, et al. Correlation of urine protein/creatinine ratio and twenty-four-hour urinary protein excretion in normal cats and cats with surgically induced chronic renal failure. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 6:36–40 1992

- **Aldámiz-Echevarría *et al.* , 2012**
Aldámiz-Echevarría L, Andrade F. Asymmetric dimethylarginine, endothelial dysfunction and renal disease. *Internal Journal of Molecular Science*. 13(9):11288-311 2012

- **Amin *et al.* , 2013**
Amin A.P., Connel A.T.W., Li S., Chen S.C., McCullough P.A., Kosiborod M.N. The synergistic relationship between estimated GFR and microalbuminuria in predicting long term progression to ESRD or death in patients with diabetes: result from the kidney early evaluation program (KEEP). *Am J Kidney Dis* 61(4)(suppl2); 2013

- **Astor *et al.* , 2011**
Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, van der Velde M, Woodward M, Levey AS, Jong PE, Coresh J; Astor BC, Matsushita K, Gansevoort RT, van der Velde M, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El-Nahas M, Eckardt KU, Kasiske BL, Wright J, Appel L, Greene T, Levin A, Djurdjev O, Wheeler DC, Landray MJ, Townend JN, Emberson J, Clark LE, Macleod A, Marks A, Ali T, Fluck N, Prescott G, Smith DH, Weinstein JR, Johnson ES, Thorp ML, Wetzels JF, Blankestijn PJ, van Zuilen AD, Menon V, Sarnak M, Beck G, Kronenberg F, Kollerits B, Froissart M, Stengel B, Metzger M, Remuzzi G, Ruggenenti P, Perna A, Heerspink HJ, Brenner B, de Zeeuw D, Rossing P, Parving HH, Auguste P, Veldhuis K, Wang Y, Camarata L, Thomas B, Manley T. Chronic kidney disease prognosis consortium. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with mortality and end-stage renal disease. A collaborative meta-analysis of kidney disease population cohorts. *Kidney International* 79:1331–40. 2011

- **Bacic *et al.* , 2010**
 Angela Bacic, Màrcia M. Kogika, Kàtia C. Barbaro, Cristina S. Iuamoto, Denise M. N. Simones, Marcelo L. Santoro. Evaluation of albuminuria and its relationship with blood pressure in dogs with chronic kidney disease. *Veterinary Clinical Pathology* 39(2):203-9 2010

- **Beatrice *et al.* , 2010**
 Betarice L., Nizi F., Callegari D., paltrinieri S., Zini E., D'Ippolito P., Zatelli A. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *Journal of the American veterinary Medical Association* 236:1221-1224, 2010

- **Bello *et al.* , 2010**
 Aminu Bello, Bisher Kawar, Mohsen El Kossi, Meguid El Nahas. Epidemiology and Pathophysiology of Chronic Kidney Disease. In: Jürgen Floege Richard J. Johnson, John Feehally *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 2010

- **Bermudez *et al.* , 2011**
 R. Montañés Bermúdez, S. Gràcia García, D. Pérez Surribas, A. Martínez Castelao, J. Bover Sanjuán. Consensus Document. Recommendations on assessing proteinuria during the diagnosis and follow-up of chronic kidney disease. *Nefrologia*. *Nefrologia* 31(3):331-45 2011

- **Brinkman *et al.* , 2004**
 Brinkman L.W., Bakker S.J., Gansevoort R.T., Hillege H.L., Kema I.P., Gans R.O., De Jong P.E., Zeeuw D. Which method for quantifying urinary albumin excretion gives what outcome? A comparison of immunonephelometry with HPLC. *Kidney Int Supply* Nov (92):S69-75; 2004

- **Birn *et al.* , 2006**
 Birn H, Christensen E. Renal albumin absorption in physiology and pathology. *Kidney International* 69:440-9 2006

- **Brown , 2011**
 Scott Brown. Systemic arterial hypertension. in: Joe Bartges and David J.Polzin. *Nephrology and Urology of Small Animals*. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 677-683 2011

- **Buemi *et al.* , 2005**
 Buemi M, Nostro L, Crasci E, Barillà A, Cosentini V, Aloisi C, Sofi T, Campo S, Frisina N. Statins in nephrotic syndrome: A new weapon against tissue injury. *Medical Research Review* 25:587–609 2005
- **Buranakarl *et al.* , 2007**
 C. Buranakarl, K. Ankanaporn¹, S. Thammacharoen¹, M. Trisiriroj, T. Maleeratmongkol, P. Thongchai and S. Panasjaroen. Relationships Between Degree of Azotaemia and Blood Pressure, Urinary Protein:Creatinine Ratio and Fractional Excretion of Electrolytes in Dogs with Renal Azotaemia. *Veterinary Research Communications*, 31:245–257 2007
- **Cantaluppi *et al.* , 2012**
 Cantaluppi V, Quercia AD, Dellepiane S, Figliolini F, Medica D, De Lena M. New mechanisms and recent insights in the pathogenesis of acute kidney injury (AKI). *Giornale Italiano di Nefrologia*. 29(5):535-47 2012
- **Caldin *et al.* , 2009**
 Caldin M, Tasca S, Carli E, Bianchini S, Furlanello T, Martinez-Subiela S, Cerón JJ. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Veterinary Clinical Pathology* 38(1):63-8 2009
- **Chang *et al.* , 2012**
 Chang T.I., Li S., Chen S., Peralta C., Shlipak M.G., Fried L.F., Connel A.T.W., McCullough P.A., Tumura M.K.. Risk factors for ESRD in individuals with preserved estimated GFR with or without albuminuria: results from kidney early evaluation program (KEEP). *Am J Kidney Dis* 61(4) (suppl2), S4-S11, 2013
- **Cho *et al.* , 2013**
 Cho E, Yang HN, Jo SK, Cho WY, Kim HK. The role of urinary liver-type Fatty Acid-binding protein in critically ill patients. *Journal of Korean Medical Science*. 28(1):100-105 2013
- **Comper *et al.* , 2004**
 Comper W.D., Jerums G., Osicka T.M. Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography. *Clinical Biochemistry* 37; 105-111, 2004

- **Comper *et al.* , 2008**
Wayne D. Comper, Lucinda M. Hilliard, David J. Nikolic-Paterson, Leileata M. Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. 295:F1589-F1600 2008

- **Chew D *et al.* , 2011 ^a**
Dennis J. Chew, Stephen P. DiBartola, Patricia Schenck. *Disease Of The Glomerulus. Canine and Feline Nephrology and Urology*. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier), 218-239 2011

