

*Alma Mater Studiorum – Università di Bologna*

**DOTTORATO DI RICERCA**

Scienze Cliniche Veterinarie

Ciclo XXV

**Settore Concorsuale di afferenza:** Area 07 Scienze Agrarie e Veterinarie  
**Settore Scientifico disciplinare:** 07/H4 Clinica Medica e Farmacologia Veterinaria

**VALUTAZIONE DI MARKER DIAGNOSTICI,  
EPIDEMIOLOGIA E NUOVE PROSPETTIVE  
TERAPEUTICHE NELL'AVVELENAMENTO  
DA RODENTICIDI ANTICOAGULANTI  
NEL CANE**

Presentata da: **Dott.ssa Mara Senzolo**

Coordinatore Dottorato  
**Chiar.mo**  
**Prof. Carlo Tamanini**

Relatore  
**Prof. Fabio Gentilini**

Correlatore  
**Dott. Marco Caldin**

Esame finale anno 2014

# INDICE

INTRODUZIONE GENERALE.....	3
----------------------------	---

## PARTE PRIMA- RODENTICIDI ANTICOAGULANTI ED EPIDEMIOLOGIA

### CAPITOLO 1 – I RODENTICIDI ANTICOAGULANTI

1.1 Cenni storici.....	4
1.2 Warfarin.....	5
1.3 Classificazione.....	6
1.4 Modalità di intossicazione.....	6
1.5 Meccanismo d'azione.....	7
1.6 Segni clinici.....	9
1.7 Diagnosi.....	9
1.8 Terapia.....	10

### CAPITOLO 2 – VALUTAZIONE EPIDEMIOLOGICA DELL'INGESTIONE DI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI NEL CANE

2.1 Introduzione e Obiettivi dello studio.....	11
2.2 Materiali e metodi.....	12
2.2.1 Database.....	12
2.2.2 Raccolta campioni.....	13
2.2.3 Strumentazione e Metodica.....	13
2.2.4 Statistica.....	15
2.3 Risultati.....	16
2.4 Discussioni.....	25

## PARTE SECONDA – LE PROTEINE DI FASE ACUTA NEI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI

### CAPITOLO 3 – LE PROTEINE DI FASE ACUTA

3.1 La risposta di fase acuta.....	28
3.2 Classificazione e descrizione delle proteine di fase acuta (APPs).....	30

### CAPITOLO 4 – VALUTAZIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA IN CANI AVVELENATI DA RODENTICIDI ANTICOAGULANTI STUDIO

4.1 Introduzione e Obiettivi dello studio.....	41
4.2 Materiali e metodi.....	42
4.2.1 Database.....	42
4.2.2 Raccolta campioni.....	43
4.2.3 Strumentazione e Metodica.....	44
4.2.4 Statistica.....	46
4.3 Risultati.....	47
4.4 Discussioni.....	58

## **PARTE TERZA- BIOMARKER COAGULATIVI E TERAPIA NEI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI**

### **CAPITOLO 5 – PROCESSO EMOSTATICO E BIOMARKER COAGULATIVI**

5.1 Processo emostatico.....	60
5.2 Biomarker coagulativi.....	65

### **CAPITOLO 6 – LA VITAMINA K COME ANTIDOTO**

6.1 La Vitamina K: storia e classificazione.....	76
6.2 Funzione biologica.....	77
6.3 Uso terapeutico nel cane e nell'uomo.....	77
6.4 Vie di somministrazione.....	78
6.5 Dosaggio.....	79
6.6 Formulazioni in commercio.....	80

### **CAPITOLO 7 – VALUTAZIONE DEI TEMPI DELLA COAGULAZIONE (PT ed aPTT) DOPO SOMMINISTRAZIONE DI VITAMINA K PER VIA ENDOVENOSA**

7.1 Introduzione e Obiettivi dello studio.....	82
7.2 Materiali e metodi.....	83
7.2.1 Database.....	83
7.2.2 Raccolta campioni.....	83
7.2.3 Somministrazione di Vitamina K.....	84
7.2.4 Prelievi ematici seriali e monitoraggio.....	85
7.2.5 Strumentazione e Metodica.....	85
7.2.6 Statistica.....	88
7.3 Risultati.....	88
7.4 Discussioni.....	93

<b>CONCLUSIONI.....</b>	<b>95</b>
-------------------------	-----------

<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>97</b>
--------------------------	-----------

## INTRODUZIONE GENERALE

In Medicina Veterinaria l'avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti è conosciuto e studiato ormai da anni, essendo una delle intossicazioni più comunemente riscontrate nelle specie non target (Berny et al., 2010). In letteratura si rinvengono numerose pubblicazioni a riguardo in ambito tossicologico, istopatologico e clinico. Gli studi in ambito clinico hanno fornito utili informazioni sulla sintomatologia e sulla gestione dei pazienti (Sheafor & Couto, 1999; Pachtinger et al., 2008) ma alcuni aspetti sono rimasti ancora inesplorati.

Questo studio si propone di valutare il processo infiammatorio, mediante le proteine di fase acuta (APP's), in corso di fenomeni emorragici, prendendo come modello reale un gruppo di soggetti accidentalmente avvelenati da rodenticidi anticoagulanti. Di questo affascinante e complesso rapporto che lega infiammazione e coagulazione esistono esigue tracce in Medicina Veterinaria. Un'altra finalità, di non inferiore importanza, è quella di definire una linea guida terapeutica con l'ausilio di biomarker coagulativi (PT ed aPTT) e di valutare la sicurezza della vitamina K per via endovenosa. Infine si è valutata l'epidemiologia nella specie oggetto di studio dell'ingestione dei composti anticoagulanti e la loro determinazione mediante cromatografia liquida abbinata a spettrofotometria di massa (UPLC-MS/MS).

Il lavoro di ricerca è stato condotto in parte retrospettivamente ed in parte prospettivamente.

# **PARTE PRIMA – I RODENTICIDI ANTICOAGULANTI ED EPIDEMIOLOGIA**

Nei seguenti capitoli verranno descritti e classificati i composti responsabili dell'effetto tossico anticoagulante ed oggetto di studio sarà la valutazione epidemiologica nella specie canina dell'ingestione di tali prodotti e la loro determinazione mediante UPLC-MS/MS.

## **CAPITOLO 1 – RODENTICIDI ANTICOAGULANTI**

### **1.1 Cenni storici**

La scoperta della tossicità iniziò a seguito di una sindrome emorragica che colpì numerosi capi di bestiame negli anni trenta nelle campagne del Wisconsin a seguito dell'ingestione di trifoglio insilato.

Venne quindi identificato il bis-hydroxycoumarin (dicumarolo) a base di cumarina. Queste ricerche vennero svolte dalla *Wisconsin Alumni Research Foundation*, che nel 1952 ottenne la licenza. Il nome del primo anticoagulante, il Warfarin, per l'appunto prende il nome da questa fondazione. In aggiunta il suffisso “*arin*” che indica la sostanza come appartenente alla famiglia delle cumarine. Questo composto ebbe la sua notorietà terapeutica nel 1953 quando venne utilizzato con successo per trattare una trombosi coronarica al futuro presidente degli Stati Uniti d'America Dwight Eisenhower e di conseguenza ne stipulò anche la fortuna commerciale sia come farmaco ad uso umano che come topicida.

## 1.2 Warfarin

Negli ultimi settantanni è stato usato per prevenire eventi tromboembolici associati a molte malattie umane come la fibrillazione atriale, patologie valvolari cardiache e trombosi venose profonde (Hirsh et al, 2001). In particolare l'obiettivo della terapia è di somministrare una dose adeguata per evitare la formazione di coaguli senza complicazioni emorragiche nel paziente. Lo steady-state plasmatico dev'essere mantenuto all'interno di un range monitorato tramite l'INR (international normalised ratio) i cui valori danno indicazioni cliniche specifiche (Oden & Fahlen, 2002). Il warfarin è metabolizzato dai citocromi CYP2C9 e CYP3A4 e perciò è soggetto ad interazioni che inibiscono e inducono queste isoforme del CYP450, portando quindi o ad una eccessiva o ad una subottimale anticoagulazione (Hoolbrook et al., 2005). Il grave rischio è che si possa sviluppare una tossicità acuta in seguito alla somministrazione concomitante ed interferenza di altri farmaci ad uso comune come l'amoxicillina-acido clavulanico (Larsen et al., 2014). Dato che questo equilibrio terapeutico non è facile da raggiungere, e poichè sono stati scoperti polimorfismi genetici dell'enzima target VKORC1 (Vitamin K epoxide reductase complex subunit1) responsabili della variabilità di circa 30% del dosaggio del farmaco in questi soggetti (Marinova et al., 2013), la ricerca in Medicina Umana sta studiando nuovi farmaci anticoagulanti.

Per quanto riguarda il suo utilizzo come prodotto topicida, occorre precisare che il Warfarin è stato sostituito da altre molecole a causa della crescente resistenza nella popolazione di ratti (*Rattus Norvegicus*) (Buckle, 2013, Esther et al. 2014).

### **1.3 Classificazione**

I rodenticidi anticoagulanti, largamente utilizzati per il controllo dei roditori sinantropici, vengono divisi in due gruppi principali in base alla loro struttura chimica (Litovitz et al., 1998): idrossicumarinici e derivati dell'indadione (clorofacinone, difacinone, pindone, valone). Gli idrossicumarinici vengono definiti di:

- Prima generazione: Warfarin, Coumatetralyl, Coumacloro, Coumafuryl;
- Seconda generazione: Brodifacoum, Bromadiolone, Difenacoum, Difetialone, Flocoumafen.

### **1.4 Modalità di intossicazione**

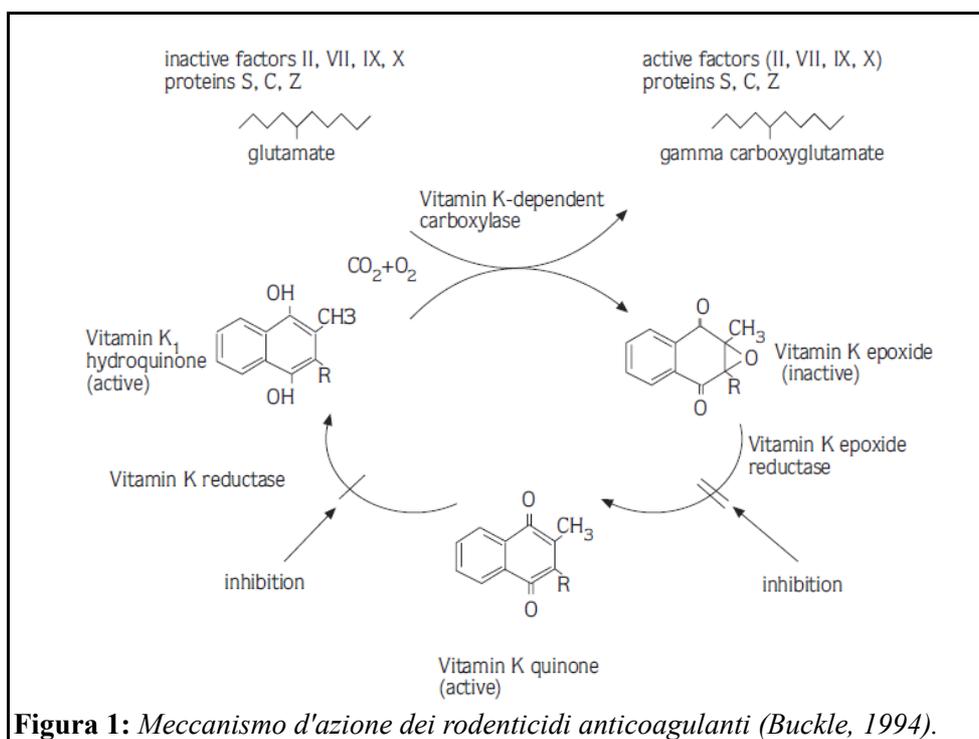
Gli animali selvatici e domestici si possono intossicare primariamente tramite l'ingestione di esche contenenti rodenticidi anticoagulanti. L'assenza di odore e il loro gusto appetibile sembrano rappresentare ulteriori motivi dell'incidenza di questa intossicazione sia negli umani che negli animali (Eason et al., 2002). L'ingestione di roditori avvelenati, sia morti che vivi, da parte di cani, gatti, suini, volatili e mammiferi selvatici (Murphy et al., 2002) è una causa secondaria di intossicazione. Meno frequenti, invece, le intossicazioni causate dal contatto diretto della pelle (Spiller et al., 2003) o dall'ingestione di acqua contaminata (gli idrossicumarinici e i suoi derivati sono idrosolubili) (Endepols et al., 2003). Inoltre, nell'uomo sono riportati casi di intossicazione spontanea sia in corso di terapia con Warfarin (Crowther et al., 2000) sia come atto volontario di suicidio con brodifacoum (Sheen et al., 1994) e bromadiolone (Lo et al., 2008). L'intossicazione accidentale è riportata in molte specie: cani (Eason et al., 2002, Binev et al., 2005, Hansen et al., 2003, Lewis et al., 1997, Sheafor & Couto, 1999, Mount et al., 2003, Woody et al., 1992), equini (Boermans et al.,

1991), gatti (Kohn et al., 2003), animali selvatici (Eason et al., 2002). Per investigare ulteriormente la farmacodinamica sono stati condotti degli studi sperimentali in animali da laboratorio (Begent et al., 2001), cani (Mischke, 1995). In base ad uno studio di Steensma e collaboratori nel 1994 l'emivita biologica ( $T_{1/2}$ ) del warfarin è di circa 15 ore, quella del difacinone 15-20 giorni, quella del brodifacoum 120 giorni e la durata dell'effetto tossico, dopo una singola ingestione, è approssimativamente di 14 giorni per il warfarin, 21 giorni per il bromadiolone, 30 giorni per il brodifacoum. Questi dati suggeriscono la necessità di una terapia più prolungata in base al tossico coinvolto. Una singola ingestione dei cumarinici di seconda generazione è sufficiente a causare emorragie, per questo vengono ritenuti più tossici (Zivelin et al., 1993), a differenza dei composti di prima generazione che generalmente esprimono la loro tossicità a seguito di ingestioni ripetute (Petterino & Paolo, 2001). Raggiungono il picco plasmatico in 12 ore circa, vengono metabolizzati nel fegato ed escreti principalmente con le urine ed in parte con le feci.

### **1.5 Meccanismo d'azione**

I fattori II, VII, IX e X della coagulazione e le proteine anticoagulanti C ed S, sono principalmente sintetizzati nel fegato e sono biologicamente inattivi a meno che non avvenga la carbossilazione di 9-13 residui di glutammato amino terminali, in modo da determinare la formazione dei residui  $\gamma$ -carbossigluttammato in grado di legare il  $Ca^{2+}$ . Questa reazione richiede  $CO_2$ , ossigeno molecolare, e vitamina K ridotta ed è catalizzata da una  $\gamma$ -glutamil carbossilasi nel reticolo endoplasmatico. La carbossilazione è direttamente accoppiata all'ossidazione della vitamina K al corrispondente epossido. La vitamina K ridotta deve essere rigenerata dall'eossido per sostenere la carbossilazione e la sintesi di proteine biologicamente attive. L'enzima che catalizza tale processo, la vitamina K eossido reduttasi, è inibito dai rodenticidi

anticoagulanti. La vitamina K (ma non la vitamina K epossido) può essere inoltre convertita nel corrispondente idrochinone da una seconda reduttasi, la DT-diaforasi (NADPH chinone ossido reduttasi). Questo enzima richiede elevate concentrazioni di vitamina K ed è meno sensibile ai cumarinici. Questo spiega il motivo per cui la somministrazione di ridotte quantità di vitamina K, può contrastare anche alte dosi di rodenticidi anticoagulanti. I valori approssimativi di emivita (in ore) sono: fattore VII (Proconvertina), 6,2; fattore IX (Christmas), 13,9; fattore X (Stuart), 16,5; fattore II (Protrombina), 41. Grazie all'emivita più elevata di alcuni fattori della coagulazione, in particolare del fattore II, l'effetto massimale anticoagulante, che corrisponde con l'evento emorragico si raggiunge dopo un tempo variabile di 12-24 ore (Petterino & Paolo, 2001; Woody et al., 1992). Il valore di PT può risultare prolungato precocemente, a causa della più rapida riduzione dei fattori dotati di più breve emivita, come il fattore VII. Non esiste una chiara selettività dell'effetto del warfarin sui fattori della coagulazione vitamina K-dipendenti, ma l'azione tossica ed il rischio emorragico, può essere correlato con il livello funzionale di protrombina, ed in misura minore, con quello del fattore X (Zivelin et al., 1993).