- **Chew D *et al.* , 2011 ^b**
Dennis J. Chew, Stephen P. DiBartola, Patricia Schenck. *Urinalysis. Canine and Feline Nephrology and Urology*. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 12 - 13 2011

- **Chew D *et al.* , 2011 ^c**
Dennis J. Chew, Stephen P. DiBartola, Patricia Schenck. *Clinical evaluation of the urinary tract. Canine and Feline Nephrology and Urology*. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 32 - 62 2011

- **Christensen *et al.* , 2009**
Erik Ilsø Christensen, Pierre J. Verroust, Rikke Nielsen. Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *European Journal of Physiology* 458:1039–1048 2009

- **Cortadellas *et al.* , 2008**
Cortadellas O, Fernández del Palacio MJ, Talavera J, Bayón A. Glomerular filtration rate in dogs with leishmaniasis and chronic kidney disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 22(2):293-300 2008

- **Clarkson *et al.* , 2011**
Christina E. Clarkson, Thomas F. Fletcher. in: Joe Bartges and David J. Polzin *Anatomy of the kidney and proximal ureter. Nephrology and Urology of Small Animals*. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 2011

- **Cravedi *et al.* , 2013**
Cravedi P., Remuzzi G. Pathophysiology of proteinuria and its value as an outcome measure in CKD. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 2013

- **D'Amico *et al.* , 2003**
D'Amico G., Bazzi C. Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, vol 63, 809-825; 2003

- **Danziger , 2008**
John Danziger . Importance of Low-Grade Albuminuria. Mayo Clinic Proceedings. 83(7):806-812 2008

- **Defontis *et al.* , 2013**
Defontis M., Bauer N., Failing K., Moritz A. Automated and visual analysis of commercial urinary dipsticks in dogs, cats and cattle. Research in Veterinary Science, 1-6; 2013

- **de Goeij MC *et al.* , 2012**
de Goeij MC, Liem M, de Jager DJ, Voormolen N, Sijpkens YW, Rotmans JI, Boeschoten EW, Dekker FW, Grootendorst DC, Halbesma N. Proteinuria as a Risk Marker for the Progression of Chronic Kidney Disease in Patients on Predialysis Care and the Role of Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor/Angiotensin II Receptor Blocker Treatment. Nephron Clinical Practice 121(1-2):c73-82 2012

- **Di Bartola , 2010**
Stephen Di Bartola. Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease In: Ettinger SJ, Feldman EC, Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 1955–1969 2010

- **Eckersall *et al.* , 2010**
P.D. Eckersall, R. Bell. Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. The Veterinary Journal 185 23–27 2010

- **Erkan , 2012**
Elif Erkan. Proteinuria and progression of glomerular diseases. Pediatric Nephrology. Novembre 2012

- **Falcò *et al.* , 2001**
Falcò P.C., Genaro L.A.T., Lloret S.M., Gomez F.B., Cabeza A.S., Legua C.M. Creatinine determination in urine samples by batchwise kinetic procedure and flow injection analysis using the Jaffè reaction: chemometric study. Talanta 55; 1079-1089; 2001

- **Finco *et al.* , 1995**
Finco DR. Kidney function. In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. San Diego, CA: Academic Press 441–484 1995

- **Fine DM *et al.* , 2009**
 Derek M. Fine, Martina Ziegenbein, Michelle Petri, Ernest C. Han, Alison M. McKinley, Jerry W. Chellini, Haikady N. Nagaraja, Kathryn A. Carson and Brad H. Rovin. A prospective study of protein excretion using short-interval timed urine collections in patients with lupus nephritis. *Kidney International* 76, 1284–1288 2009

- **Floege *et al.* , 2010**
 Jürgen Floege, John Feehally. Introduction to Glomerular Disease In: Jürgen Floege Richard J. Johnson, John Feehally *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 2010

- **Forcisi *et al.* , 2013**
 Forcisi S., Morits F., Kanawati b., Tziotis D., Lehmann R., Kopplin P. S. Liquid chromatography-mass spectrometry in metabolomics research:mass analyzer in ultra high pressure liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 51-65; 2013

- **Gary *et al.* , 2004**
 Anthony T. Gary, Leah A. Cohn, Marie E. Kerl, and Wayne A. Jensen. The Effects of Exercise on Urinary Albumin Excretion in Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 18:52–55 2004

- **Garner *et al.* , 2007**
 Bridget C. Garner, Charles E. Wiedmeyer. Comparison of a semiquantitative point-of-care assay for the detection of canine microalbuminuria with routine semiquantitative methods for proteinuria. *Veterinary Clinical Pathology* 36:240–244 2007

- **Gekle 2005**
 Gekle M. Renal tubule albumin transport. *Annu. Rev. Physiol.* 67:573-94; 2005

- **Gentilini F. *et al.* , 2005**
 Fabio Gentilini, Francesco Dondi, Cinzia Mastroilli, Massimo Giunti, Claudia Calzolari, Gualtiero Gandini, Danilo Mancini, Paolo Famigli Bergamini. Validation of a human immunoturbidimetric assay to measure canine albumin in urine and cerebrospinal fluid. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 17:179–183 2005

- **Ghazlat *et al.* , 2011**
 Ghazlat S.A., Langston C.E., Greco D.S., Reine N.J., May S.N., Shofer F.S. The prevalence of microalbuminuria and proteinuria in cats with diabetes mellitus. Elsevier Inc 2011

- **Giori *et al.* , 2011**
 Luca Giori, Flavia Marcella Tricomi, Andrea Zatelli, Xavier Roura, Saverio Paltrinieri. 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: 682 2011

- **Giraudel *et al.* , 2002**
 Giraudel J.M., Pagès J.P., Guelfi J.F. Monoclonal gammopathies in the dog: a retrospective study of 18 cases (1986-1999) and literature review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 38:135-147; 2002

- **Glassock, 2010**
 Glassock R.J. Is the presence of microalbuminuria a relevant marker of kidney disease? *Curr Hypertens Rep* 12:364-368 2010

- **Gorriz *et al.* , 2012**
 Jose Luis Gorriz, Alberto Martinez-Castelao. Proteinuria: detection and role in native renal disease progression. *Transplant Reviews*. 26(1):3-13 2012

- **Grauer *et al.* , 2002**
 Grauer GF, Oberhauser EB, Basaraba RJ, et al: Development of microalbuminuria in dogs with heartworm disease [abstract]. Research Abstract Program of the 20th Annual ACVIM Forum Dallas, TX, May 29-June 1, 2002 (pages 318–389) *Journal of Veterinary Internal Medicine* 16:352 2002

- **Grauer , 2007**
 Gregory F. Grauer. Measurement, Interpretation, and Implications of Proteinuria and Albuminuria. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 37:283–295 2007

- **Grauer , 2009**
 Grauer GF. Proteinuria: Implications for management. In: Bonagura JD, Twedt DC, ed. *Kirk’s Current Veterinary Therapy*. 14th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 860–863 2009

- **Grauer , 2011**
 Gregory F. Grauer. Proteinuria: Measurement and Interpretation. *Topics In Companion Animal Medicine* 26(3):121-7 2011

- **Gunasekara *et al.* , 2011**
 Gunasekara D., Byrnes L., Brown S., Beilby J., Kaye J. Clinical implications of the early detection of urinary microalbumin in diabetic patients using a new high performance liquid chromatography (HPLC) method. *Diabetes Research and Clinical Practice* 93, e61-e64; 2011

- **Hall *et al.* , 2011**
 Hall IE, Coca SG, Perazella MA, Eko UU, Luciano RL, Peter PR, Han WK, Parikh CR. Risk of poor outcomes with novel and traditional biomarkers at clinical AKI diagnosis. *Clinical Journal of American Society of Nephrology*. 6(12):2740-9 2011

- **Hammelgarn *et al.* , 2010**
 Hemmelgarn BR, Manns BJ, Lloyd A, James MT, Klarenbach S, Quinn RR, Wiebe N, Tonelli M; Alberta Kidney Disease Network. Relation between kidney function, proteinuria, and adverse outcomes. *Journal of the American Medical Association* 303:423-9 2010

- **Harley L. *et al.* , 2012**
 Leyenda Harley, Cathy Langston. Proteinuria in dogs and cats. *Canine Veterinary Journal* 53:631–638 2012

- **Hart , 2005**
 Hart SGE. Assessment of renal injury in vivo. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 52:30–45 2005

- **Hartmann *et al.* , 2008**
 Wehner, K. Hartmann, J. Hirschberger. Associations between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non-renal diseases. *Veterinary Record* 162, 141-147 2008

- **Hausmann *et al.* , 2012**
 Ralf Hausmann, Martin Grepl, Volker Knecht, and Marcus J. Moeller. The glomerular filtration barrier function: new concepts. *Current opinion in nephrology and hypertension*. 21(4):441-9 2012

- **Hellemons *et al.* , 2012**
 Hellemons M. E., Denig P., de Zeeuw D., Voorham J., Heerspink L. Is albuminuria screening and treatment in patients with type 2 diabetes in primary care? Observational data of the GIANTT cohort. *Nephrology Dial Transplant* 1-9; 2012

- **Jacob *et al.* , 2005**
 Jacob F., Polzin D.J., Osborne C.A., Neaton J.D., Kirk C.A., Allen T.A., Swanson L.L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of American Veterinary Medical Association* Feb 1, 226(3):393-400; 2005

- **Jefferson *et al.* , 2008**
 Jefferson J.A., Shankland S.J., Pichler R.H. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney International* 74; 22-36; 2008

- **Johnson *et al.* , 2012**
 Johnson D.W., Jones G.R.D., Mathew T.H., Ludlow M.J., Chadban S.J., Usherwood T., Polkinghorne K., Calagiuri S., Jerums G., MacIsaac R., Martin H. Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement. *MJA* 197 (4); 2012

- **Yu-Hsin *et al.* , 2010**
 Yu-Hsin Lien, Tsai-Yuan Hsiang, Hui-Pi Huang. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary- and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. *Lien et al. Acta Veterinaria Scandinavica* 52:61 2010

- **Jacob *et al.* , 2006**
 Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, Kirk CA, Allen TA, Swanson LL. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 226: 393-400 2005

- **Jefferson *et al.* , 2008**
 Jefferson JA, Shankland SJ, Pichler RH. Proteinuria in diabetic kidney disease: a mechanistic viewpoint. *Kidney International* 74(1):22-36 2008

- **Jepson R.E. *et al.* , 2010**
 Jepson R.E., Syme H. M., Markwell P., Miyazaki M., Yamashita T., Elliott J. Measurement of urinary cauxin in geriatric cats with variable plasma creatinine concentrations and proteinuria and evaluation of urine cauxin-to-creatinine concentration ratio as a predictor of developing azotemia. *American Journal of veterinary research*, 71 (8): 982-7, 2010

- **Johnson *et al.* , 2010**
 Richard J. Johnson, Jürgen Floege, John Feehally. Introduction to Glomerular Disease: Histologic Classification and Pathogenesis. In: Jürgen Floege Richard J. Johnson, John Feehally Comprehensive Clinical Nephrology. 4th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 2010

- **Johnson DW *et al.*, 2012**
 Johnson DW, Jones GR, Mathew TH, Ludlow MJ, Chadban SJ, Usherwood T, Polkinghorne K, Colagiuri S, Jerums G, Macisaac R, Martin H. Australasian Proteinuria Consensus Working Group. Chronic kidney disease and measurement of albuminuria or proteinuria: a position statement. Medical Journal of Australia 20;197(4):224-5 2012

- **Jong *et al.* , 2009**
 Jong P.E., Gansevoot R.T. Focus on microalbuminuria to improve cardiac and renal protection. Nephron Clinical Practice 111:c 204-2011, 2009

- **Kaneko *et al.* , 2005**
 Kaneko K., Someya T., Nishizaki N., Shimojima T., Ohtaki R., Kaneko K.I. Simplified quantification of urinary protein excretion using a novel dipstick in children. Pediatr Nephrol 20: 834-836; 2005

- **Karlsson *et al.* , 2012**
 Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Karlstam E, Wernersson S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reproduction in Domestic Animals* 47 Supplement 6:337-41 2012

- **Kerl, 2010**
 Kerl Marie E. Renal Tubular Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, Textbook of Veterinary Internal Medicine. 7th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier), 2062–2068 2010

- **Kerlin *et al.* , 2012**
 Kerlin BA, Ayoob R, Smoyer WE. Epidemiology and pathophysiology of nephrotic syndrome-associated thromboembolic disease. Clinical Journal of American Society of Nephrology 7(3):513-20 2012

- **Kim *et al.* , 2012**
 Kim SS, Song SH, Kim IJ, Jeon YK, Kim BH, Kwak IS, Lee EK, Kim YK. Urinary Cystatin C and Tubular Proteinuria Predict Progression of Diabetic Nephropathy. *Diabetes Care* ahead of print Ottobre 2012