**Figura 1:** Meccanismo d'azione dei rodenticidi anticoagulanti (Buckle, 1994).

## **1.6 Segni clinici**

Nella specie canina i segni clinici possono essere aspecifici come abbattimento e disoressia. Nei soggetti sintomatici si può rilevare tachicardia, polipnea, ipotermia (Petterino et al., 2004) o ipertermia (Binev et al., 2005), ematochezia o melena, epistassi, sanguinamento auricolare (Lutze et al., 2003), emorragie cutanee (Robben et al., 1997), ematemesi ed ematuria (Lewis et al., 1997), ematometra (Padgett et al., 1998), idronefrosi bilaterale (Hansen et al., 2003) emorragie polmonari e versamento pleurico emorragico (Peterson et al., 1996), emorragia mediastinica ed ostruzione tracheale (Blocker & Roberts, 1999), emopericardio (Petrus & Henik, 1992), emoperitoeo e peliosi epatica (Beal et al., 2008) ematoma post venipuntura (Binev et al., 2005).

## **1.7 Diagnosi di intossicazione**

Il sospetto diagnostico può emergere dall'anamnesi, dai segni clinici e dalle alterazioni del profilo coagulativo: se in fase iniziale si denota solo l'aumento del PT, in fase avanzata anche l'aPTT è aumentato. Questi test sono ormai di uso routinario nella pratica clinica veterinaria. Si segnala uno studio (Mount et al., 2003) sull'utilizzo di un test finalizzato alla determinazione delle "PIVKA" (proteine indotte dall'assenza di vitamina K), la cui rilevanza è rimasta limitata alla ricerca, sia per la possibilità di risultati falsi positivi in presenza di gravi malattie epatiche, sia per il costo e soprattutto perchè non fornivano maggiori informazioni al clinico nelle situazioni d'urgenza rispetto ai tradizionali test di PT ed aPTT.

La conferma diagnostica la si ottiene identificando il principio attivo mediante cromatografia liquida. Si sono sviluppati nel corso degli anni nuove metodiche con strumentazioni e tecniche sempre più performanti (UPLC-MS/MS, cromatografia liquida ultra performante abbinata a spettrofotometria di

massa). Alcune pubblicazioni riportano di tecniche estrattive nel siero (Murphy et al., 1989; Felice et al. 1991), siero o sangue intero (Waddel et al., 2013), plasma (Robben et al, 2008; Fourel et al., 2010) plasma e fegato (Vandenbroucke et al., 2008), feci ( Sage et al., 2010) diverse matrici alimentari come carne cotta o succhi di frutta (Marek & Koskinen, 2007).

## **1.8 Terapia**

Nell'uomo la terapia di eventi emorragici acuti in seguito a terapia con farmaci anticoagulanti è studiata da anni e la ricerca in questo campo apporta continuamente migliorie significative come ad esempio l'utilizzo di concentrati di complessi di protrombina (Hickey et al., 2013). In Medicina Veterinaria la terapia d'urgenza dell'avvelenamento da rodenticidi riportata da tutti gli Autori prevede la trasfusione di plasma (fresco congelato) o di sangue intero (Sheafor & Couto, 1999; Beal et al., 2003) e la somministrazione di vitamina K per via orale o sottocutanea.

## **CAPITOLO 2 – VALUTAZIONE EPIDEMIOLOGICA DELL'INGESTIONE DA RODENTICIDI ANTICOAGULANTI NELLA SPECIE CANINA**

### **2.1 Introduzione e Obiettivi dello studio**

I pesticidi vengono utilizzati in tutto il mondo in svariati settori come in agricoltura, nell'industria e per uso domestico. Il loro uso estensivo, sebbene siano stati chiariti alcuni aspetti riguardanti la loro tossicità legata alle esposizioni prolungate, rappresenta un rischio reale per la salute delle persone e degli animali (Maroni et al., 2000).

Uno studio epidemiologico condotto in cinque paesi europei segnala che il cane è la specie più coinvolta negli episodi di avvelenamento. Infatti le chiamate ricevute dai centri di assistenza tossicologica ammontano a circa 65-67% in Francia, presso il Centre National d'Informations Toxicologiques Vétérinaires dell'Università di Lione (CNITV) (Berny et al., 2010) e ad un 80% sia in Belgio presso il Belgian Poison Centre (BPC) sia in Italia, presso il Servizio di Assistenza Tossicologica Veterinaria dell'Università di Torino (SATV) (Giuliano Albo & Nebbia, 2004). Questo dato è confermato dalla prevalenza di campioni provenienti da soggetti di specie canina rispetto ad altre specie pervenuti sia al Centro Antiveneni di Milano (CAV) sia all'Università di Pisa. Un'ulteriore analisi del CAV evidenzia che i rodenticidi sono i pesticidi più coinvolti e responsabili del 36% delle intossicazioni (Caloni et al., 2012), dati simili provengono dall'Italia centrale (Giorgi et al., 2002) ed anche in Sicilia rappresentano con gli organofosfati l'84% (Amorena et al., 2004), risultati sovrapponibili sono stati osservati nel Nord Est italiano (fonte Università di Padova, dati non pubblicati). Il 53% dei casi riguarda animali con età inferiore ai due anni, le femmine costituiscono il 57% ed i maschi il 43% (Caloni et al., 2012). Per quanto riguarda i composti coinvolti nell'intossicazione sono

principalmente di seconda generazione e dai dati del SATV il bromadiolone è il più comunemente riscontrato.

La finalità dello studio è di valutare l'epidemiologia dei pazienti con ingestione nota e sospetta in base ai segni clinici ed alterazioni coagulative compatibili e di esaminare i risultati delle analisi tossicologiche eseguite nei suddetti pazienti.

## **2.2 Materiali e metodi**

### **2.2.1 Database**

Sono state esaminate le schede cliniche (comprehensive di segnalamento, anamnesi, segni clinici, esami laboratoristici) degli ultimi cinque anni (gennaio 2009-gennaio 2014) mediante l'archivio informatico della Clinica Veterinaria San Marco di Padova (P.O.A. - System 6.0© e segg., software per ambulatori e cliniche veterinarie, Ing. L. Coppola, Mestre-Venezia).

Sono stati inclusi nello studio i soggetti di specie canina con i seguenti criteri:

- ingestione nota: il proprietario ha visto il cane nell'atto di ingestione in quanto fisicamente presente
- sospetto avvelenamento: segni clinici ed alterazioni del profilo coagulativo completo (PT, aPTT, Fibrinogeno, FDP's, Ddimeri, AT) compatibili con intossicazione da rodenticidi anticoagulanti.

Dalle medesime schede sono stati estrapolati i risultati tossicologici ove presenti.

Sono stati esclusi tutti i pazienti in cui l'anamnesi di ingestione era vaga e non era presente un esame coagulativo oppure il coagulativo era normale.

### **2.2.2 Raccolta campioni**

La raccolta dei campioni di sangue per le analisi laboratoristiche di questo studio è stata sempre effettuata da un medico veterinario della clinica per evitare problemi pre-analitici. Dai pazienti si è scelto di prelevare dalla vena safena, solo in soggetti estremamente compromessi dalla vena giugulare, dopo appropriata rasatura, disinfezione dell'arto e compressione emostatica post prelievo.

Il sangue destinato all'analisi tossicologica è stato posto in una provetta sottovuoto da 2 ml (BD Vacutainer) contenente K2 EDTA 3,6 mg come anticoagulante. Le provette venivano delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto miscelamento tra sangue ed anticoagulante.

### **2.2.3 Strumentazione e Metodica**

Le analisi tossicologiche su sangue intero in K3 EDTA fresco o refrigerato sono state condotte presso il Laboratorio di Analisi San Marco con strumentazione UPLC- MS/MS Acquity (Waters, Milford, USA) da un biotecnologo qualificato.

Lo strumento è un sistema costituito da due componenti principali:

*1) Componente cromatografica:*

- ACQUITY UPLC COLUMN HTR HT (K10UPH221G): modulo in cui viene posizionata la colonna cromatografica contenente una fase stazionaria, opportunamente termostata e con temperatura regolabile in base alle esigenze analitiche. Le colonne utilizzate in questo strumento sono formate da particelle ibride da 1,7 micron costituite da etil silicene con strutture a ponti di etano e sono costituite da un materiale resistente alle alte pressioni e possono raggiungere i 5000 PSI (pound-force per square inch).

- ACQUITY UPLC AUTOSAMPLER MOD (M10UPA375M): autocampionatore dotato di un sistema di iniezione automatica dei campioni ad alta capacità di carico e iniezione; il sistema inietta i campioni prelevati dalle vials nel flusso del sistema cromatografico. Un meccanismo di individuazione interno inoltre utilizza una sonda per accedere alle posizione dei campioni e aspirarli.

- ACQUITY UPLC BINARY SOL MGR (L10UPB332A): sistema binario di gestione degli eluenti (fase organica e fase acquosa) con pompa ad alta pressione che trasporta il solvente nel sistema e fornisce un flusso costante alle velocità flusso analitiche.

## 2) Componenti di rilevazione:

- ACQUITY TQD (QBB1178): spettrometro di massa costituito da una sorgente ESI (electrospray ionization) interfacciata da un analizzatore a doppio quadrupolo dotato di un fotomoltiplicatore.

-ACQUITY UPLC PDA DETECTOR (G10UPD925A): detector con rilevazione mediante lampada a fotodiodi che rileva l'assorbimento della molecola da 210 nm a 400 nm.

Il monitoraggio del sistema è affidato ad un personal computer in cui attraverso un software brevettato dalla stessa casa produttrice permette di monitorare le singole componenti del sistema. Il software MasslynK versione 4.1 permette di gestire lo strumento in tutte le sue funzioni ed evidenzia le varie anomalie che il sistema potrebbe presentare durante l'esecuzione di analisi.

I solventi ultrapuri > 90% per cromatografia, i reagenti e lo standard interno sono stati ottenuti dalla Sigma-Aldrich (Seelze, Germany).

Per ogni anticoagulante sono stati preparati degli stock di soluzioni standard: partendo da 10 mg di standard che viene disciolto in metanolo per costruire mediante diluizioni seriali vari punti di concentrazione fino a 1ng/ml. Tutte queste soluzioni sono state mantenute in congelatore a  $-18^{\circ}\text{C}$  per un mese.

### Procedura di estrazione

La procedura consiste nel trasferire 100  $\mu\text{L}$  di sangue intero in k3 edta in un'ependorf da 2 ml aggiungere 900  $\mu\text{L}$  della soluzione di  $\text{ZnSO}_4$  2M (solfato di zinco) vortexare per 1 minuto e ultracentrifugare 20000 rpm (11600 x g) per 5 minuti prelevare 400  $\mu\text{L}$  di surnatante e trasferire in un'ependorf da 2ml aggiungere 600  $\mu\text{L}$  di acetonitrile puro vortexare per 1 minuto e ultracentrifugare 20000 rpm (11600 x g) per 5 minuti trasferire 400  $\mu\text{L}$  in vial con inserto. La separazione cromatografica è stata ottenuta utilizzando una colonna Acquity UPLC BEH C18 (i.d. 1.7  $\mu\text{m}$ , 2.1 x 50 mm) con una fase mobile di A: acqua allo 0,2% di acido formico e B: metanolo.

La durata della corsa è stata di 14 minuti. La temperatura della colonna è di  $45^{\circ}\text{C}$ . La velocità del flusso di 0,2 ml/min ed il volume di iniezione è di 10  $\mu\text{L}$ .

Il limite di quantificazione determinato è 0,001 ppm (1 ng/mL) per tutti gli anticoagulanti testati. Un test è stato considerato positivo se si rilevava un anticoagulante ad una concentrazione uguale o superiore al LOQ. Concentrazioni traccia sono state segnalate ma refertate come esame negativo perchè non quantificabili, inferiori cioè al limite di rilevazione (LOD).

### **2.2.4 Statistica**

La valutazione della normalità è stata eseguita mediante il test di Shapiro-Wilk. Si è utilizzato il test esatto di Fisher per analizzare la distribuzione dei sessi nella popolazione oggetto di studio e nella popolazione controllo.

La significatività è stata settata per valori di  $p < 0.05$ .

## 2.3 Risultati

Hanno incontrato i criteri di inclusione 169 cani. I pazienti afferiti presso la clinica nel medesimo periodo sono stati 29436, la prevalenza stimata è 0,57%. Questi soggetti sono stati suddivisi in base ai criteri di inclusione: 38 cani con ingestione nota e 131 cani con sospetto di avvelenamento.

### Ingestione nota

Dei 38 soggetti con ingestione nota 3 soggetti avevano ingerito il tossico nei giorni precedenti ed erano già in terapia con la vitamina k per via orale, il proprietario è venuto a visita di controllo ed è stato eseguito in tutti l'esame tossicologico. I rimanenti 35 soggetti vengono portati d'urgenza a visita perchè hanno assunto accidentalmente il tossico dai 15 minuti alle 4 ore prima della presentazione in clinica. Nella maggior parte dei casi l'ingestione avviene in un luogo di proprietà (giardino, garage) dove il proprietario è presente e talvolta è stato lui stesso a posizionare le esche. Il tossico responsabile è stato individuato mediante l'identificazione visiva delle esche portate a visita o dal nome riportato dal proprietario in 22 casi mentre in 8 casi il proprietario dichiarava un prodotto anticoagulante ma non era in grado di risalire al nome (vedi figura 6). I nomi commerciali dei prodotti dichiarati più frequentemente riportati sono Racumin pasta NF e Racumin pasta BM ( Bayer Crop Science Milano), Broditop (Zapi spa, Padova). In 33 pazienti si è indotta l'emesis mediante apomorfina (Apofin 30 mg/3 ml, Chiesi Farmaceutici, Parma) per via endovenosa al dosaggio di 0.02-0.04 mg/kg previa applicazione di ago cannula (BD Insyte, Becton, Dickinson &CO., USA). In due soggetti il proprietario rifiuta la decontaminazione gastrica ed opta per il trattamento con vitamina k immediato.

## Sospetto avvelenamento

Il sospetto diagnostico di avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti in 131 cani è stato fondato sulle alterazioni del profilo coagulativo in tutti i soggetti, in alcuni anche dai segni clinici (emorragie apprezzabili all'esame fisico o mediante diagnostica collaterale).

## Segnalamento

**Sesso:** nella popolazione oggetto di studio (169) le femmine risultano essere più colpite. Essendo la frequenza di presentazione all'interno della popolazione controllo della Clinica (29436 cani) equidistribuita tra femmine e maschi, rispettivamente 49,3% e 50,7%. È risultato statisticamente significativo ( $p=0.017$ ) che le femmine sono più colpite rispetto ai maschi, rispettivamente 58,6% e 41,4% nella popolazione oggetto di studio (169 cani). Inoltre si è considerata la sterilizzazione un fattore discriminante perché vengono sterilizzate più femmine rispetto ai maschi, quindi si è deciso di uniformare la popolazione per sesso e non per condizione sessuale.

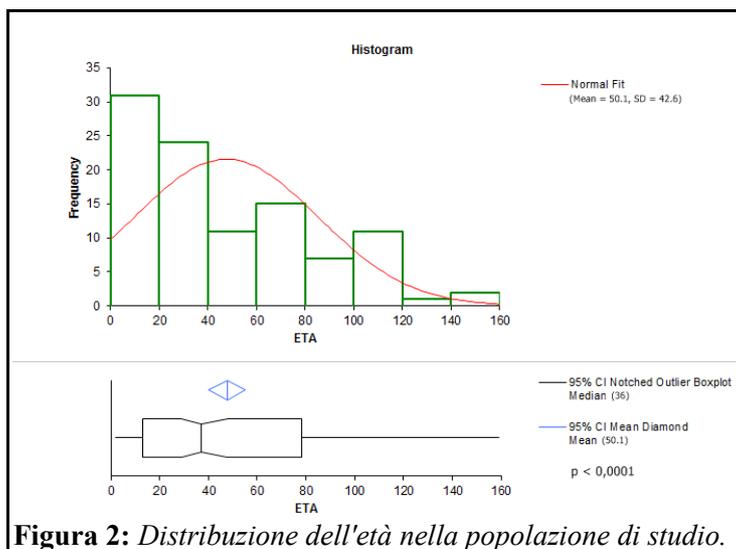
	<b>Popolazione controllo</b>	<b>Popolazione di studio</b>
<b>TOTALE Popolazione</b>	29436 (100 %)	169 (100 %)
<b>TOTALE Maschi</b>	14900 (50,7 %)	70 (41,4 %)
<b>TOTALE Femmine</b>	14536 (49,3 %)	99 (58,6 %)

**Tabella 1:** Sesso nella popolazione di controllo e di studio.

<b>Sesso</b>	<b>Ingestione nota</b>	<b>Sospetto Avvelenamento</b>	<b>TOTALE</b>
<b>Maschio Intero</b>	13	45	70
<b>Maschio Castrato</b>	7	5	
<b>Femmina Intera</b>	4	40	99
<b>Femmina Sterilizzata</b>	14	41	
<b>TOTALE</b>	38	131	169

**Tabella 2:** Condizione sessuale nella popolazione di studio.

**Età:** l'età è variabile da un minimo di 3 mesi ad un massimo di 160 mesi con una mediana di 36 mesi e una media di 50.1.