- **Klosterman *et al.* , 2011^a**
 E.S. Klosterman, G.E. Moore, J.F. de Brito Galvao, S.P. DiBartola, R.P. Groman, J.C. Whittemore, S.L. Vaden, T.L. Harris, J.K. Byron, S.R. Dowling, D.C. Grant, G.F. Grauer, and B.M. Pressler. Comparison of Signalment, Clinicopathologic Findings, Histologic Diagnosis, and Prognosis in Dogs with Glomerular Disease with or without Nephrotic Syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:206–214 2011

- **Klosterman *et al.* , 2011^b**
 Emily S. Klosterman, Barrak M. Pressler. Nephrotic Syndrome in Dogs: Clinical Features and Evidence-Based Treatment Considerations. *Topics in companion animal medicine* 26(3):135-42 2011

- **Konta *et al.* ,Takahata Study , 2013**
 Tsuneo Konta, Kosuke Kudo, Hiroko Sato, Kazunobu Ichikawa, Ami Ikeda, Kazuko Suzuki, Atsushi Hirayama, Yoko Shibata, Tetsu Watanabe, Makoto Daimon, Takeo Kato, Yoshiyuki Ueno, Takamasa Kayama, Isao Kubota. Albuminuria is an independent predictor of all-cause and cardiovascular mortality in the Japanese population: the Takahata study. *Clinical and experimental nephrology*. Gennaio 2013

- **Kronenberg *et al.* , 2009**
 Kronenberg F. Emerging risk factors and markers of chronic kidney disease progression. *Nature Reviews Nephrology* 5:677–89 2009

- **Kuwahara *et al.* , 2008**
 Kuwahara Y, Nishii N, Takasu M, Ohba Y, Maeda S, Kitagawa H. Use of urine albumin/creatinine ratio for estimation of proteinuria in cats and dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(8):865-7 2008

- **Kumar *et al.* , 2012**
 Sanjeev Kumar, Ananda Chapagain, Dorothea Nitsch and Muhammad M Yaqoob. Proteinuria and hypoalbuminemia are risk factors for thromboembolic events in patients with idiopathic membranous nephropathy: an observational study. *BMC Nephrology* 13:107 2012

- **Lan *et al.* , 2013**
 Lan X., Rai P., Chandel N., Cheng K., Lederman R., Saleem M., Mathieson P.W., Husain M., Crosson J.T., Gupta K., Malhotra A., Singhal P. Morphine induces albuminuria by compromising podocyte integrity. *Plos One*, vol 8, issue 3; 2013

- **Lavey *et al.* , 2011**
 Levey AS, de Jong PE, Coresh J, El Nahas M, Astor BC, Matsushita K, et al. The definition, classification, and prognosis of chronic kidney disease: a KDIGO controversies conference report. *Kidney International*. 80:17–28 2011

- **Lavey *et al.* , 2012**
 Lavey A.S., Coresh J. Chronic kidney disease. *Lancet*; 379:165-180; 2012

- **Lee *et al.* , 2013**
 Lee D, Gleich K, Fraser SA, Katerelos M, Mount PF, Power DA. Limited capacity of proximal tubular proteolysis in mice with proteinuria. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*. Gennaio 2013

- **Lees *et al.* , 2002**
 Lees GE, Jensen WA, Simpson DF, Kashtan CE. Persistent albuminuria precedes onset of overt proteinuria in male dogs with X-linked hereditary nephropathy *Journal Of Veterinary Internal Medicine* 16:353 2002

- **Lees, 2004**
 Lees G.E. early diagnosis of renal disease and renal failure. *Veterinary Clinics Small Animal Practice* 34; 867-885; 2004

- **Lees *et al.* , 2005**
 Lees GE, Brown SA, Elloitt J, et al: Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM *Forum Consensus Statement* (Small Animal). *Journal Of Veterinary Internal Medicine* 19:377-385 2005

- **Lees , 2011**
 George E. Lees. Congenital kidney Diseases. in: Joe Bartges and David J.Polzin. *Nephrology and Urology of Small Animals*. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 568-575 2011

- **Lees e Bahr, 2011**
 George E. Lees e Anne Bahr. Renal Biopsy.in: Joe Bartges and David J.Polzin. Nephrology and Urology of Small Animals. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 209-214 2011
- **Lees et al. , 2011**
 George E. Lees, Rachel E. Cianciolo, Fred J. Clubb Jr.. Renal Biopsy and Pathologic Evaluation of Glomerular Disease. Topics in Companion Animal Medicine. 26(3):143-53 2011
- **Lien et al. , 2010**
 Yu-Hsin Lien, Tsai-Yuan Hsiang, Hui-Pi Huang. Associations among systemic blood pressure, microalbuminuria and albuminuria in dogs affected with pituitary- and adrenal-dependent hyperadrenocorticism. Acta Veterinaria Scandinavica 52:61 2010
- **Littman MP , 2011**
 Littman MP. Protein-losing Nephropaty in small animals. The Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice. 41(1):31-62 2011
- **Lyon SD et al. , 2010**
 Lyon SD, Sanderson MW, Vaden SL, et al: Comparison of dipstick, sulfosalicylic acid, urine protein creatinine ratio, and species-specific ELISA methodologies for detection of albumin in canine and feline urine samples. Journal of the American Veterinary Medical Association 236:874-879 2010
- **Luczak et al. , 2011**
 Luczak M, Formanowicz D, Pawliczak E, Wanic-Kossowska M, Wykretowicz A, Figlerowicz M. Chronic kidney disease-related atherosclerosis - proteomic studies of blood plasma. Proteome Science. 13;9:25 2011
- **Maddens et al. , 2011**
 B. Maddens, R. Heiene, P. Smets, M. Svensson, L. Aresu, J. van der Lugt, S. Daminet, and E. Meyer. Evaluation of Kidney Injury in Dogs with Pyometra Based on Proteinuria, Renal Histomorphology, and Urinary Biomarkers. Journal of Veterinary Internal Medicine. 25:1075–1083 2011
- **Mahmoodi et al. , 2008**
 Mahmoodi BK, ten Kate MK, Waanders F, et al: High absolute risks and predictors of venous and arterial thromboembolic events in patients with nephrotic syndrome: results from a large retrospective cohort study. Circulation 117:224-230 2008

- **Maisnar *et al.* , 2011**
 Maisnar V., Tichy M., Stulik J., Vavrova J., Friedecky B., Spirkova J., Zaloudkova L., Hernychova L., Spacilova J., Buchler T., hajek R. The problems of proteinuria measurement in urine with presence of Bence Jones protein. *Clinical Biochemistry* 44: 403-405; 2011