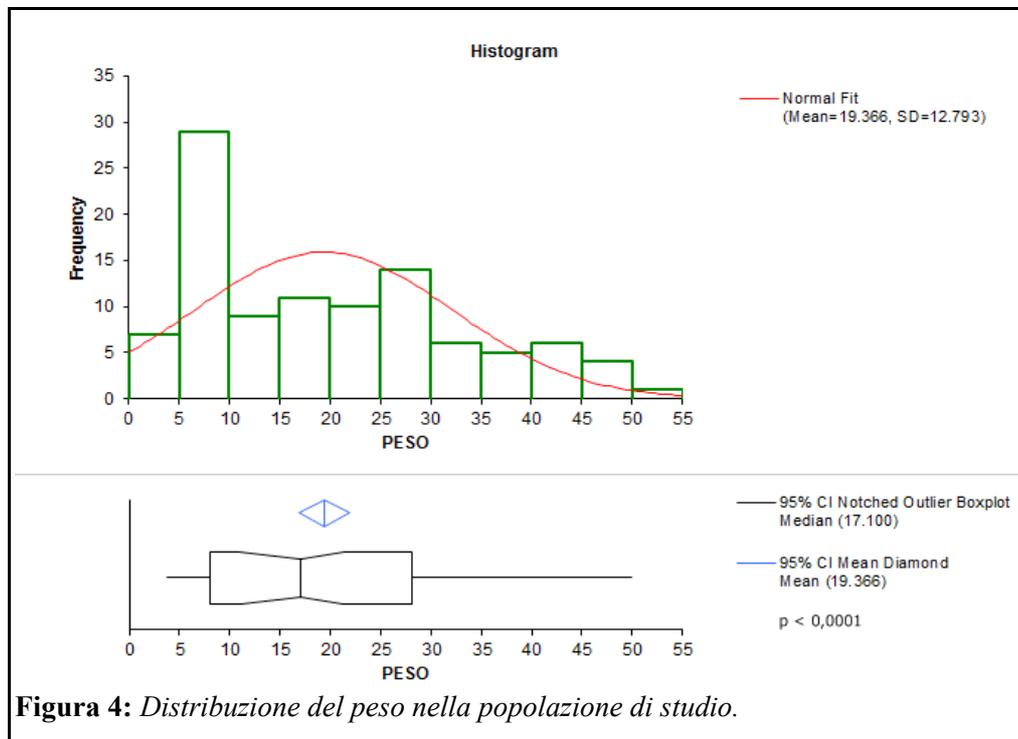


**Razza:** il meticcio è la razza più rappresentata, infatti nel periodo di studio sono afferiti alla Clinica 8663 meticci, 1694 labrador retriever e 1517 pastore tedesco rispettivamente seconda e terza razza più frequente. Nella tabella vengono elencate le razze con un numero uguale o maggiore di 2 individui colpiti. I restanti soggetti appartengono ognuno a 22 razze diverse.

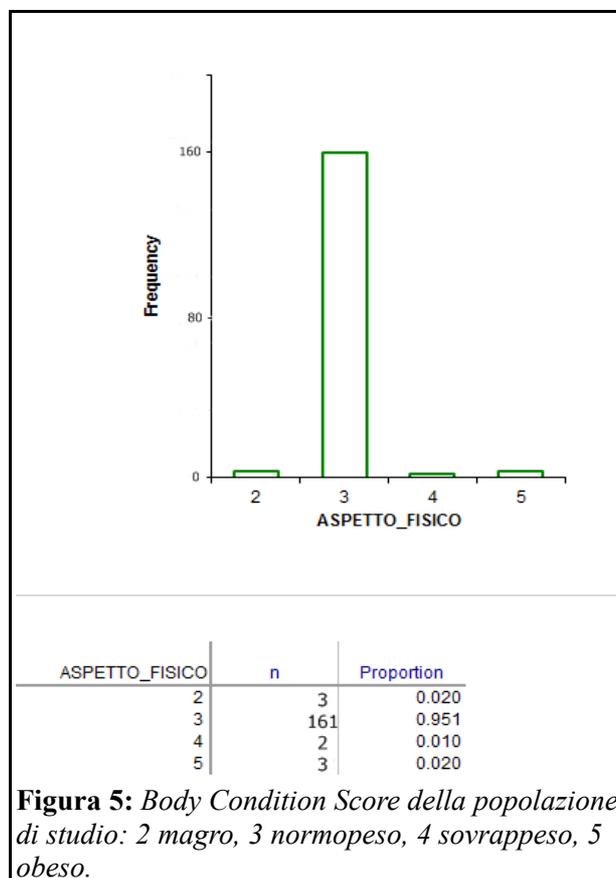
RAZZA	Ingestione nota	Sospetto Awelenamento
Meticcio	13	49
labrador Retriver	6	11
Pastore Tedesco	0	8
Pinscher	2	4
Jack Russel Terrier	1	5
West Highland	2	0
Pointer	1	1
Bracco	1	1
Segugio	0	3
Weimaraner	1	2
Dogo Argentino	1	1
Beagle	1	3
Cocker Spaniel Inglese	1	5
Bovaro del Bernese	1	1
Setter Inglese	0	4
Setter Gordon	0	2
Bassotto Tedesco	0	4
American Staff	0	3
Boxer	0	4
Akita Inu	0	2
Siberian Husky	0	2
Altre razze	6	16

**Figura 3:** Frequenza di presentazione della razza nella popolazione di studio.

**Peso:** la maggior parte dei soggetti è stata classificata come normopeso. Il peso minimo è di 3.8 kg, un massimo di 50 kg con una mediana di 17 kg e una media di 19,3 kg.



**Figura 4:** Distribuzione del peso nella popolazione di studio.



**Figura 5:** Body Condition Score della popolazione di studio: 2 magro, 3 normopeso, 4 sovrappeso, 5 obeso.

## Esame tossicologico

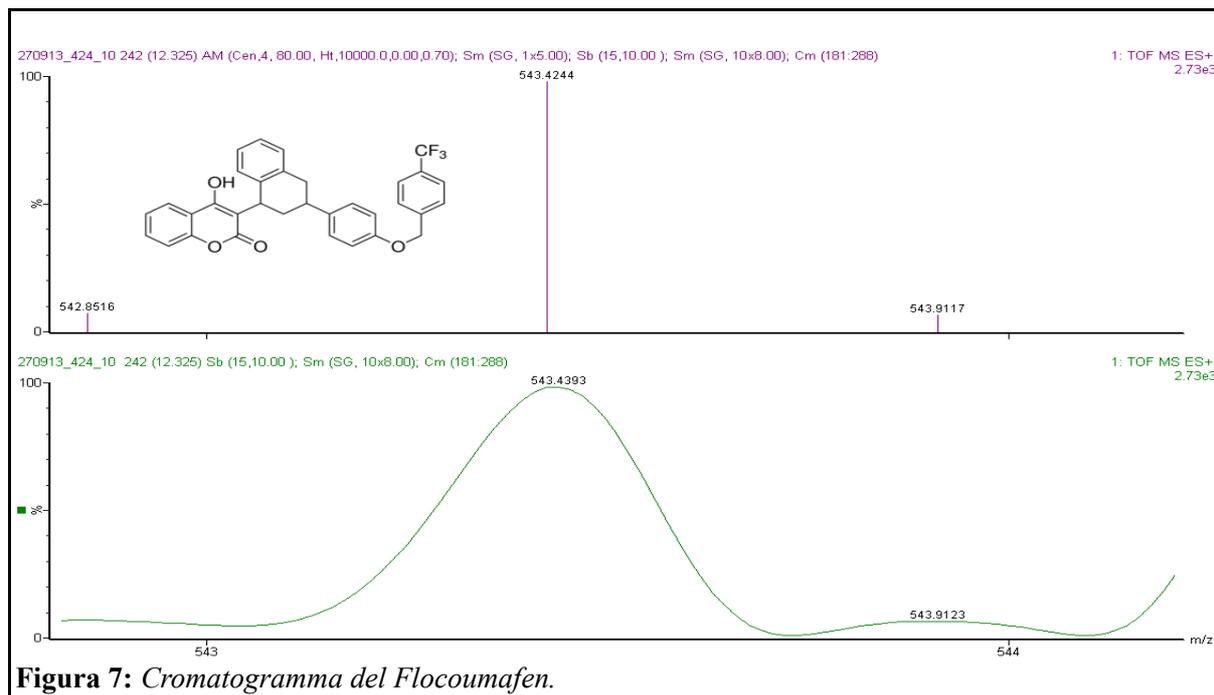
L'esame tossicologico è stato effettuato in 100 soggetti di cui 8 (6 positivi e 2 negativi) appartenenti al gruppo dell'ingestione nota e 92 sono stati confermati avvelenati nel gruppo del sospetto avvelenamento. In quest'ultimo gruppo non è stato possibile effettuare l'esame tossicologico in 39 soggetti che vengono riportati in figura 6 come "tox ignoti".

Principio Attivo	Ingestione nota		Sospetto Avvelenamento	
	Tox positivo	Prodotto dichiarato	Tox positivo	Tox ignoto
Flocoumafen	0	0	27	0
Brodifacoum	1	8	18*	0
Bromadione	2	10	15*	0
Difenacoum	1*	2	15*	0
Difetialone	1*	0	10*	0
Difacinone	0	0	5	0
Cumatetralil	1	2	2	0
Cumaclor	1	0	2	0
Rodenticida Anticoagulante Non specificato	0	8	0	0
TOTALE	7 (6*)	30	94 (92*)	39

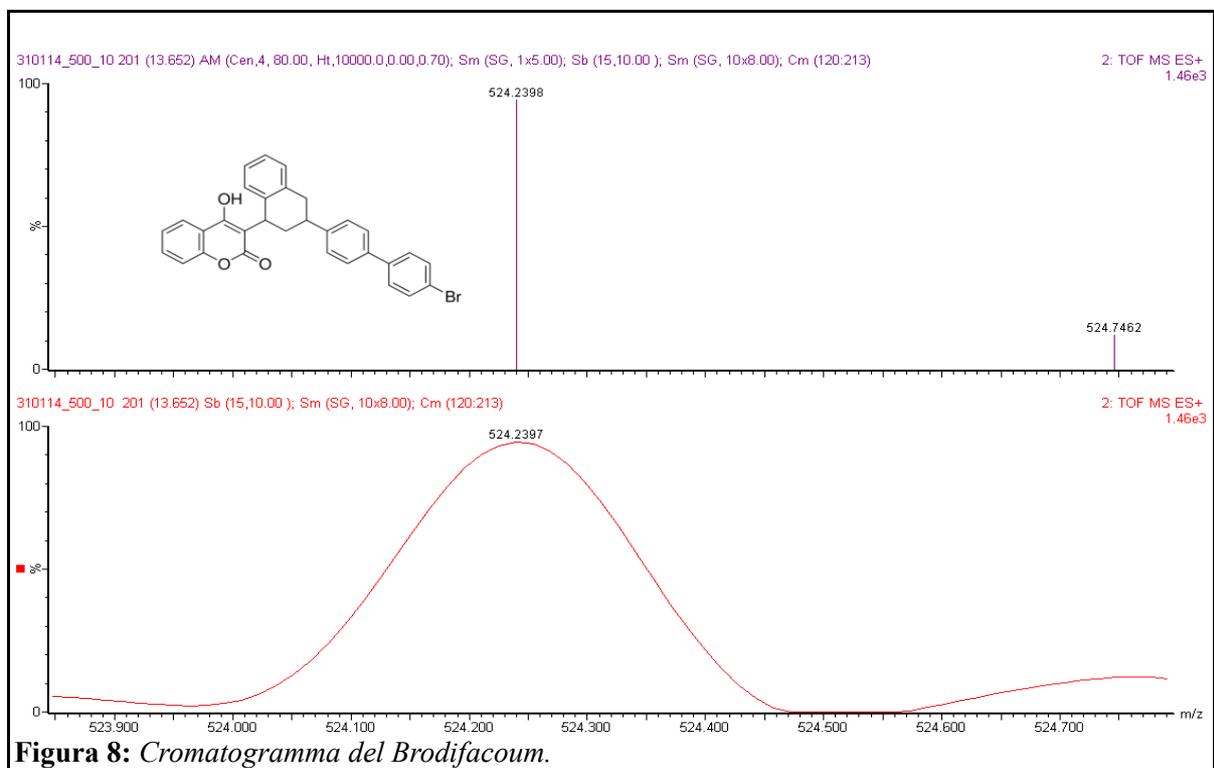
**Figura 6:** *Rodenticidi Anticoagulanti rilevati dall'esame tossicologico, dichiarati dal proprietario o ignoti.*

*\* 3 esami tossicologici (1 nell'ingestione nota + 2 nel sospetto avvelenamento) risultavano positivi contemporaneamente per due composti anticoagulanti.*

**Flocoumafen:** riscontrato in 27 tossicologici e in nessun caso di ingestione nota dichiarata.



**Brodifacoum:** riscontrato in 19 tossicologici e in 8 casi di ingestione nota dichiarata.



**Bromadiolone:** riscontrato in 17 tossicologici e in 10 casi di ingestione nota dichiarata.

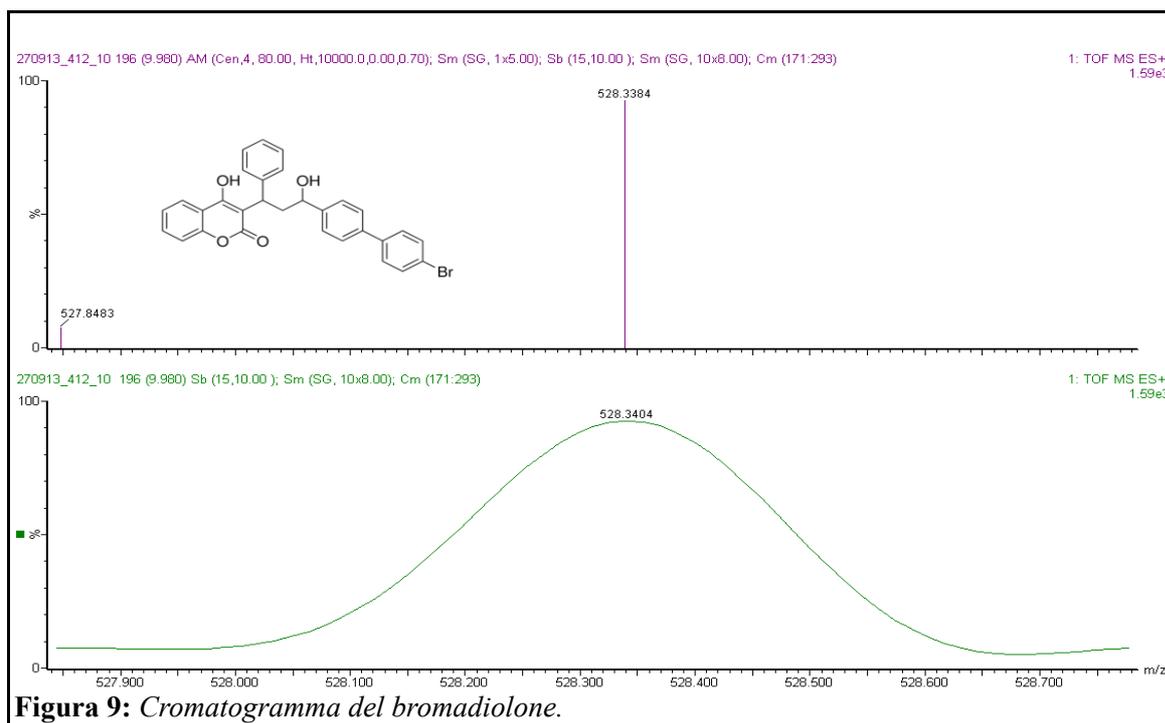


Figura 9: Cromatogramma del bromadiolone.

**Difenacoum:** riscontrato in 16 tossicologici e in 2 casi di ingestione nota dichiarata.

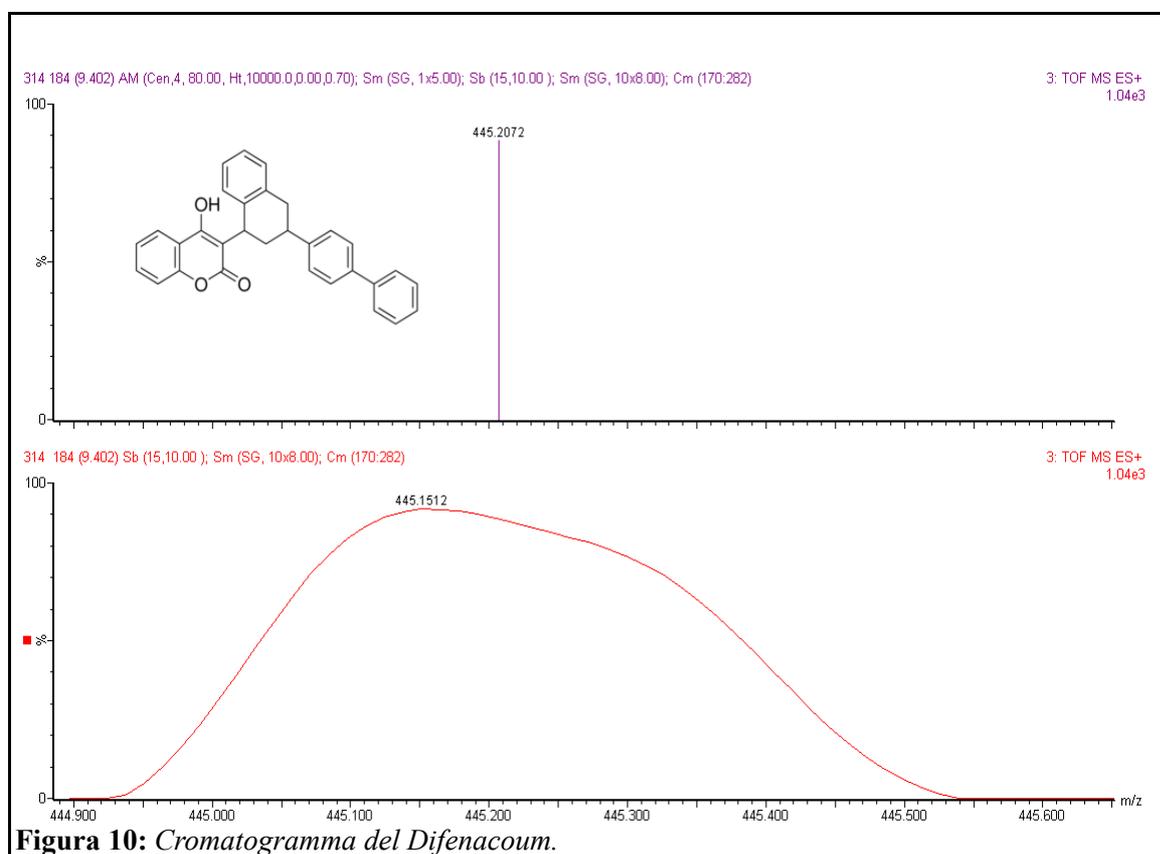
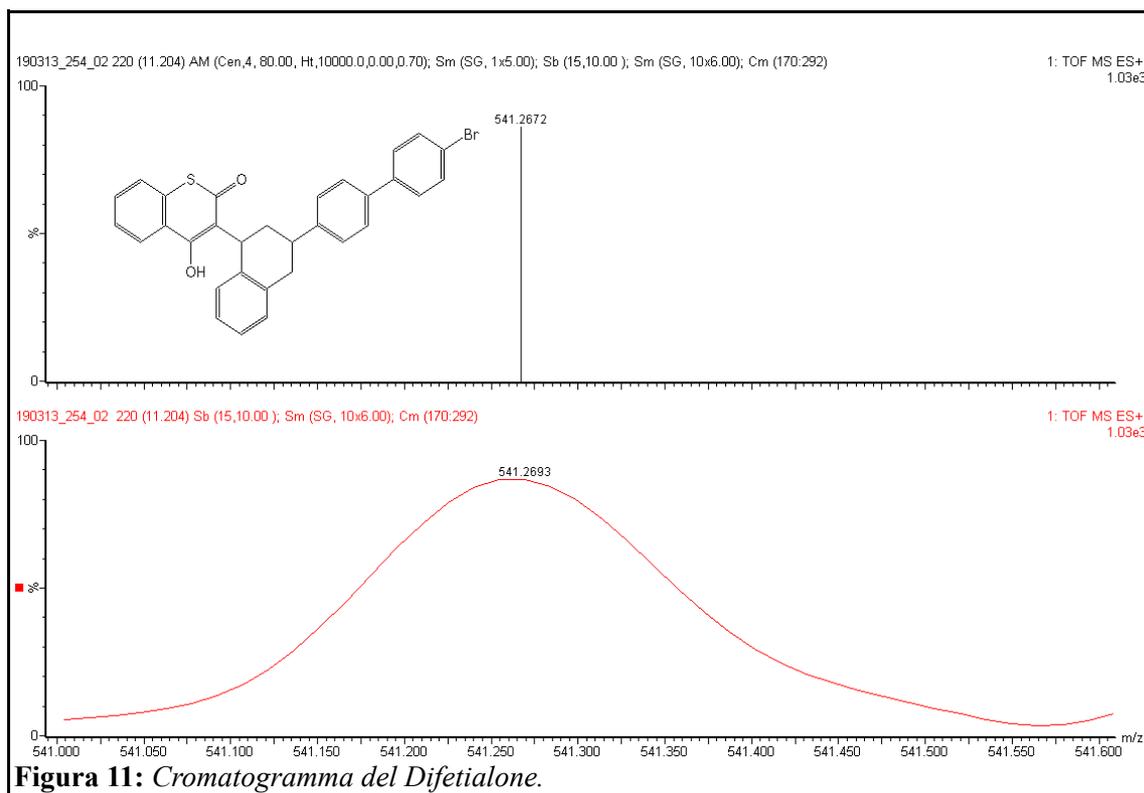


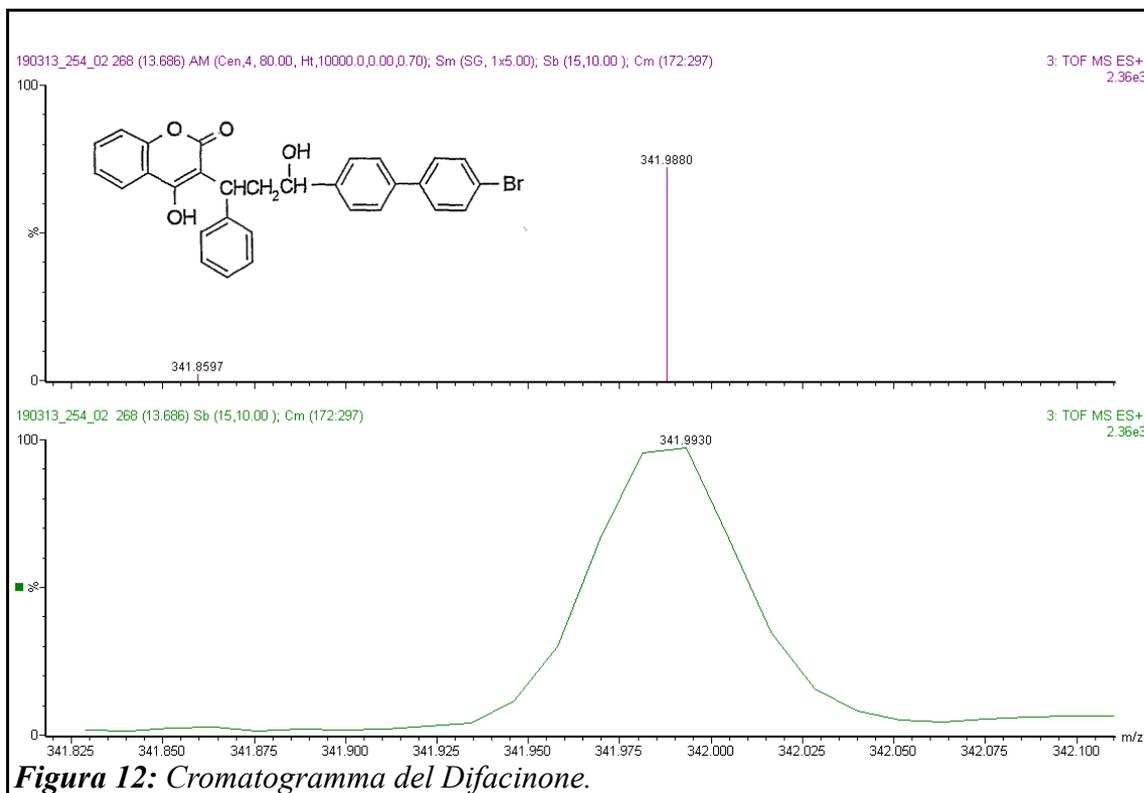
Figura 10: Cromatogramma del Difenacoum.

**Difetialone:** riscontrato in 11 tossicologici e in nessun caso di ingestione nota dichiarata.



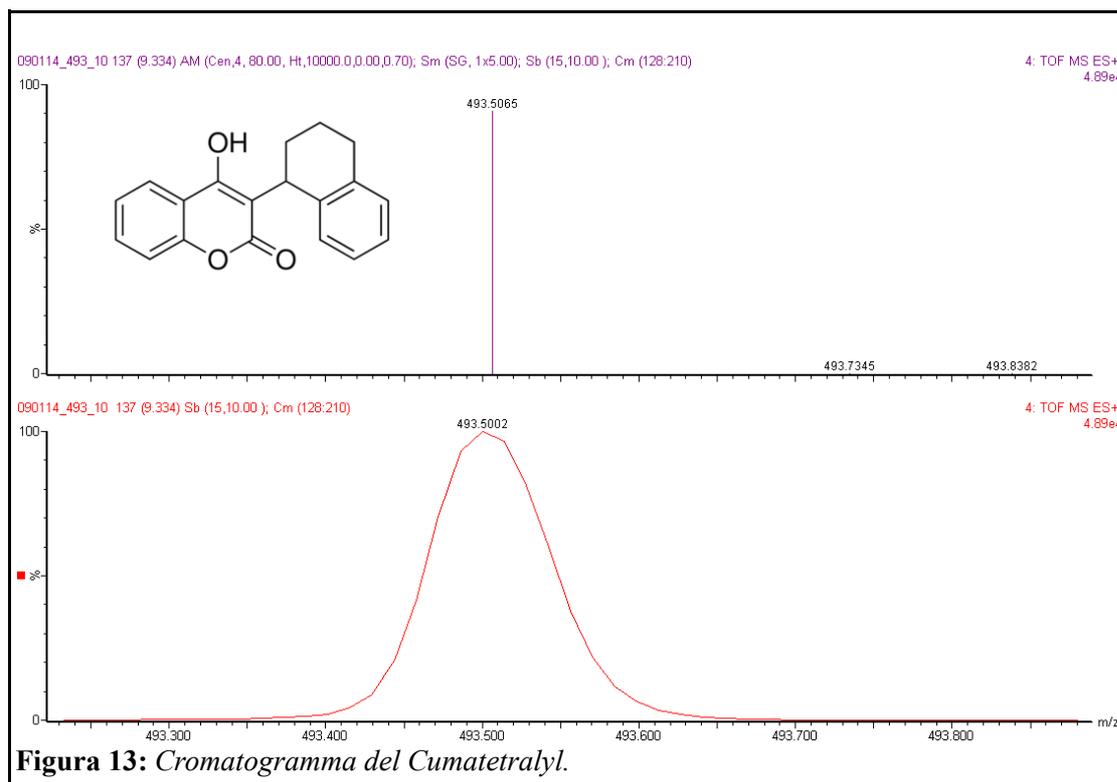
**Figura 11:** Cromatogramma del Difetialone.

**Difacinone:** riscontrato in 5 tossicologici e in nessun caso di ingestione nota dichiarata.

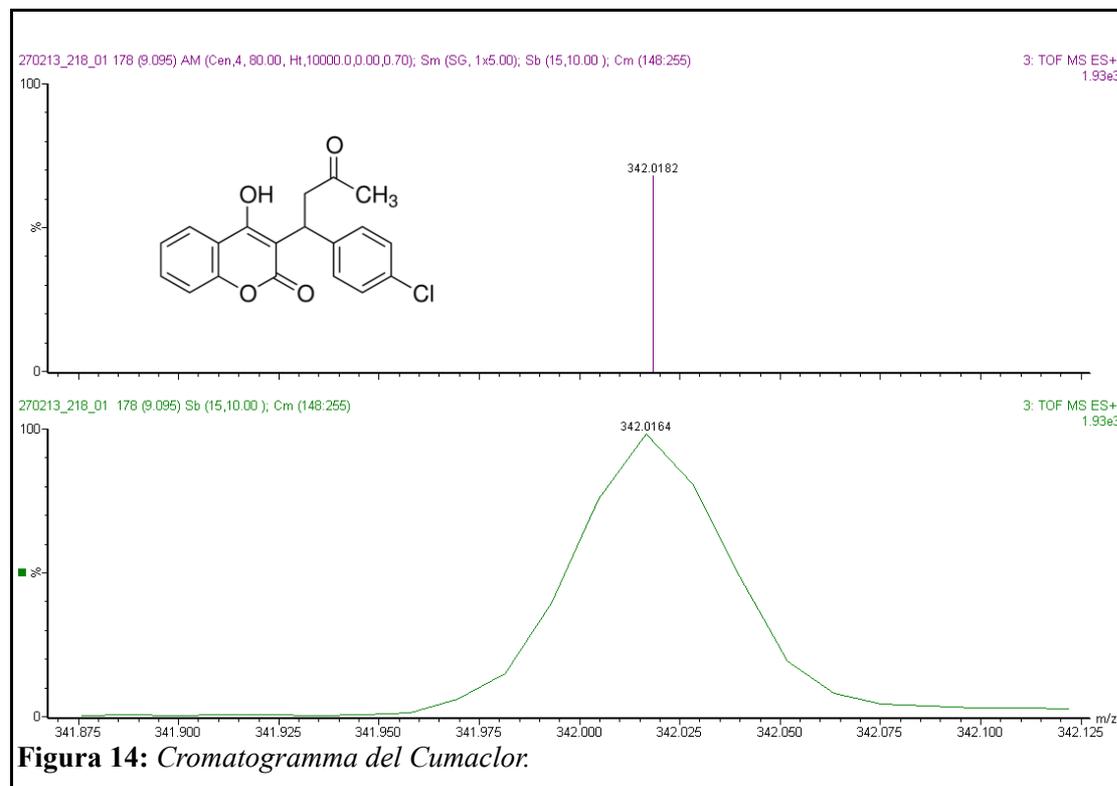


**Figura 12:** Cromatogramma del Difacinone.

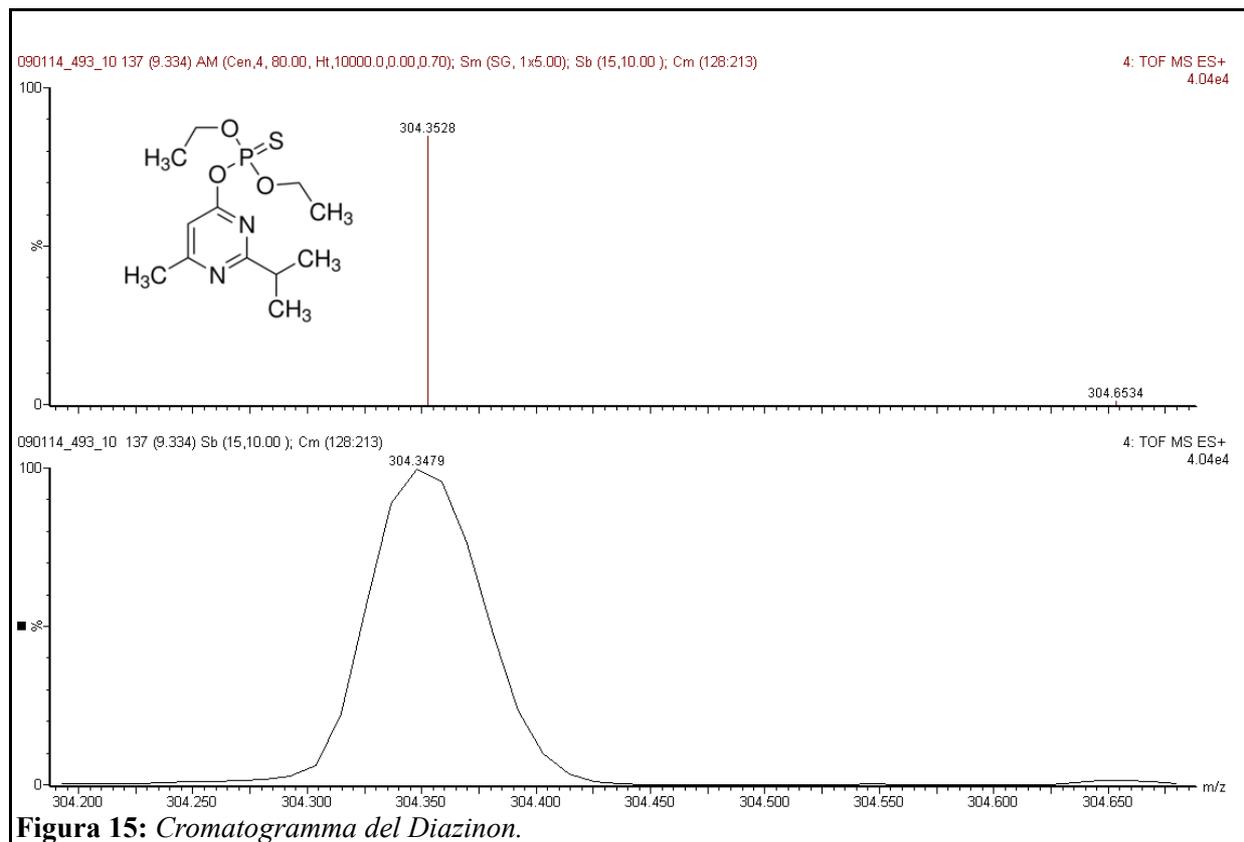
**Cumatetralyl:** riscontato in 3 tossicologici e in 2 casi di ingestione nota dichiarata.