- **Malcom *et al.* , 2012**
 Malcolm P. McTaggart, Christopher P. Price, Roger G. Pinnock, Paul E. Stevens, Ronald G. Newall, Edmund J. Lamb. The Diagnostic Accuracy of a Urine Albumin-Creatinine Ratio Point-of-Care Test for Detection of Albuminuria in Primary Care. *American Journal of Kidney Disease*.60(5):787-794 2012

- **Mason *et al.* , 2010**
 Philip D. Mason, Peter F. Hoyer. Minimal Change Nephrotic Syndrome. . In: Jürgen Floege Richard J. Johnson, John Feehally *Comprehensive Clinical Nephrology*. 4th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 2010

- **Mastrorilli *et al.*, 2007**
 Cinzia Mastrorilli, Francesco Dondi, Chiara Agnoli, Maria Elena Turba, Enrico Vezzali, Fabio Gentilini. Clinicopathologic Features and Outcome Predictors of *Leptospira interrogans* Australis Serogroup Infection in Dogs: A Retrospective Study of 20 Cases (2001–2004). *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 21:3–10 2010

- **Matar *et al.* , 2012**
 Matar HE, Peterson P, Sangle S, D'Cruz DP. Correlation of 24-hour urinary protein quantification with spot urine protein:creatinine ratio in lupus nephritis. *Lupus* 21(8):836-9 2012

- **Mazzi *et al.* , 2008**
 Mazzi, F. Fracassi, F. Dondi, F. Gentilini, P. Famigli Bergamini. Ratio of urinary protein to creatinine and albumin to creatinine in dogs with diabetes mellitus and hyperadrenocorticism. *Veterinary Reserch Communications* 32 (Suppl 1):S299–S301 2008

- **McTaggart *et al.* , 2012**
 Malcolm P. McTaggart, Christopher P. Price, Roger G. Pinnock, Paul E. Stevens, Ronald G. Newall, Edmund J. Lamb. The Diagnostic Accuracy of a Urine Albumin-Creatinine Ratio Point-of-Care Test for Detection of Albuminuria in Primary Care. *American Journal of Kidney Diseases*. 60(5):787-794 2012

- **Meda *et al.* , 2013**
 Meda E. Pavkov, William C. Knowler, MD, Robert L. Hanson, Desmond E. Williams, Kevin V. Lemley, Bryan D. Myers, Robert G. Nelson. Comparison of Serum Cystatin C, Serum Creatinine, Measured GFR, and Estimated GFR to Assess the Risk of Kidney Failure in American Indians With Diabetic Nephropathy. *American Journal of Kidney Diseases*. ahead of Print 2013

- **Menon *et al.* , 2012**
 Menon M.C., Chuang P.Y., He C.J. The glomerular filtration barrier: components and crosstalk. *International Journal of Nephrology*, 2012

- **Miller *et al.* , 2009**
 Miller W.G., Bruns D.E., Hortin G.L., Aakre K.M., McQueen M.J., Itoh Y., Lieske J.C., Soccombe D., Jones G., Bunk D.M., Curham G.C., Narva A.S. Current issue measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clinical Chemistry* 55:1; 24-38, 2009

- **Miyazaki *et al.* , 2011**
 Miyazaki M., Fujiwara K., Suzuta Y., Wakamatsu N., Taira H., Suzuki A., Yamashita T. Screening for proteinuria in cats using a conventional dipstick test after removal of cauxin from urine with a *Lens culinaris* agglutinin lectin tip. *The Veterinary Journal* 189; 312-317, 2011

- **Montero N. *et al.* , 2012**
 Nuria Montero, M. José Soler, M. José Pascual, Clara Barrios, Eva Márquez, Eva Rodríguez, Ali Berrada, Marta Riera, Lluís Coca, M. Antonia Orfila, Julio Pascual. Correlation between the protein/creatinine ratio in spot urine and 24-hour urine protein. *Revista Nefrología* 32(4):494-501 2012

- **Monti *et al.* , 2012**
 P. Monti, G. Benckroun, D. Berlato, J. Archer. Initial evaluation of canine urinary cystatin C as a marker of renal tubular function. *Journal of Small Animal Practice* 53, 254–259 2012

- **Murgier *et al.* , 2009**
 Murgier P, Jakins A, Bexfield N, Archer J. Comparison of semiquantitative test strips, urine protein electrophoresis, and an immunoturbidimetric assay for measuring microalbuminuria in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 38(4):485-92 2009

- **Nabity *et al.* , 2007**
 Nabity MB, Boggess MM, Kashten CE, Lees GE. Day-to-day variation of the urine protein:creatinine ratio in female dogs with stable glomerular proteinuria caused by X-linked hereditary nephropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21:425-430 2007

- **Nabity, 2011**
 Nabity Mary B. Urine Protein and Microalbuminuria. in: Joe Bartges and David J.Polzin. *Nephrology and Urology of Small Animals*. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 58-61 2011

- **Nabity *et al.* , 2011**
 Mary B. Nabity, George E. Lees, Lawrence J. Dangott, Rachel Cianciolo, Jan S. Suchodolski, Jorg M. Steiner. Proteomic analysis of urine from male dogs during early stages of tubulointerstitial injury in a canine model of progressive glomerular disease. *Veterinary Clinical Pathology*. 40/2 222–236 2011

- **Nabity *et al.* , 2012**
 M.B. Nabity, G.E. Lees, R. Cianciolo, M.M. Boggess, J.M. Steiner, and J.S. Suchodolski. Urinary Biomarkers of Renal Disease in Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 26:282–293 2012

- **Nagrebetsky A. *et al.* , 2012**
 Nagrebetsky A, Jin J, Stevens R, James T, Adler A, Park P, Craven A, Shine B, Farmer A. Diagnostic accuracy of urine dipstick testing in screening for microalbuminuria in type 2 diabetes: a cohort study in primary care. *Family Practice*. Settembre 2012

- **Newman *et al.* , 2005**
 Newman D.J., Mattock M.B., Dawnay A.B.S. , Kerry S., McGuire A., Yaqoob M., Hitman G.A., Hawke C. Systematic review on urine albumin testing for early detection of diabetic complications. *Health Technology Assessment* Vol 9:No 30; 2005

- **Owen *et al.*, 2005**
 Owen W.E., Roberts W.L. performance characteristics of an HPLC assay for urinary albumin. *America Society of clinical pathology*. 124:219-225; 2005

- **Peixoto *et al.* , 2013**
 Aldo J. Peixoto, Marcelo Orias, Gary V. Desir. Does Kidney Disease Cause Hypertension?. *Current Hypertension Reports*. Gennaio 2013

- **Peres *et al.* , 2013**
 Peres GB, Juliano MA, Simões MJ, Michelacci YM. Lysosomal enzymes are decreased in the kidney of diabetic rats. *Biochimical and Biophysical Acta* 1832(1):85-95 2013

- **Polkinghorne, 2006**
 Polkinghorne K.R. Detection and measurement of urinary protein. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension*, 15:625-630, 2006

- **Polzin *et al.* , 2010**
 Polzin DJ, Osbornes CA, Ross S. Chronic kidney disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC eds. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier), 1990-202 2010

- **Polzin , 2011**
 David J. Polzin. Chronic Kidney Disease. in: Joe Bartges and David J.Polzin *Nephrology and Urology of Small Animals*. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 433-471 2011

- **Pressler *et al.* , 2003**
 Pressler BM, Proulx DA, Williams LE, et al: Urine albumin concentration is increased in dogs with lymphoma or osteosarcoma[abstract]. *Research Abstract Program of the 21st Annual ACVIM Forum* Charlotte, NC, June 4–7, 2003 (pages 369–460) *Journal of Veterinary Internal Medicine* 17:404 2003

- **Pressler B. , 2011**
 Barrak Pressler. Nephrotic Syndrome. in: Joe Bartges and David J.Polzin *Nephrology and Urology of Small Animals*. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 2011

- **Price *et al.* , 2005**
 Price C.P., Newall R.G., Boyd J.C. Use of protein:creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria: a systematic review. *Clinical Chemistry* 51:9; 1577-1586; 2005

- **Radoi, 2012**
 Zaher A. Radoi. Comparative Physiological, Developmental, and Anatomical Aspects. in: Zaher A. Radoi *Comparative Pathophysiology and Toxicology of Cyclooxygenases*. ed. 1 John Wiley & Sons Inc 2012

- **Raghu *et al.* , 2004**
 Raghu P, Sivakumar B. Interactions amongst plasma retinol-binding protein, transthyretin and their ligands: implications in vitamin A homeostasis and transthyretin amyloidosis. *Biochimica et Biophysica Acta* 1;1703(1):1-9 2004

- **Raila *et al.* , 2003**
 Raila J, Forterre S, Kohn B, Brunberg L, Schweigert FJ. Effects of chronic renal disease on the transport of vitamin A in plasma and urine of dogs. *American Journal of Veterinary Research* 64(7):874-9 2003

- **Raila *et al.* , 2005**
 Raila J, Willnow TE, Schweigert FJ. Megalin-mediated reuptake of retinol in the kidneys of mice is essential for vitamin A homeostasis. *Journal of Nutrition* 135(11):2512-6 2005

- **Raila *et al.* , 2010**
 Jens Raila, Leo Brunberg, Florian J. Schweigert, Barbara Kohn. Influence of kidney function on urinary excretion of albumin and retinol-binding protein in dogs with naturally occurring renal disease. *American Journal of Veterinary Research* 71:1387–1394 2010

- **Raila *et al.* , 2011**
 Jens Raila, Florian J. Schweigert, Barbara Kohn. C-reactive protein concentrations in serum of dogs with naturally occurring renal disease. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 23(4) 710– 715 2011

- **Rossi *et al.* , 2012**
 Rossi G., Giori L., Campagnola S., Zatelli A., Zini E., Paltrinieri S. Evaluation of factors affect analytic variabilità of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. *American Journal of veterinari research* Vol73; No6; 2012

- **Ruggenti *et al.* , 2006**
 P Ruggenti, G Remuzzi. Time to abandon microalbuminuria?. *Kidney International*. 70, 1214–1222 2006

- **Ruggenenti *et al.* , 2012**
Ruggenenti P, Cravedi P, Remuzzi G. Mechanisms and treatment of CKD. *Journal of the American Society of Nephrology*. 23(12):1917-28 2012

- **Sacks *et al.* , 2011**
Sacks DB, Arnold M, Bakris GL, et al. Executive summary: guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. *Clinical Chemistry*. 57(6):793-798 2011

- **Samal L. *et al.* , 2013**
Samal L, Linder JA. The primary care perspective on routine urine dipstick screening to identify patients with albuminuria. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology* 8(1):131-5 2013

- **Saraheimo *et al.* , 2008**
Saraheimo M, Forsblom C, Thorn L, et al. Serum adiponectin and progression of diabetic nephropathy in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 31(6):1165–9 2008

- **Segev G , 2010**
Gilad Segev. Proteinuria. In: Ettinger SJ, Feldman EC, ed. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 7th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier), 168-171 2010

- **Segev *et al.* , 2012**
G. Segev, L. D. Cowgill, S. Jessen, A. Berkowitz, C.F. Mohr, and I. Aroch. Renal Amyloidosis in Dogs: A Retrospective Study of 91 Cases with Comparison of the Disease between Shar-Pei and Non-Shar-Pei Dogs. *Journal Of Veterinary Internal Medicine* 26:259–268 2012

- **Schaefer *et al.* , 2011**
Schaefer H, Kohn B, Schweigert FJ, Raila J. Quantitative and qualitative urine protein excretion in dogs with severe inflammatory response syndrome. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25(6):1292-7 2011

- **Schaefer B *et al.* , 2012**
Betti Schaefer, Elke Wühl. Educational Paper: Progression in chronic kidney disease and prevention strategies. *European Journal of Pediatrics*. 171:1579–1588 2012

- **Schiffrin *et al.* , 2007**
 Schiffrin EL, Lipman ML, Mann JF. Chronic kidney disease: effects on the cardiovascular system. *Circulation* 3;116(1):85-97 2007
- **Schultz *et al.* , 2000**
 Schultz C.J., Dalton R.N., Neil H.A.W., Dunger D.B. Freezing method affects the concentration and variability of urine proteins and the interpretation of data on microalbuminuria. *British Diabetic Association*, 17, 7-14; 2000
- **Schultze *et al.* , 1998**
 Schultze A.E., Jensen R.K. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis of canine urinary proteins for the analysis and differentiation of tubular and glomerular disease. *Vet Clin Pathol*, 18(4): 93-7; 1998
- **Seegmiller *et al.* , 2009**
 Seegmiller J.C., Barnidge D.R., Burns B.E., Larson T.S., Lieske J.C., Kumar R. Quantification of urinary albumin by using protein cleavage and LC-MS/MS. *Clinical Chemistry* 55:6, 1100-1107; 2009
- **Seegmiller *et al.* , 2009**
 Seegmiller Jesse C, Sviridov D., Larson T.S., Borland T.M., Hortin G.L., Lieske J.C. Comparison of urinary albumin quantification by immunoturbidimetry, competitive immunoassay, and protein-cleavage liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry* 55:11; 1991-1994, 2009
- **Shlipak *et al.* , 2005**
 Shlipak MG, Fried LF, Cushman M, et al. Cardiovascular mortality risk in chronic kidney disease: Comparison of traditional and novel risk factors. *Journal of American Medical Association* 293:1737–1745 2005
- **Simons *et al.* , 2008**
 M. Simons, T.B. Huber. It's not all about nephrin. *Kidney International* 73:671–673 2008
- **Singh *et al.* , 2011**
 Singh A., Satchell S.C. Microalbuminuria: causes and implications. *Pediatric Nephrology* 26:1957-1965; 2011