**Cumaclor:** riscontato in 3 tossicologici e in nessun caso di ingestione nota dichiarata.



**Diazinon:** riscontrato nell' 80% dei tossicologici dei pazienti positivi per rodenticidi anticoagulanti.



**Figura 15:** Cromatogramma del Diazinon.

## 2.4 Discussioni

L'avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti è risultato essere l'intossicazione più comunemente riscontrata nella casistica della Clinica, sembrano essere più colpite le femmine, tendenzialmente giovani e normopeso. Non sembra esserci una predisposizione di razza in base alla casistica della Clinica. Questi risultati epidemiologici rispecchiano i dati provenienti da altri studi sul territorio italiano (Caloni et al., 2012).

Nella maggior parte dei soggetti con ingestione nota il proprietario è consapevole dell'accaduto perchè presente ed in alcuni casi porta in clinica anche il topicida. L'esame tossicologico in questo gruppo è stato effettuato in un numero ridotto di casi, 8 di cui 2 soggetti sono risultati negativi grazie al

tempestivo intervento di decontaminazione gastrica mediante l'induzione del vomito mentre nei 6 soggetti positivi 3 cani avevano assunto il tossico giorni prima e negli altri 3, nonostante l'emese, si è rinvenuta presenza del tossico nel sangue. Di questi ultimi un cane, positivo per cumatetralyl, nonostante terapia adsorbente con carbone attivo post emese presentava un coagulativo alterato con PT ed aPTT aumentati dopo 48 ore. Sebbene un recente studio con una casistica di 150 soggetti dimostri come la decontaminazione mediante lavanda gastrica entro le 4 ore dall'ingestione e la congiunta terapia con carbone attivo siano efficaci nel prevenire le alterazioni coagulative e la sintomatologia dell'avvelenamento (Pachtinger et al., 2013) si è valutato meno invasivo per il paziente e meno costoso per il proprietario indurre l'emese evitando l'intubazione previa anestesia e la lavanda. I risultati di questo studio indicano che l'emese da sola non garantisce una completa sicurezza, anche perchè spesso non si conosce il tossico responsabile e la sua velocità di assorbimento in ogni singolo paziente. Questo dato è da tenere in considerazione perchè se non c'è compliance del proprietario a ritornare in clinica dopo 24-48 ore per un esame coagulativo di controllo è necessario prescrivere la terapia con vitamina k a casa.

Nei soggetti decontaminati la negatività dell' esame tossicologico (un esame tossicologico negativo) autorizza a non intraprendere o a sospendere la terapia con vitamina k. In base ai criteri di inclusione scelti per il gruppo dei sospetti avvelenati si è ottenuta una specificità del 100% essendo gli esami tossicologici risultati tutti positivi (92 su 92). Ipotizziamo quindi che anche gli altri soggetti sarebbero risultati positivi allo screening tossicologico se fossero stati testati. Comunque nei soggetti in cui si sospetta l'avvelenamento in base ai segni clinici o alle alterazioni coagulative l'esame tossicologico rappresenta la conferma diagnostica. Questo esame inoltre è importante per conoscere il principio attivo responsabile e di conseguenza per valutare la durata della terapia. Soprattutto per quest'ultimo aspetto è fondamentale motivare il proprietario all'esecuzione dell'esame.

I risultati tossicologici hanno evidenziato il flocoumafen come principale responsabile dell'intossicazione nel cane. Questo principio attivo sembra essere meno tossico nelle specie non target tranne che nel cane, nel quale la DL50 è di 0.075-0.25 mg/kg (Dunbock, 1980) ed è forse per questo che viene usato principalmente nei programmi di derattizzazione pubblica e nessun proprietario ha segnalato l'uso privato di formulazioni contenenti questo principio attivo, a differenza del bromadiolone o del brodifacoum, anch'esse risultati molto frequenti. In tre soggetti si è riscontrata la positività per due principi attivi contemporaneamente ( difacinone+ difenacoum in due soggetti e in un soggetto bromadiolone + brodifacoum), anch'essi avevano ingerito l'esca in luoghi pubblici. Per quanto riguarda il warfarin non è mai stato riscontrato e ciò conferma il suo scarso utilizzo al giorno d'oggi come topicida a vantaggio dei prodotti di seconda generazione. Inoltre nella maggior parte delle analisi si è riscontrata la presenza di organofosfati (diazinon, leptofos, fenthion) la cui azione potrebbe forse esplicarsi peggiorando la sintomatologia clinica del paziente.

Tutte le analisi sono state eseguite come qualitative (positivo o negativo) e solo in un numero esiguo di esami si è eseguita la quantificazione. Non è stato quindi possibile esprimere se sussisteva una correlazione tra la gravità dei segni clinici e la concentrazione del tossico come valutato in un precedente studio (Waddel et al., 2013). In circa l'80% dei soggetti con ingestione nota e in un quarto dei soggetti con sospetto avvelenamento non viene inoltrato l'esame ai centri di analisi tossicologiche, questo può sottostimare la reale diffusione e l'impatto che hanno questi prodotti sulla salute animale. Concludendo questi dati epidemiologici possono essere nel complesso utili al clinico medico per la diagnosi e la gestione dei pazienti con ingestione nota o sospetto avvelenamento.

## **PARTE SECONDA – LE PROTEINE DI FASE ACUTA NEI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI**

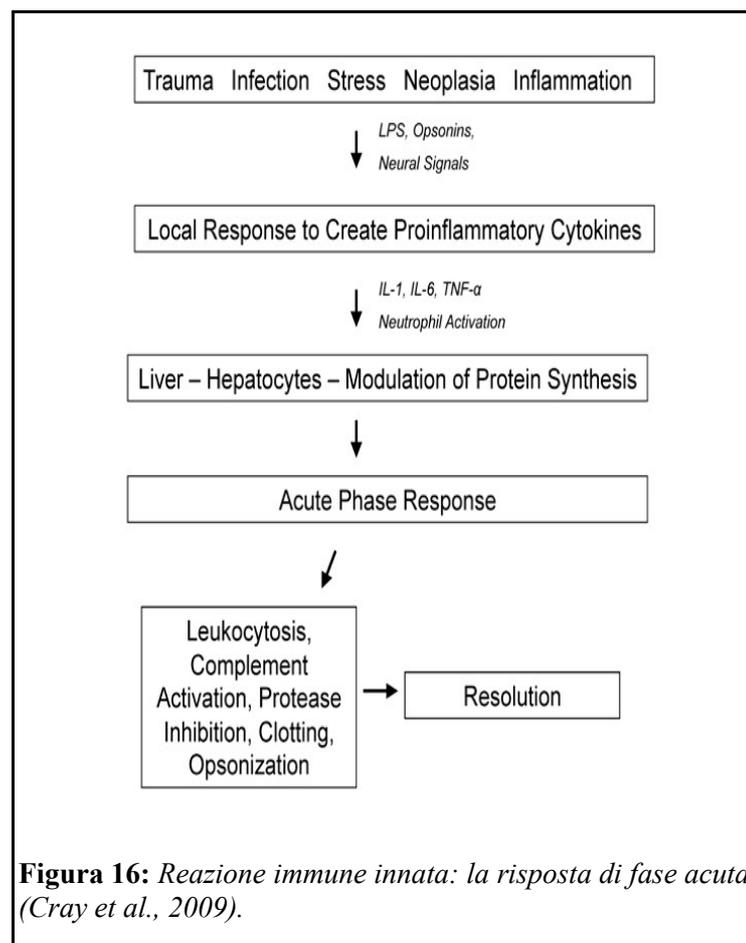
La presenza di una relazione tra i marcatori dell'inflammatione e della coagulazione è un argomento ben dimostrato e studiato in medicina umana. Gli studi svolti in merito, dimostrano chiaramente come inflammatione e coagulazione siano due processi che interagiscono l'uno con l'altro, influenzandosi a vicenda (Levi et al., 2004). Nei seguenti capitoli verrà brevemente descritta la fisiopatologia della fase acuta e le proteine principalmente coinvolte, le quali saranno studiate in una popolazione di cani tendenzialmente emorragici in quanto avvelenati da rodenticidi anticoagulanti.

### **CAPITOLO 3 – LE PROTEINE DI FASE ACUTA**

#### **3.1 La risposta di fase acuta**

La risposta della fase acuta descrive l'insieme dei processi aspecifici, fisiologici e biochimici in risposta ad un'inflammatione (di origine infettiva o immuno-mediata) o ad un danno tissutale (trauma, chirurgie, neoplasie). Tale risposta è codificata dal sistema immunitario innato (Cray et al., 2009) . Lo scopo di questa complessa reazione sistemica è di ristabilire l'omeostasi e di promuovere la guarigione. I primi segnali provengono dai tessuti danneggiati, dai quali partono degli stimoli, ad esempio peptidi bioattivi prodotti dai neuroni in risposta al dolore, oppure da proteine intracellulari provenienti dalle cellule danneggiate, che stimolano la produzione di molecole (citokine) in grado di trasdurre un segnale dall'esterno della cellula all'interno della stessa, tramite recettori (Eklund, 2009).

Il sistema immunitario innato è in grado di inizializzare la produzione di proteine della fase acuta (APP) grazie alla liberazione di citokine e chemokine da parte di cellule attivate quali monociti, macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali, piastrine, cheratinociti e cellule T. I segnali pro-infiammatori prodotti comprendono Interleukina 1 (IL-1), Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-alfa) e Interleukina 6 (IL-6) e agiscono a vari livelli in tutto l'organismo, inducendo anche la produzione delle APP (Cray et al., 2009). La risposta del paziente quindi riguarda la up-regolazione di numerose proteine (oltre 200) prevalentemente di origine epatica, grazie alla liberazione di citokine da parte del sito patologico. In altri termini, in caso di danni tissutali e/o infiammazioni il sistema immunitario produce una “risposta della fase acuta”, modificando la concentrazione plasmatica di alcune proteine, chiamate “proteine della fase acuta” (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011).

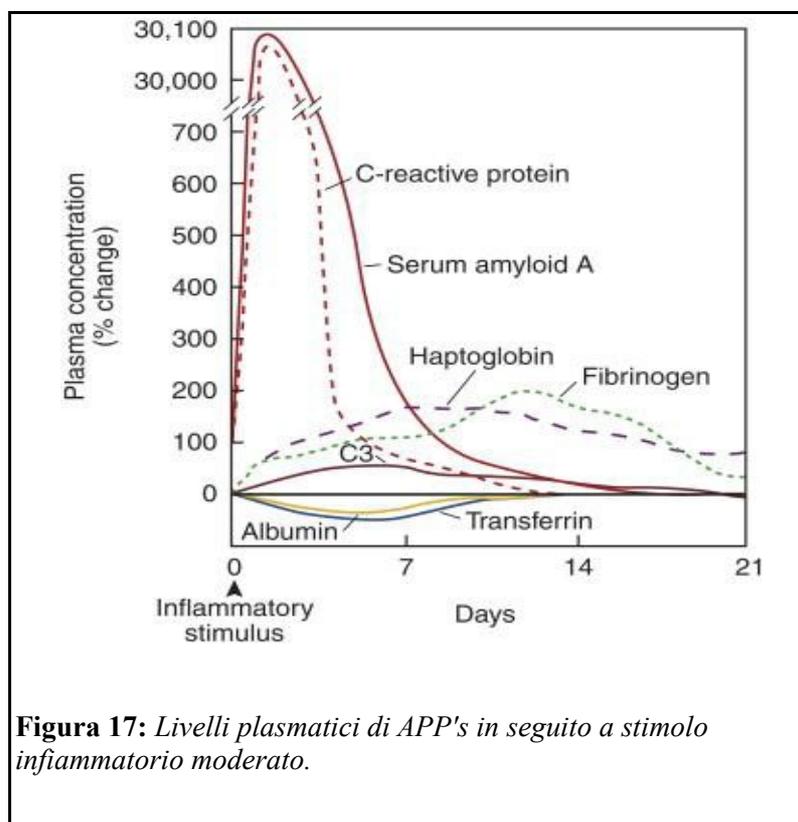


### **3.2 Classificazione e Descrizione delle Proteine di fase acuta (APP's)**

Le proteine della fase acuta possono essere utilizzare come biomarkers per valutare la risposta immunitaria primaria sistemica ad infezioni, infiammazioni e traumi (Eckersall & Bell, 2010) e vengono definite APPs negative se diminuiscono come ad esempio l'albumina e la transferrina ed APPs positive se aumentano come la proteina C reattiva (CRP), l'amiloide sierica A (SAA), l'aptoglobina (Hp), l' $\alpha$ -1 glicoproteina acida (AGP), la ceruloplasmina (Cp) ed il fibrinogeno. Le proteine appartenenti a questo secondo gruppo, in base alla loro risposta agli stimoli pro-infiammatori, vengono classificate in principali ed in moderate. Le principali (CRP, SAA) presentano le seguenti caratteristiche: rapido incremento e decremento delle concentrazioni sieriche, ed intensità dell'incremento stesso (1-100 volte la loro concentrazione sierica basale). Le moderate (Hp, AGP e Cp) invece sono caratterizzate da un incremento sierico più modesto (1-10 volte il livello basale) e da una maggiore lentezza nel raggiungimento del picco secretorio, così come del calo sierico (Cerón et al., 2005). L'utilità delle APPs in medicina canina è tale che ne viene consigliata in ambito clinico la misurazione routinaria, come parte integrante di ogni panel laboratoristico. Per incrementare il valore diagnostico e prognostico delle APPs si suggerisce di analizzare contemporaneamente almeno una APP positiva maggiore ed una moderata. Un esempio nel cane può essere rappresentato dalla CRP e dalla aptoglobulina (Cerón et al., 2008).

È importante ricordare che esistono sostanziali differenze nelle diverse specie, ed all'interno della stessa specie differenze legate alla razza ed all'età. La Proteina C-reattiva (CRP) infatti è una proteina di fase acuta maggiore nell'uomo, nel cane e nel suino. Nei ruminanti, invece, la concentrazione sierica di CRP difficilmente risulta alterata in corso di infezioni o infiammazioni. Al contrario, l'Aptoglobina (Hp) nei ruminati è una APP maggiore e presenta valori pressoché nulli nei soggetti sani, nel cane, è una APP moderata ed è

normalmente presente in circolo nei soggetti sani (Conner et al., 1988a; Conner et al., 1988b; Eckersall et al., 1996). Nel gatto sono state evidenziate alte concentrazioni di Sieroamiloide-A (SAA) in seguito ad uno stimolo infiammatorio e chirurgico; un aumento della Hp e della  $\alpha$ -glicoproteina acida (AGP) si ha, invece, in un secondo momento, tuttavia, la concentrazione della CRP non subisce variazioni significative durante la risposta di fase acuta in questa specie (Kajikawa et al., 1999). In cani sani di razza Beagle le concentrazioni di AGP sono risultate significativamente piu basse rispetto a quelle di cani meticci (Yuki et al, 2010). Nei Greyhound le concentrazioni di Hp e AGP risultano piu basse rispetto ai cani non-Greyhound (Couto et al, 2009). Non sono numerosi gli studi in letteratura riguardo l'influenza dell'eta sulle proteine di fase acuta. I cuccioli di eta inferiore ai 3 mesi hanno concentrazioni di AGP piu basse del 70% rispetto agli adulti, per poi raggiungere gradualmente le concentrazioni da adulto intorno ai 7 mesi d'eta (Yuki et al, 2010).



## *Proteina C reattiva (CRP)*

La CRP appartiene alla famiglia delle pentraxine ed è stata così nominata dai suoi scopritori, Tillet e Francis nel 1930, per la sua capacità di legare e precipitare il polisaccaride-C dello *Streptococcus Pneumoniae*. Ha un peso molecolare di circa 120 kD ed è costituita da 5 subunità di 20 kDa ciascuna (Kop & Weinstein, 2007). Analisi di microscopia elettronica hanno dimostrato che la CRP canina assomiglia a quella umana; la differenza principale è la glicosilazione di due delle cinque subunità di quella canina (Caspi et al., 1984; Eckersall & Conner, 1988). La diversa struttura chimica può spiegare, in parte, la difficoltà incontrata utilizzando anticorpi contro la proteina umana, nei test effettuati sul sangue canino (Parra et al., 2002). E' prodotta principalmente dal fegato ma anche da altre cellule (Eklund, 2009) ed è presente anche in condizioni normali nel plasma. Oltre alla produzione epatica, viene descritta una liberazione da parte delle placche aterosclerotiche, da tessuto vascolare linfociti e monociti (Kop & Weinstein, 2007). In particolare nelle placche la produzione avviene da parte delle cellule endoteliali, della muscolatura liscia e dai macrofagi. Inoltre viene prodotta da reni, neuroni, macrofagi alveolari e tessuto adiposo (Jialal & Devaraj, 2009). In conclusione, le sedi extraepatiche sono epitelio della ghiandola mammaria, condro e sinoviociti articolari, tessuto polmonare, intestino, adipociti, endometrio, leucociti e reni (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011). La secrezione è indotta principalmente da tre citokine: Interleukina 1 (IL-1), Interleukina 6 (IL-6) ed Interleukina 17 (IL-17), che è stata definita in tempi più recenti (Eklund, 2009). IL-6 è comunque il principale stimolo (Schwedler et al., 2006; Kop & Weinstein, 2007) sia in medicina umana che canina (Kjelgaard-Hansen, 2010).