- **Sjaastad *et al.* , 2010**
 Sjaastad, Sand, Hove. The Kidney and the Urinary Tract. In: Sjaastad, Sand, Hove. Physiology of Domestic Animal. ed.2 Scandinavian Veterinary Press. Oslo 466-516 2010
- **Skalova , 2005**
 Skalova S. The diagnostic role of urinary N-acetyl-beta-Dglucosaminidase (NAG) activity in the detection of renal tubular impairment. Acta Medica (Hradec Kralove) 48:75–80 2005
- **Smets *et al.* , 2010**
 Smets P, Meyer E, Maddens B, Daminet S. Cushing's syndrome, glucocorticoids and the kidney. General and Comparative Endocrinology. 169(1):1-10 2010
- **Smink *et al.* , PREVEND Study, 2012**
 Paul A. Smink, Hiddo J. Lambers Heerspink, PharmD, Ron T. Gansevoort, Paul E. de Jong, Hans L. Hillege, Stephan J.L. Bakker, and Dick de Zeeuw. Albuminuria, Estimated GFR, Traditional Risk Factors, and Incident Cardiovascular Disease: The PREVEND (Prevention of Renal and Vascular Endstage Disease) Study. American Journal of Kidney Diseases. 60(5):804-811 2012
- **Stellwagen 2009**
 Stellwagen N.C. Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. Electrophoresis, 30, S188-S195; 2009
- **Stevens *et al.* , 2010**
 Lesley A. Stevens, Shani Shastri, Andrew S. Levey. Assessment of Renal Function. In: Jürgen Floege, Richard J. Johnson, John Feehally Comprehensive Clinical Nephrology. 4th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier) 31-38 2010
- **Stockham e Scott, 2008**
 Steven L. Stockham e Michael A. Scott. Urinary System In: Stockham, Scott Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology ed. 2. Blackwell Pub Professional 2008
- **Storm T *et al.* , 2012**
 Tina Storm, Lisbeth Tranebjærg, Carina Frykholm, Henrik Birn, Pierre J. Verroust, Tryggve Nevéus, Birgitta Sundelin, Jens Michael Hertz, Gerd Holmström, Katharina Ericson, Erik I. Christensen and Rikke Nielsen. Renal phenotypic investigations of megalin-deficient patients': novel insights into tubular proteinuria and albumin filtration. Nephrology Dialysis Transplantation. 0: 1–7 2012

- **Suhail *et al.* , 2011**
 Suhail S.M., Woo K.T., Tan H.K., Wong K.S. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of urinary protein in acute kidney injury. Saudi Journal Kidney Disease Transplantation 22(4): 739-745; 2011

- **Surman *et al.* , 2012**
 S. Surman, C.G. Couto, S.P. DiBartola, and D.J. Chew. Arterial Blood Pressure, Proteinuria, and Renal Histopathology in Clinically Healthy Retired Racing Greyhounds. Journal of Veterinary Internal Medicine 6:1320–1329 2012

- **Syme *et al.* , 2006**
 Syme HM, Markwell PJ, Pfeiffer D, Elliott J. Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria. Journal of Veterinary Internal Medicine 20: 528-535 2006

- **Syme *et al.* , 2011**
 Hattie Syme and Jonathon Elliot. Proteinuria and microalbuminuria. in: Joe Bartges and David J.Polzin Nephrology and Urology of Small Animals. ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 2011

- **Smets *et al.* , 2011**
 P.M.Y. Smets, E. Meyer, B.E.J. Maddens, L. Duchateau, and S. Daminet. Urinary Markers in Healthy Young and Aged Dogs and Dogs with Chronic Kidney Disease. Journal of Veterinary Internal Medicine 24:65–72 2010

- **Thorevska N. et al. , 2003**
 Thorevska N., Sabahi R., Upadya A., Manthous C., Adjepong Y. A. Microalbuminuria in critically ill medical patients: prevalence, predictors, and prognostic significance. Critical Care Medicine Vol 31, No.4, 1075-1081, 2003

- **Tojo *et al.* , 2008**
 Tojo A, Onozato ML, Kitiyakara C, Kinugasa S, Fukuda S, Sakai T, Fujita T. Glomerular albumin filtration through podocyte cell body in puromycin aminonucleoside nephrotic rat. Medical Molecular Morphology 41(2): 92–98 2008

- **Tojo *et al.* , 2012**
 Akihiro Tojo and Satoshi Kinugasa. Mechanisms of Glomerular Albumin Filtration and Tubular Reabsorption. International Journal of Nephrology 2012

- **Tryggvason *et al.* , 2001**

Karl Tryggvason, Jorma Wartiovaara. Molecular basis of glomerular permselectivity. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 10:543-549 2001

▪ **Tvarijonavičiute *et al.* , 2013**

Tvarijonavičiute A, Ceron JJ, Holden SL, Biourge V, Morris PJ, German AJ. Effect of weight loss in obese dogs on indicators of renal function or disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine.* 27(1):31-8 2013

▪ **Tyan *et al.* , 2011**

Tyan Y.C., Yang M.H., Chen S.C., Jong S.B., Chen W.C., Yang Y.H., Chung T.W., Liao P.C. Urinary protein profiling by liquid chromatography/tandem mass spectrometry: ADAM28 is overexpressed in bladder transitional cell carcinoma. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 25, 2851-2862; 2011

▪ **Umbreit *et al.* , 2000**

Umbreit A., Wiedemann G. Determination of urinary protein fractions a comparison with different electrophoretic methods and quantitatively determined protein concentrations. *Clinica Chimica Acta.* 297, 163-172, 2000