Attualmente è la proteina di fase acuta di maggior interesse in Medicina Umana, in quanto principale marker di infezioni, patologie autoimmuni, traumi, malignità di processi neoplastici, necrosi ed infarto miocardico. Anche in

Medicina Veterinaria continua a suscitare interesse: è infatti dotata di elevata sensibilità nel rilevare uno stato infiammatorio, tuttavia risulta poco specifica; numerose patologie, infatti, possono dare un aumento di tale marker (Chan et al, 2009). La CRP si è rivelata negli anni un utile marker per il monitoraggio e la risposta alla terapia di numerose patologie, così come nello screening del benessere animale (Kao et al, 2006). E' stata definita come una primitiva forma di anticorpo atta ad interagire in modo aspecifico con i componenti delle membrane cellulari dei microrganismi ( Cerón et al, 2005). Oltre alla fagocitosi batterica, possiede altre importanti funzioni biologiche come l'induzione di altre citochine, l' inibizione della chemiotassi, la modulazione della funzione dei neutrofili e l' alta affinità per la cromatina del nucleo delle cellule danneggiate, pertanto può degradarne i componenti nucleari per facilitarne l'eliminazione (Robey et al., 1985; Mansfield et al., 2008; Cray et al., 2009).

La CRP è considerata una proteina principale della fase acuta nel cane, la sua concentrazione inizia ad aumentare dopo 4 ore dall'insulto, raggiungendo in circa 24-48 ore concentrazioni di 100 fino a 1000 volte il valore basale in base all'estensione del danno tissutale (Caspi et al., 1984), con un rapido decremento dopo l'esaurimento dello stimolo infiammatorio. In ambito clinico si è notato infatti che la CRP tipicamente diminuisce entro 24 ore dall'inizio di una terapia anti-infiammatoria efficace (Kjelgaard-Hansen, 2010).

## Metodiche di laboratorio

La valutazione della sua concentrazione sierica viene effettuata principalmente con “*immunoassays*”, usando anticorpi specifici contro la CRP canina. A questo scopo, sono stati sviluppati diversi modelli, tra cui una valutazione immunoturbidimetrica adattata per analizzatori biochimici automatici (Eckersall et al., 1991), ELISA (Rikihisa et al., 1994; Eckersall et al., 1989) e un “*slide/capillary reverse passive latex agglutination test*” (Yamamoto S. et al., 1994; Tagata K. et al., 1996). Per la valutazione della CRP nel sangue intero canino (Parra et al., 2005), nella saliva (Parra et al., 2005) e nei versamenti (Parra et al., 2004), si possono impiegare dei nuovi metodi basati su “*time-resolved immunofluorometric assays*” (TR-IFMAs) (Parra et al., 2006).

È stato realizzato un test ELISA validato per la specie canina (Tridelta Phase range canine CRP kit®, Tridelta Development Ltd., Brey, Ireland) ed un test immunoturbidimetrico ampiamente utilizzato in medicina umana per la misurazione della CRP umana (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O’Callaghan’s Mills, Ireland), che si è dimostrato correlarsi bene ( $r = 0.98$ ) con il test ELISA specifico per il cane. Come standard viene utilizzato un pool di plasma canino ad elevate concentrazioni di CRP, con misurazione determinata con il test ELISA. Il test immunoturbidimetrico è stato utilizzato in altri lavori sperimentali pubblicati (Martínez-Subiela & Cerón 2005, Caldin et al., 2009). Precedentemente era stato individuato un test policlonale per la CRP (Kjelgaard-Hansen & Stine, 2011). È stato prodotto un test rapido qualitativo, di tipo immunocromatografico, per la CRP canina (McGrotty et al., 2004), che permette di differenziare campioni con concentrazioni di CRP  $<5\text{mg/L}$  e  $>5\text{mg/L}$ . I risultati falsamente positivi sono il limite principale del test.

Infine è stato recentemente validato un test automatico immunoturbidimetrico specifico per la CRP canina (Hillström et al., 2014).

I fattori che influenzano la misurazione sono:

- lo stoccaggio: nonostante non siano numerosi gli studi in merito, la CRP canina come analita appare relativamente stabile a  $-10^{\circ}\text{C}$  per almeno 3 mesi (Riley & Zontine, 1972);
- gli anticoagulanti: i valori di CRP risultano significativamente inferiori se misurati su plasma citrato piuttosto che su siero (Martinez-Subiela & Cerón, 2005);
- emolisi, lipemia e bilirubinemia: se si utilizza una metodica “commerical solid phase sandwich immunoassay” la CRP subisce modificazioni significative nei campioni emolitici, con iperbilirubinemia o lipemici (Martinez-Subiela & Cerón, 2005). L'utilizzo, invece, di nuove metodiche “time-resolved immunofluorometric assays (TR-IFMAs)” permette di valutare corrette concentrazioni di CRP anche in campioni con emolisi, con iperbilirubinemia o ipertrigliceridemia (Parra & Cerón, 2007). Nonostante sia stato dimostrato che l'emolisi, la lipemia e l'iperbilirubinemia causano differenze statisticamente significative nei risultati ottenuti, la magnitudine di tali differenze è relativamente piccola e difficilmente può risultare clinicamente rilevante (Martinez-Subiela & Cerón, 2005). Solo la diminuzione di CRP in corso di emolisi misurata con metodiche immunoturbidimetriche può avere un impatto sull'interpretazione clinica (Cerón et al, 2005).

### ***Aptoglobina***

È stata descritta per la prima volta nel 1939 da Polonovski e collaboratori, l'Aptoglobina (Hp) canina è una  $\alpha_2$ -globulina con un peso molecolare approssimativamente di 81 kDa, ha una struttura a 2 catene  $\alpha\beta$ , legate tra loro da un legame non covalente (Petersen et al, 2004).

Sono state descritte diverse funzioni biologiche dell'Hp, tuttavia la principale è indubbiamente quella di legare le molecole di ferro formando dei complessi

stabili con l'emoglobina libera (Hb), rendendo il ferro inutilizzabile da parte dei batteri, quindi inibendo la proliferazione batterica. Il complesso Hp-Hb è veicolato al fegato attraverso il sistema reticolo-endoteliale e metabolizzato dalle cellule del Kupffer (Putnam, 1975). La Hp riduce anche la disponibilità di ferro per la produzione dei globuli rossi, ne consegue che in corso di infezione cronica si riscontra frequentemente anemia. È possibile identificare gli animali con gravi infezioni o infiammazioni misurando l'Hp. Altre funzioni biologiche della Hp sono: effetti batteriostatici, stimolazione dell'angiogenesi ed effetti immunomodulatori (Petersen et al, 2004). L'aptoglobina è una proteina della fase acuta positiva ed il suo incremento, associato ad una diminuzione della CRP, è stato definito e descritto come pattern ipercortisolemico del cane (Caldin et al., 2009).

Le tecniche di laboratorio per misurare la Hp sono essenzialmente di due tipi: metodiche spettrofotometriche, alcune delle quali sono basate sull'abilità della Hp di legare l'emoglobina formando un complesso Hp-Hb che o altera l'assorbanza caratteristica della Hb in proporzione alla concentrazione di Hp del campione oppure preserva l'attività della perossidasi ad uno specifico pH acido, la quale poi può essere rilevata e quantificata ( Cerón et al, 2005). È stata descritta e validata anche una metodica multispecie automatica spettrofotometrica basata sull'attività della perossidasi del complesso Hp-Hb, nel quale viene eliminata l'interferenza delle albumine sieriche. Metodiche immunologiche: per l'uso nella specie canina sono state validate tecniche nefelometriche, con le quali viene misurato il grado di precipitazione del complesso antigene-anticorpo. Questa metodica dipende dalla cross-reattività tra l'antisiero ricavato dalla Hp umana e la Hp canina, pertanto deve essere validato correttamente prima dell'uso (Cerón et al, 2005).

I fattori che ne influenzano la misurazione sono:

- lo stoccaggio: la Hp è più stabile su siero che non in preparazioni purificate (Parra et al, 2004), tuttavia è stata descritta una diminuzione delle

concentrazioni di Hp su siero canino stoccato a -20°C ed è stata proposta una temperatura di -70°C per stoccaggi prolungati (Weidmeyer & Solter, 1996);

- gli anticoagulanti: valori di Hp risultano significativamente maggiori quando si utilizza l'eparina come anticoagulante, tuttavia gli effetti degli anticoagulanti sulle concentrazioni delle APPs non hanno un'influenza rilevante sulla interpretazione clinica del dato (Martinez-Subiela & Cerón, 2005);

- emolisi, lipemia e bilirubinemia: presenza di emoglobina libera nel campione di sangue riduce drammaticamente la concentrazione misurata di Hp (Eckersall et al, 1999; Petersen et al, 2001). La diminuzione delle concentrazioni di Hp in corso di emolisi sia in vivo che in vitro risulta imponente e può avere un impatto significativo sull'interpretazione clinica del risultato (Cerón et al, 2005)

### ***Fibrinogeno***

Il Fibrinogeno (Fb) è una  $\beta$ -globulina presente nel plasma di tutti i vertebrati, svolge un ruolo essenziale nel processo coagulativo, viene infatti trasformato dalla trombina, tramite un processo di polimerizzazione, in fibrina necessaria alla formazione del trombo emostatico.

In Medicina Umana è una proteina di fase acuta (biomarker d'inflammation) (Ross, 1999) e l'aumento della sua concentrazione plasmatica rappresenta un marker di aterosclerosi subclinica, utile nell'identificare i soggetti con maggior rischio di sviluppare patologie cardiovascolari (Paramo et al, 2005). Il fibrinogeno è stato classificato come APP positiva moderata nel cane, pertanto le sue concentrazioni ematiche subiscono un aumento in seguito ad un insulto di tipo infiammatorio, continuando ad aumentare per diversi giorni. Il suo valore basale aumenta di circa 3-4 volte in seguito all'insulto, per poi rientrare a concentrazioni normali dopo circa 8 giorni (Conner et al, 1988b). Le concentrazioni di Fibrinogeno sono fortemente influenzate da numerose condizioni patologiche, è stato quindi proposto come indicatore non specifico di

infiammazione nel cane, tuttavia non possiede una sensibilità ed una specificità particolarmente elevate.

Le metodiche utilizzate per la misurazione del Fibrinogeno si basano sulla sua attività biologica, cioè sul grado di formazione di fibrina insolubile in presenza di eccesso di trombina (vedi Biomarker Coagulativi- Fibrinogeno, pagina 70).

### ***Albumina***

L'albumina, proteina plasmatica di 69.000 Dalton, costituisce il 35-50% di tutte le proteine del plasma di cani e gatti sani. Le albumine sono responsabili del 75% della pressione osmotica del plasma e rappresentano la maggior risorsa amminoacidica dell'organismo animale ( Cerón et al, 2005). L'albumina è una APP negativa nel cane, pertanto le sue concentrazioni ematiche diminuiscono in corso di risposta di fase acuta, tuttavia e fortemente influenzata da numerosi processi fisiopatologici, subendo importanti modificazioni che ne impediscono l'utilizzo come marker infiammatorio. Nella pratica routinaria, tale proteina viene generalmente misurata attraverso

l'elettroforesi sierica o metodiche spettrofotometriche con test colorimetrici come ad esempio il test con verde di bromocresolo. Quando il verde reagisce con l'albumina, si forma un complesso colorato, la cui assorbanza può essere misurata ed è proporzionale alla concentrazione di albumina del campione (Cerón et al, 2005).

## *Transferrina*

La transferrina è una glicoproteina plasmatica costituita da un'unica catena polipeptidica di circa 700 amminoacidi ed è responsabile del trasporto del ferro in circolo. Nel cane è considerata una proteina di fase acuta negativa. Nella pratica di routine viene dosata mediante test immunoturbidimetrici. Comunemente la capacità ferro legante totale (TIBC= Total Iron Binding Capacity) viene misurata addizionando il ferro esogeno al campione in esame e determinando la quantità di ferro che si è legata alla transferrina ( Cerón et al, 2005).Un aumento della TIBC talora può essere associata a deficienza di ferro, come tipico reperto dell'uomo, coniglio, maiale, cavallo e bovini. Nei cani con carenza di ferro solitamente è nella norma, se si eccettuano dei casi sperimentali in cani giovani (Harvey, 2008a).

La concentrazione sierica della TIBC può diminuire in caso di malnutrizione e/o infiammazione (Kovesdy, 2008) e diminuisce anche negli stati neoplastici (Robertson & Hutchison, 2009). In generale nelle malattie infiammatorie degli animali si presenta diminuita, oppure con valori tendenti al limite inferiore dell'intervallo di riferimento (Weiss, 2010). In alcuni animali la TIBC aumenta nel sovraccarico di ferro ed in cani con epatopatie croniche (Harvey, 2008a).

# CAPITOLO 4 – VALUTAZIONE DELLE PROTEINE DI FASE ACUTA IN CANI AVVELENATI DA RODENTICIDI ANTICOAGULANTI

## ABSTRACT

### C-REACTIVE PROTEIN IN DOGS AFFECTED BY ANTICOAGULANT RODENTICIDE INTOXICATION: A RETROSPECTIVE CASE-CONTROL STUDY

Senzolo M<sup>1,2</sup>, Gentilini F<sup>2</sup>, Zoia A<sup>1</sup>, Ceron J<sup>3</sup>, Caldin M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>San Marco Veterinary Clinic, Padova, Italy; <sup>2</sup>Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy; <sup>3</sup>University of Murcia, Murcia, Spain.

mara.senzolo@sanmarcovet.it

#### Introduction

Anticoagulant rodenticides (AR) inhibit vitamin K epoxide reductase stopping vitamin K recycling. This will cause depletion of active coagulation factors II-VII-IX-X potentially leading to spontaneous bleeding. The acute phase proteins have not been studied during AR intoxication in dogs. The aim of this study is to measure C-reactive protein (CRP) concentration in naturally acquired vitamin K antagonist toxicity in dogs and to investigate its diagnostic and prognostic value.

#### Methods

The electronic database at the San Marco Veterinary Clinic was searched for dogs diagnosed with AR poisoning (ie. dogs with prolonged coagulation times and individuation of the toxin by HPLC-MS) presented between January 2005 and January 2013. These dogs were included in group 0 (n=102). Two control populations of 102 randomly healthy (group 1) and sick (group 2) dogs were created and matched to group 0 for age, sex (including neutered status), and breed. All dogs had a complete clinical record including history, physical examination, CBC, serum biochemical profile, urinalysis, and a clotting profile (PT, aPTT, antithrombin %, fibrinogen, FDP's and D-dimers concentration). Serum CRP concentration was measured using an immunoturbidimetric assay validated in dogs. Normality of data was assessed by the Shapiro-Wilk test. Difference in CRP values between the 3 groups were analyzed by Kruskal-Wallis test and post-hoc analyses performed with a Bonferroni test. CRP was also studied as a prognostic factor evaluating survival at 30-days post-diagnosis in group 0 by a Pearson's chi-squared test. Evaluation of CRP concentration between survivors and non-survivors was performed by Mann-Whitney test. For all statistical analyses the level of significance was set as  $p < 0.05$ .

#### Results

The prevalence of AR intoxication at the San Marco Veterinary Clinic was 0.28%. Of the 102 poisoned dogs 68 were female (45 entire, 23 neutered) and 34 male (30 entire, 4 neutered). Median age at presentation was 37 months (range: 29 to 48). In group 0, at the time of presentation 6 dogs had no evidence of external or internal bleeding, 43 had external bleeding, 35 had internal bleeding, and 18 had external and internal bleeding. CRP concentration was significantly ( $p < 0.001$ ) higher in group 0 (median, 4.77 mg/dl; range, 0.01 to 19.85 mg/dl) versus group 1 (median, 0.02 mg/dl; range, 0.01 to 0.08 mg/dl) and group 2 (median, 0.37 mg/dl; range, 0.01 to 41.23 mg/dl). Within group 0 only 7 dogs had CRP within the reference range (0.01 to 0.22mg/dl), none of them had evidence of internal bleeding. No difference in mortality was present between groups 0 and 2 ( $p = 0.12$ ). In group 0, CRP concentration was higher in non survivors vs survivors ( $p = 0.04$ ).

#### Discussion

The inflammatory process associated with hemorrhage, above all if internal, is probably responsible for the higher CRP concentration in these dogs compared to healthy and sick animals presented for any other diseases.

#### Conclusion

CRP may be a useful diagnostic and prognostic marker in dogs with AR intoxication. Its prognostic value would warrant further study.

## **4.1 Introduzione allo studio e Obiettivi dello studio**

In Medicina Umana l'utilizzo della proteina C reattiva nella diagnosi e nel monitoraggio di patologie emorragiche è sovente in uso.

Per citare alcuni esempi significativi, in una recente pubblicazione in pazienti con emorragia spontanea cerebrale un valore di CRP > 10 mg/L è predittivo di una formazione precoce di ematoma (EHG) e di degenerazione neuronale precoce (ENW), entrambi eventi patologici associati ad alta mortalità, gli Autori decretano che l'infiammazione può essere importante nel contribuire alla formazione dell'EHG (Di Napoli et al., 2013). In un'altro studio nei pazienti sottoposti a polipectomia per via colonscopica alti livelli di CRP possono indicare una ritardata emorragia post polipectomia e sembra esserci una diretta relazione tra elevati valori di CRP ed elevato rischio di emorragia (Wu et al., 2012).

Per quanto riguarda l'evento patologico oggetto di studio, non si rinvengono a conoscenza dell'Autore pubblicazioni che trattino la relazione tra avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti nel cane ed APPs. Le proteine di fase acuta (APP's) non sono mai state valutate in corso di avvelamento da rodenticidi anticoagulanti.

Lo studio si propone di studiare il comportamento delle proteine di fase acuta e nello specifico della proteina C reattiva in cani intossicati accidentalmente con rodenticidi anticoagulanti in relazione ai segni clinici emorragici e determinare il valore prognostico della proteina C reattiva.

## 4.2 Materiali e metodi

### 4.2.1 Database

Tutti i dati sono stati estrapolati dall'archivio informativo della Clinica Veterinaria San Marco di Padova (P.O.A. - System 6.0© e segg., software per ambulatori e cliniche veterinarie, Ing. L.Coppola, Mestre-Venezia).

Sono state selezionate 102 schede cliniche con diagnosi di avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti, le quali erano comprensive di segnalamento, anamnesi, segni clinici, esami laboratoristici (almeno un esame coagulativo ed un profilo biochimico, esame tossicologico positivo per rodenticidi anticoagulanti). Ognuna di queste schede identifica in modo inequivocabile un soggetto di specie canina di proprietà portati a visita presso la Clinica in un periodo compreso tra gennaio 2005 e gennaio 2013. Questi soggetti sono stati inclusi nel gruppo 0. Sono state quindi create due popolazioni di controllo casuali di pari consistenza numerica ma selezionate in seguito a rigoroso cross match di età, sesso e condizione sessuale ed appartenenza ad una razza. La prima popolazione è costituita da cani sani (gruppo 1), la seconda popolazione di cani malati di altre patologie (gruppo 2), entrambe rappresentate da soggetti di specie canina afferiti alla Clinica.

<b>SOGGETTI</b>	<b>GRUPPO</b>	<b>NUMERO CASI</b>
Cani avvelenati da rodenticidi	0	102
Cani sani crossmatch di razza 75,5%, di sesso e condizione sessuale 100%, di età (+/- 12 mesi) 100%	1	102
Cani ammalati crossmatch di razza 98%, di sesso e condizione sessuale 100%, di età (+/- 12 mesi) 100%	2	102

**Tabella 3:** *Popolazione di studio e di controllo.*

#### **4.2.2 Raccolta campioni**

La raccolta dei campioni di sangue per le analisi laboratoristiche di questo studio è stata sempre effettuata da un medico veterinario della clinica per evitare problemi pre-analitici. Dai pazienti si è scelto di prelevare dalla vena safena, solo in soggetti estremamente compromessi dalla vena giugulare, dopo appropriata rasatura, disinfezione dell'arto e compressione emostatica post prelievo.

Il sangue destinato alla determinazione di CRP, Albumina, Aptoglobina, Transferrina è stato posto in una provetta "Vacuette" (sistema sottovuoto) della Greiner bio-one contenente un attivatore della coagulazione (Z Serum Clot Activator). I campioni coagulativi sono stati messi in una provetta "Vacuette" (sistema sottovuoto) della Greiner bio-one contenente citrato di sodio 0.109 M al 3.2%, rispettando il rapporto sangue/anticoagulante indicato nella provetta (9:1). Le provette sono state delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto contatto tra la sostanza procoagulante depositata sulla parete della provetta ed il sangue. Dopo alcuni minuti di stazionamento in verticale, le provette sono state sottoposte a centrifugazione (1500 g per 5 minuti), al termine della quale la parte sierica o plasmatica del campione veniva separata utilizzando delle pipette in plastica tipo "pasteur" e posta su contenitori barcodati idonei alla processazione. Queste operazioni sono state eseguite dal personale medico o da tecnici qualificati del Laboratorio San Marco. Tutti i campioni sono stati separati entro trenta minuti dalla raccolta del campione; durante l'orario diurno la processazione è stata effettuata entro un'ora mentre i campioni provenienti da emergenze notturne venivano conservati, dopo separazione, in frigorifero a temperatura di 4 gradi centigradi per il siero ed a temperatura ambiente per il plasma; successivamente analizzati entro un tempo massimo di 8 ore.

### 4.2.3 Strumentazione e Metodica

Per la determinazione delle proteine di fase acuta: proteina C reattiva (CRP), Aptoglobina (Hpt), Albumina (Alb) e Transferrina (TIBC) si è utilizzato un analizzatore chimico-clinico random access automatizzato (Olympus AU 2700) distribuito dalla Beckman Coulter. Dal 2008 il profilo è stato integrato da una valutazione fotometrica semiquantitativa degli interferenti (lipemia, ittero ed emolisi). La determinazione del fibrinogeno è stata ottenuta mediante un coagulometro random access multiparametrico automatico STA COMPACT – 2 TM (Diagnostica STAGO®, Albio, France). Tale strumento utilizza una metodica meccanica per la formazione fibrinica.

#### CRP

La CRP è stata misurata in mg/dL con metodo immunoturbidimetrico di uso umano (OSR6147, Olympus Life and Material Science Europe GmbH) che si è dimostrato correlarsi bene ( $r = 0.98$ ) con il test ELISA specifico per il cane (Martínez-Subiela & Cerón 2005, Caldin et al., 2009). Il campione di siero (15 microlitri) viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, la CRP reagisce in modo specifico con anticorpi anti-CRP umana dando origine ad aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

#### Aptoglobina

L'Aptoglobina è stata misurata in mg/dL con metodo immunoturbidimetrico di uso umano (OSR6165, Olympus Life and Material Science Europe GmbH). Il campione di siero (1,6 microlitri) viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, l' aptoglobina reagisce in modo specifico con anticorpi anti aptoglobina dando origine ad aggregati insolubili, la loro assorbanza è proporzionale alla concentrazione di Hp.

### Albumina

L'Albumina è stata misurata in g/dL con test colorimetrico di uso umano (OSR6202, Olympus Life and Material Science Europe GmbH).

Il campione di siero (1,6 microlitri) reagisce con il verde di bromocresolo ad un pH di 4.2 e si forma un complesso colorato. L'assorbanza di tale complesso viene misurata bicromaticamente (600-800nm) ed è proporzionale alla concentrazione di albumina nel campione.

### Transferrina

La transferrina è stata misurata in  $\mu\text{g/dL}$  con metodo immunoturbidimetrico di uso umano (OSR6152, Olympus Life and Material Science Europe GmbH). Il campione di siero (18 microlitri) viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, la transferrina reagisce in modo specifico con anticorpi anti transferrina dando origine ad aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di transferrina nel campione.

### Fibrinogeno

Il Fibrinogeno è stato misurato in mg/dL utilizzando un kit commerciale (STA-Fibrinogen Diagnostica Stago). La procedura consiste nel mettere 100  $\mu\text{l}$  di plasma prediluito in rapporto 1:20 (100  $\mu\text{l}$  di plasma + 1900  $\mu\text{l}$  di tampone) in una provetta preriscaldata a 37°C, e sottoposta ad incubazione per 3 minuti a 37°C. Successivamente si aggiungono 50  $\mu\text{l}$  di reagente del Fibrinogeno (Trombina umana >70 unità NIH/ml, liofilizzata) e viene misurato il tempo di coagulazione con metodo cronometrico. Per ogni determinazione, i risultati in secondi vengono convertiti automaticamente in mg/dl utilizzando una curva standard.

#### 4.2.4 Statistica

La valutazione della normalità è stata eseguita mediante test di Shapiro-Wilk. Nella variabile normale (albumina) è stato usato il One Way Anova con post hoc il test di Tuckey. Nelle variabili anormali (CRP, Hp, Fib eTIBC) è stato usato il test di Kruskall Wallis con post hoc il test di Bonferroni.

Nei confronti a due (data l'anormalità della CRP) è stato utilizzato il test di Mann-Whitney. Al fine di studiare la CRP come fattore prognostico, valutando cioè la sopravvivenza a 30 giorni dalla diagnosi in ingresso, è stato utilizzato il test di Pearson  $X^2$ .

Inoltre sono state utilizzate le Receiver Operating Characteristic curves (curve di ROC) per valutare sensibilità e specificità del valore diagnostico ed il valore predittivo della CRP nell'avvelenamento da rodenticidi nel cane.

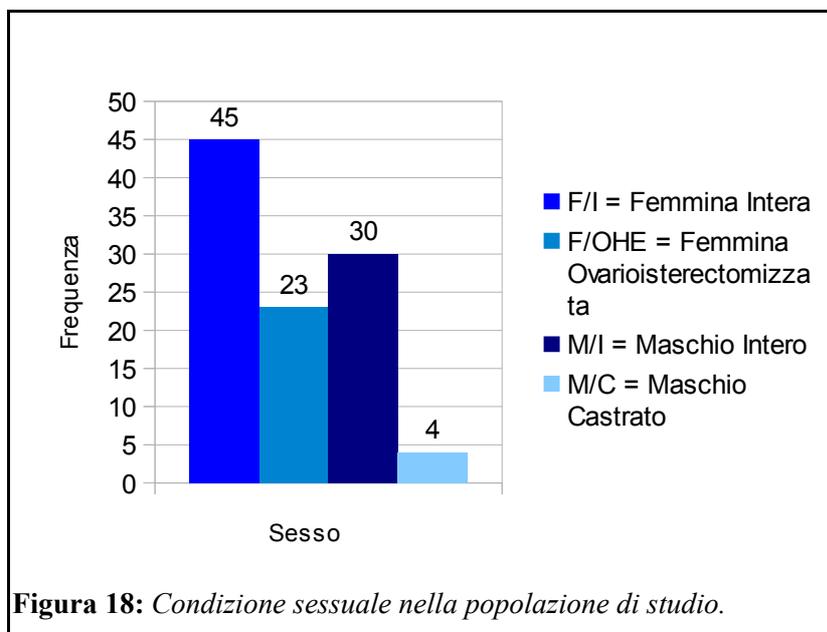
La significatività è stata settata per valori di  $p < 0.05$ .

Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software Analyse-it©, v 2.21 Excel 12+.

## 4.3 Risultati

### Sesso

Il gruppo 0 è risultato essere costituito da 68 femmine, di cui 45 intere e 23 sterilizzate e 34 maschi, dei quali 30 interi e 4 castrati.



### Età

In relazione all'età si osserva la presenza di cani di età compresa tra 2 mesi e 153, con una mediana di 37 mesi con intervallo di confidenza da 29 a 48 mesi e una media di 47.6 mesi con una deviazione standard di 37.7 mesi.

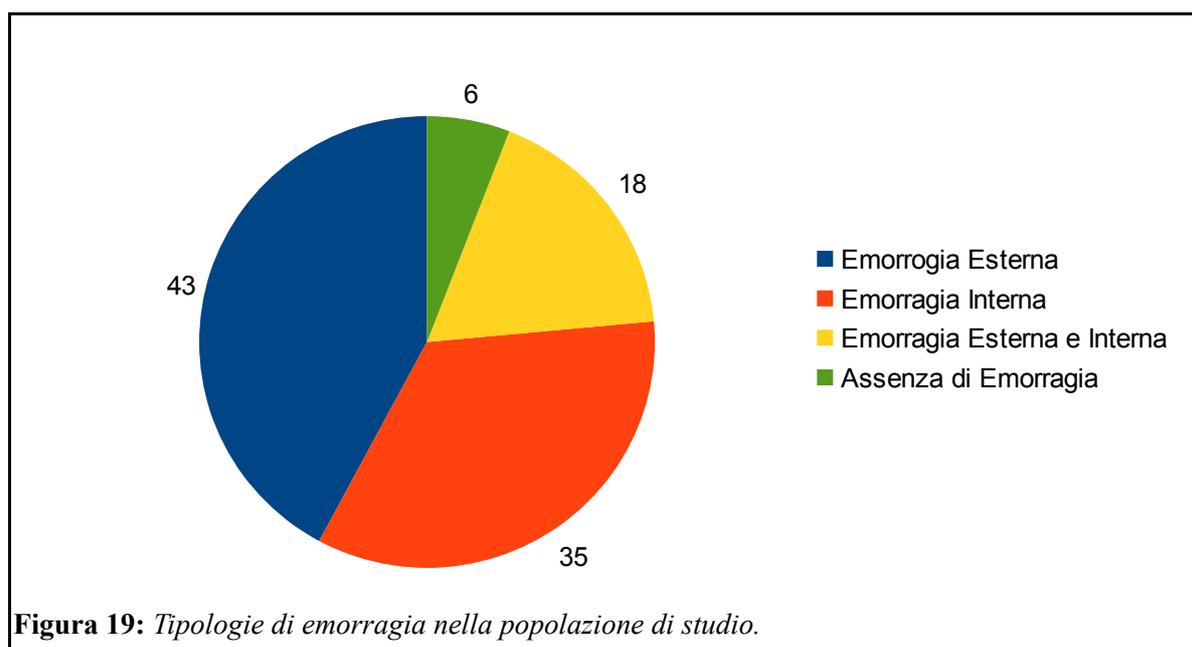
### Razza

Non è stata riscontrata una razza predisposta, il meticcio è maggiormente rappresentato perchè è la razza che ha una frequenza maggiore di presentazione in Clinica.

## Segni clinici

All'interno del gruppo 0 sono stati esaminati i segni clinici presentati dai pazienti in sede di prima esame clinico e contemporanei alla raccolta dei campioni ematici e sono stati suddivisi in:

- Assenza di emorragia rilevabile;
- Emorragia esterna rilevata;
- Emorragia interna rilevata.



Dei 102 soggetti: 6 cani non presentavano evidenze di emorragie né esterne né interne, 43 cani avevano emorragie esterne visibili, in 35 cani sono state rilevate emorragie interne (con diagnostica collaterale di ecografia/radiografia/tomografia computerizzata), in 18 soggetti si identificava un'emorragia sia interna che esterna concomitante.

I 6 soggetti senza evidenza di emorragie sono stati portati per sintomatologia aspecifica: abbattimento (4), disappetenza (3), tremori (2), vomito (1), zoppia (1), cifosi (1). Tre di questi avevano in anamnesi un sospetto di ingestione.