▪ **Vaden *et al.* , 2001**

Vaden SL, Jensen WA, Longhofer SL, Simpson DF: Longitudinal study of microalbuminuria in soft-coated wheaten terriers [abstract]. Research Abstract Program of the 21st Annual ACVIM Forum Charlotte, NC, June 4–7, 2003 (pag.369–460) *Journal of Veterinary Internal Medicine* 15:300 2001

▪ **Vaden SL *et al.* , 2004**

Shelly L. Vaden, Barrak M. Pressler, Michael R. Lappin, Wayne A. Jensen. Effects of urinary tract inflammation and sample blood contamination on urine albumin and total protein concentrations in canine urine samples. *Veterinary Clinical Pathology.* 33:14-19 2004

▪ **Vaden SL, 2010**

Vaden SL. Glomerular Disease. In: Ettinger SJ, Feldman EC, *Textbook of Veterinary Internal Medicine.* 7th ed. St. Louis, Missouri: Saunders (Elsevier), 2021–2035 2010

▪ **Vaden *et al.* , 2011**

Shelly L. Vaden and Gregory F. Grauer. Glomerular Disease. in: Joe Bartges and David J. Polzin. *Nephrology and Urology of Small Animals.* ed. Oxford, United Kingdom: Wiley-Blackwell 538-546 2011

- **van der Velde *et al.* , 2011**
 van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey A, de Jong P, Gansevoort RT; Chronic Kidney Disease Prognosis Consortium, van der Velde M, Matsushita K, Coresh J, Astor BC, Woodward M, Levey AS, de Jong PE, Gansevoort RT, Levey A, El-Nahas M, Eckardt KU, Kasiske BL, Ninomiya T, Chalmers J, Macmahon S, Tonelli M, Hemmelgarn B, Sacks F, Curhan G, Collins AJ, Li S, Chen SC, Hawaii Cohort KP, Lee BJ, Ishani A, Neaton J, Svendsen K, Mann JF, Yusuf S, Teo KK, Gao P, Nelson RG, Knowler WC, Bilo HJ, Joosten H, Kleefstra N, Groenier KH, Auguste P, Veldhuis K, Wang Y, Camarata L, Thomas B, Manley T. Lower estimated glomerular filtration rate and higher albuminuria are associated with all-cause and cardiovascular mortality. A collaborative meta-analysis of high-risk population cohorts. *Kidney International* 79:1341–52 2011

- **Verma *et al.* , 2012**
 Vipin Verma, Ravi Kant, Naseem Sunnoqrot, Steven R. Gambert. Proteinuria in the elderly: evaluation and management. *International Urology and Nephrology*. 44(6):1745-51 2012

- **Wehener *et al.* , 2008**
 Wehner A., Hartmann K., Hirschberger J. Association between proteinuria, systemic hypertension and glomerular filtration rate in dogs with renal and non.renal disease. *Veterinary Record*, 2, 2008

- **Wei *et al.* , 2012**
 Wei CC, Yu IW, Lin HW, Tsai AC. Occurrence of infection among children with nephrotic syndrome during hospitalizations. *Nephrology*. 17(8):681–688 2012

- **Welles *et al.* , 2006**
 Welles E.G., Whatley E.M., Hall A.S., Wright J.C. Comparison of multistix PRO dipsticks with other biochemical assays for determining urine protein(UP), urine creatinine (UC), and UP:UC ratio in dogs and cats. *Veterinary Clinical Pathology* 35; 1; 31-36, 2006

- **Wheeler *et al.* , 2013**
 Wheeler DC, Becker GJ. Summary of KDIGO guideline. What do we really know about management of blood pressure in patients with chronic kidney disease?. *Kidney International* Gennaio 2013

- **Whittemore *et al.* , 2006**

Whittemore J.C., Gill V.L., Jensen W.A., Radecki S.V., Lappin M.R. Evaluation of the association between microalbuminuria and the urine albumin-creatinine ratio and systemic disease in dogs. *JAVMA* Vol 229, No6, September 15, 2006

▪ **Whittemore *et al.* , 2007**

Whittemore JC, Miyoshi Z, Jensen WA, et al: Association of microalbuminuria and the urine albumin-to-creatinine ratio with systemic disease in cats. *Journal of American Veterinary Association* 230:1165-1169 2007

▪ **Whittemore *et al.* , 2011**

J.C. Whittemore, B.A. Marcum, D.I. Mawby, M.V. Coleman, T.B. Hacket, and M.R. Lappin. Associations among Albuminuria, C-Reactive Protein Concentrations, Survival Predictor Index Scores, and Survival in 78 Critically Ill Dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 25:818–824 2011

▪ **Willard *et al.* , 2004**

Willard HD, Tvedten H. Urinary disorders. In: Barsanti JA, Lees GE, Willard HD, *et al.* . *Small animal clinical diagnosis by laboratory methods*. 4th ed. St Louis: Saunders, 140–15 2004

▪ **Xin *et al.* ,2004**

Xin G., Wang M., Jiao L., Xu G., Wang H. Protein to creatinine ratio in spot urine samples as a predictor of quantitation of proteinuria. *Clinica Chimica Acta*. 350, 35-39; 2004

▪ **Zamora *et al.* , 2009**

R Zamora, LX Cubeddu. Microalbuminuria: do we need a new threshold?. *Journal of Human Hypertension*. 23:146–149 2009

▪ **Zatelli A. *et al.* , 2010**

Andrea Zatelli, Saverio Paltrinieri, Francesca Nizi, Xavier Roura, Eric Zini. Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. *American Journal of Veterinary Research*. 71:235–240 2010

▪ **Zhang *et al.* , 2012**

Zhang J., Pippin J.W. ,Vaughan M.R., Krofft R.D., Taniguchi Y., Romagnani P, Nelson P.J., Liu Z.-H., Shankland S.J. Retinoids Augment the Expression of Podocyte Proteins by Glomerular Parietal Epithelial Cells in Experimental Glomerular Disease. *Nephron Experimental Nephrology* 121:e23–e37 2012

- **Zhang X. *et al.* , 2013**
Zhang X., Gibson B. J., Mori R., Snow-Lisy D., Yamaguchi Y., Campbell S. C., Simmons M.N., Daly T.M. Analytical and biological validation of a multiplex immunoassay for acute kidney injury biomarkers. *Clinical Acta.* 16; 415:88-93; 2013

- **Zini *et al.* , 2004**
Zini E., Bonfanti U., Zatelli A. Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evacuate by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. *Am J Vet Res.* 65(7); 964-71; 2004

- **Zoja *et al.* , 2006**
Zoja C., Abbate M., Remuzzi G. Progression of chronic kidney disease: insights from animal models. *Current Opinion in Nephrology and Hypertension* 15:250-257; 2006