<b>EMORRAGIA ESTERNA (segni clinici)</b>	<b>CASI %</b>
Mucose pallide	56
Letargia	55
Dispnea	39
Anoressia	26
Ematomi sottocutanei	18
Tosse	10
Ematemesi	10
Sanguinamento bucale	8
Emottisi	7
Epistassi	7
Vomito (senza sangue)	7
Sanguinamento vulvare	6
Dolorabilità addominale	5
Ematochezia	5
Ematuria	4
Emorragia sclerale	4
Ecchimosi	3
Ipotermia	3

**Tabella 4:** Segni clinici di emorragia esterna in percentuale di presentazione.

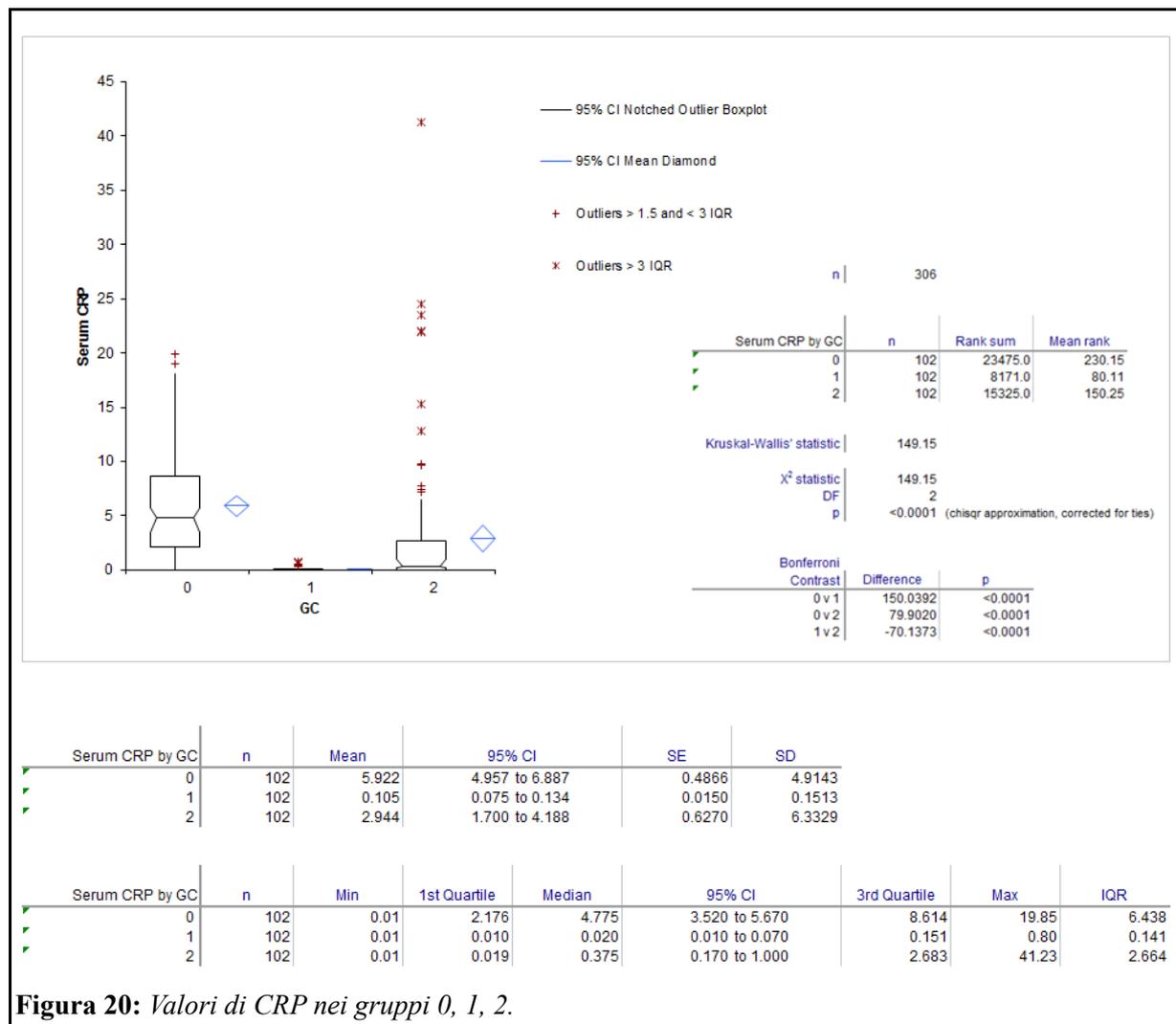
<b>EMORRAGIA INTERNA (segni clinici)</b>	<b>CASI %</b>
Emotorace	24
Emoaddome	11
Pattern alveolare	5
Versamento pericardico emorragico	4
Emorragie spinali (snc)	3

**Tabella 5:** Segni clinici di emorragia interna in percentuale di presentazione.

## Biomarker d'infiammazione

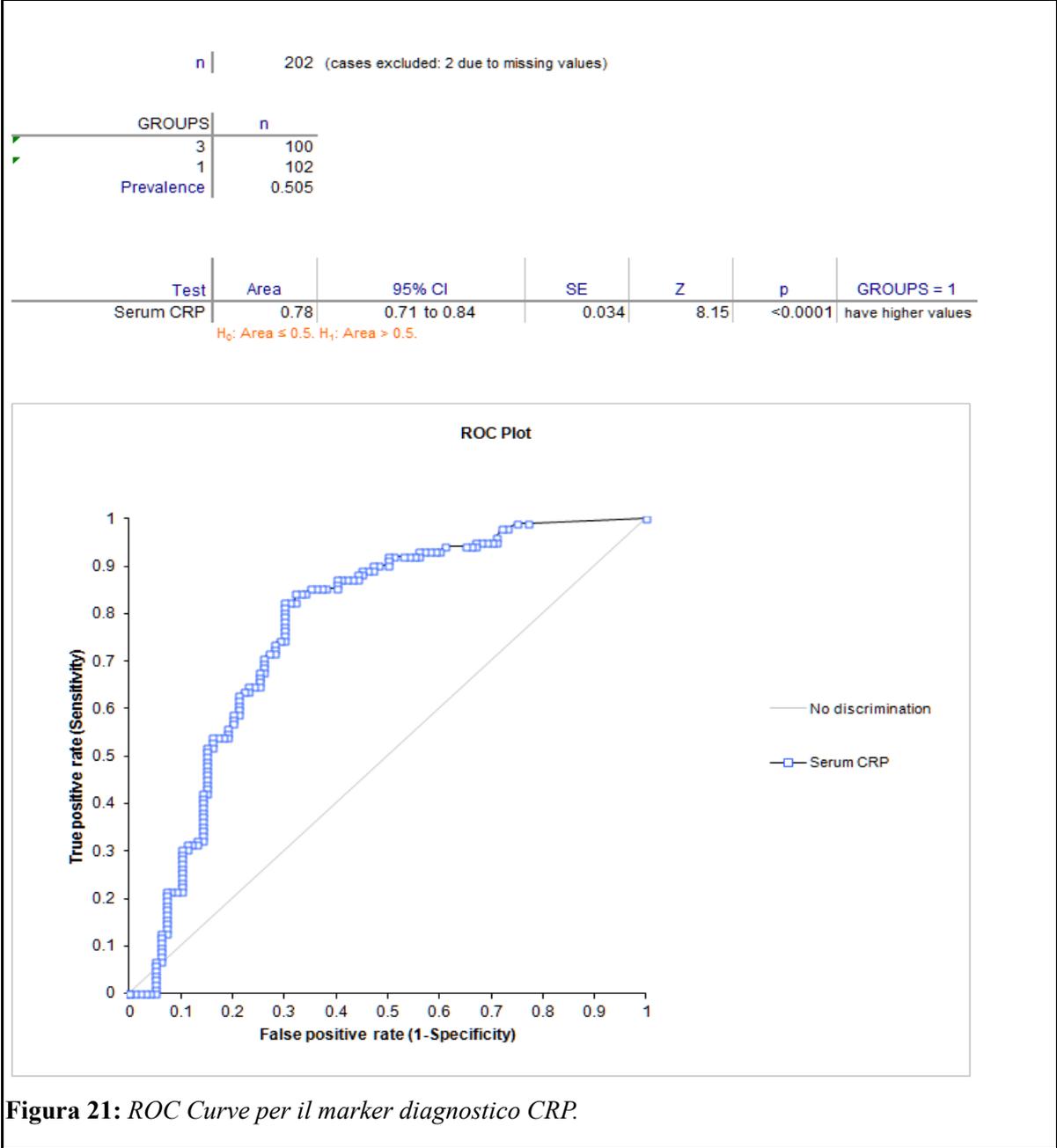
### CRP

I valori di CRP dei soggetti del gruppo 0 variano da un minimo di 0.01 mg/dL ad un massimo di 19.85 mg/dL, con una mediana di 4.77 mg/dL. I soggetti del gruppo 1 presentavano valori di CRP all'interno del range di riferimento del laboratorio (0.01-0.22 mg/dL) con un minimo di 0.01mg/dL ed un massimo di 0.08 mg/dL ed una mediana di 0.02 mg/dL.



La concentrazione di CRP nei soggetti avvelenati appartenenti al gruppo 0 è risultata essere significativamente ( $p < 0.0001$ ) più alta rispetto ai soggetti malati del gruppo 2, i cui valori variano da un minimo di 0.01 mg/dL ad un massimo di 41.23 mg/dL, con una mediana di 0.37 mg/dL.

La ROC curve mostra che il test CRP ha un'accuratezza diagnostica del 78% nel diagnosticare i pazienti avvelenati da rodenticidi anticoagulanti.



**Figura 21:** ROC Curve per il marker diagnostico CRP.

## Aptoglobina

È stato possibile effettuare l'analisi in 89 soggetti appartenenti al gruppo 0, 1, 2. Il gruppo 0 presentava un valore massimo di 392 mg/dL con una mediana di 90 mg/dL; il gruppo dei soggetti malati, gruppo 2, presentava un valore massimo di 381 mg/dL ed una mediana di 86 mg/dL. Il confronto tra i due gruppi non ha rilevato differenze statisticamente significative ( $p=1.0$ ).

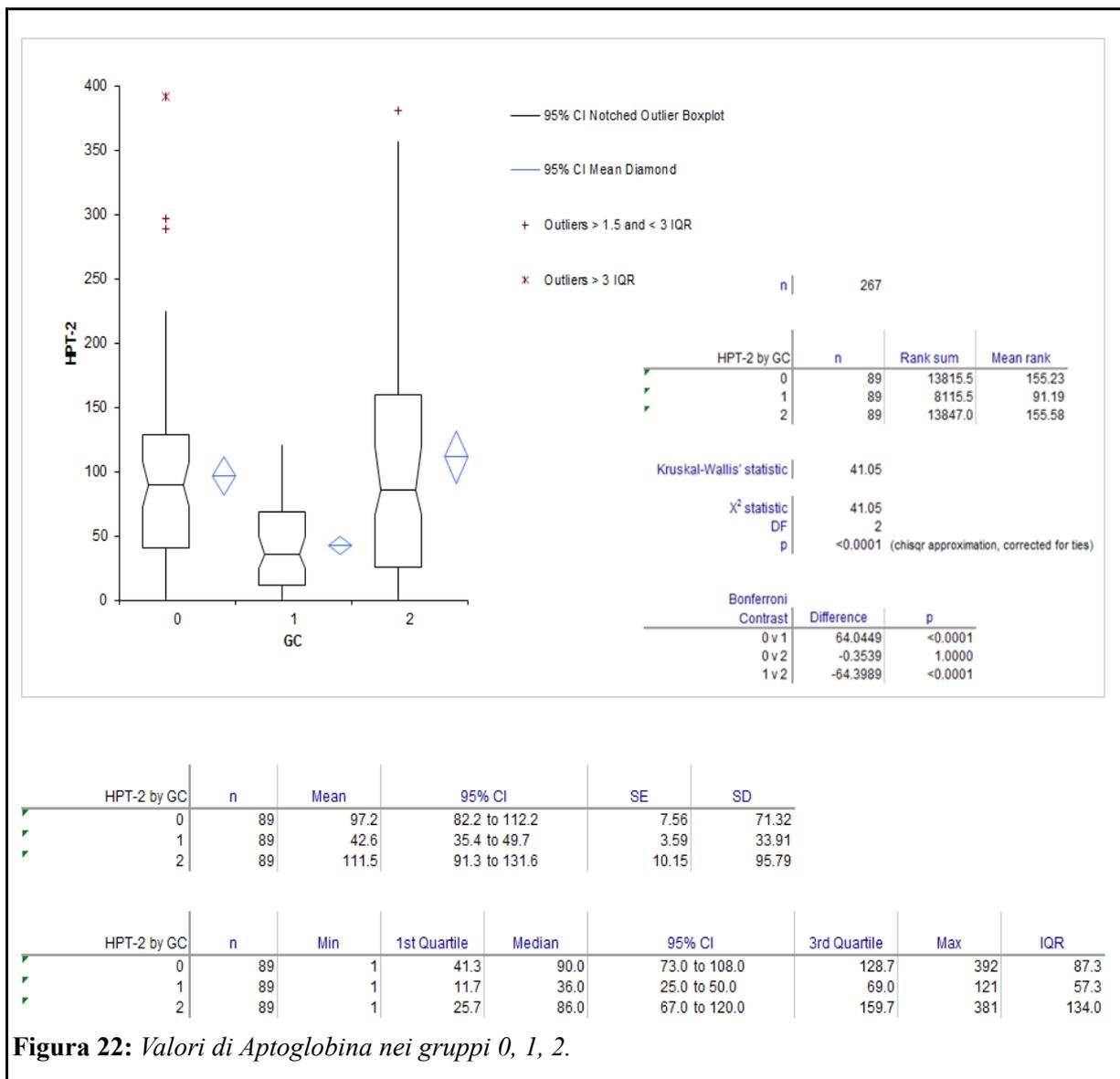


Figura 22: Valori di Aptoglobina nei gruppi 0, 1, 2.

## Albumina

È stato stato possibile effettuare l'analisi in 89 soggetti appartenenti al gruppo 0, 1, 2. Il gruppo 0 mostrava un valore minimo di albumina sierica di 1.9 g/dL con una media di 2.72 g /dL. Questi valori sono risultati statisticamente inferiori sia rispetto al gruppo dei sani (gruppo1) sia al gruppo dei malati (gruppo 2).

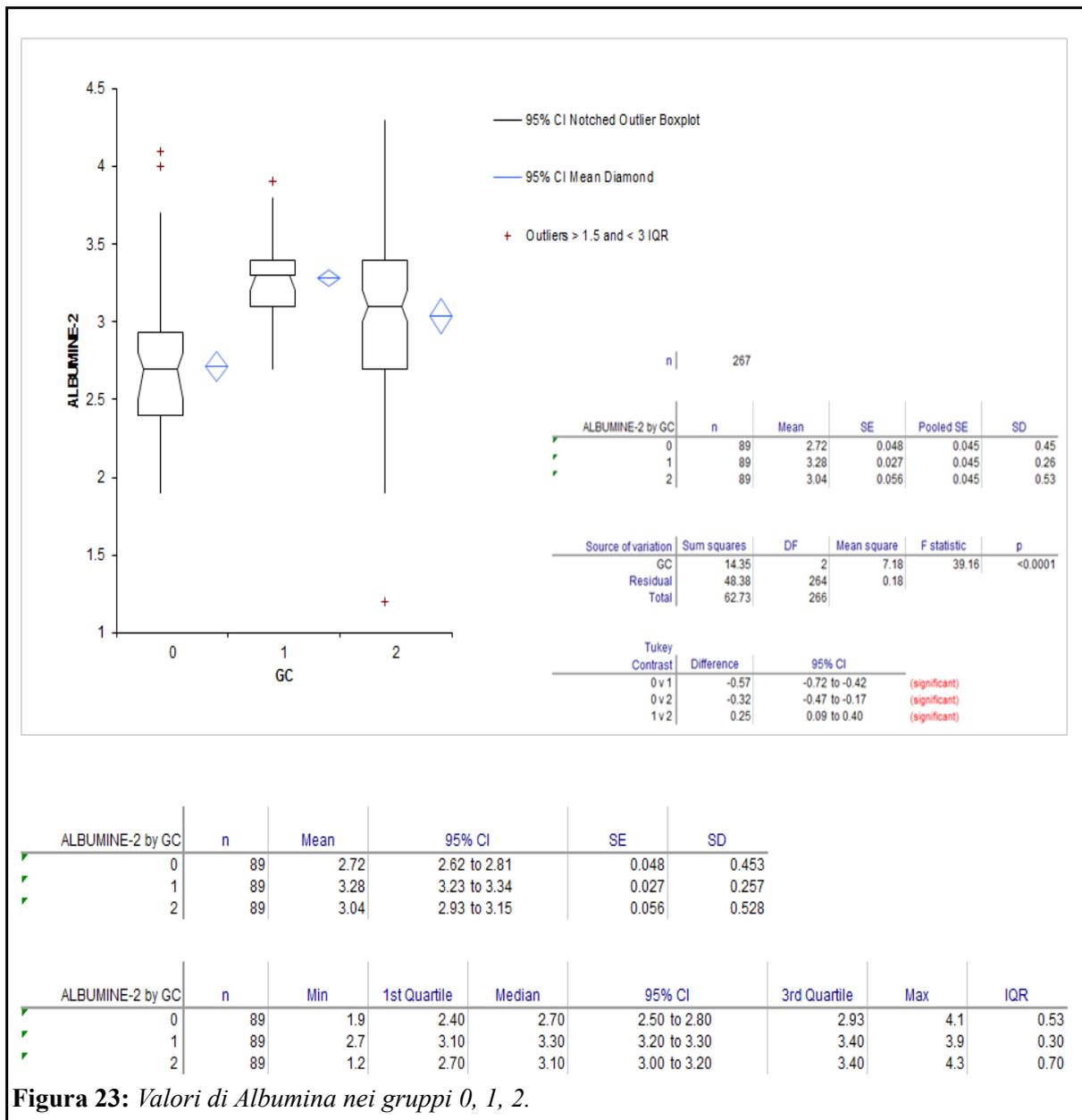


Figura 23: Valori di Albumina nei gruppi 0, 1, 2.

## TIBC

È stato possibile effettuare l'analisi in 89 soggetti appartenenti al gruppo 0, 1, 2.

Il gruppo 0 presentava un valore minimo di TIBC di 110 $\mu$ g/dl con una mediana di 297 $\mu$ g/dl. Questi valori sono risultati statisticamente inferiori sia rispetto al gruppo dei sani (gruppo 1) sia a quello dei malati (gruppo 2).

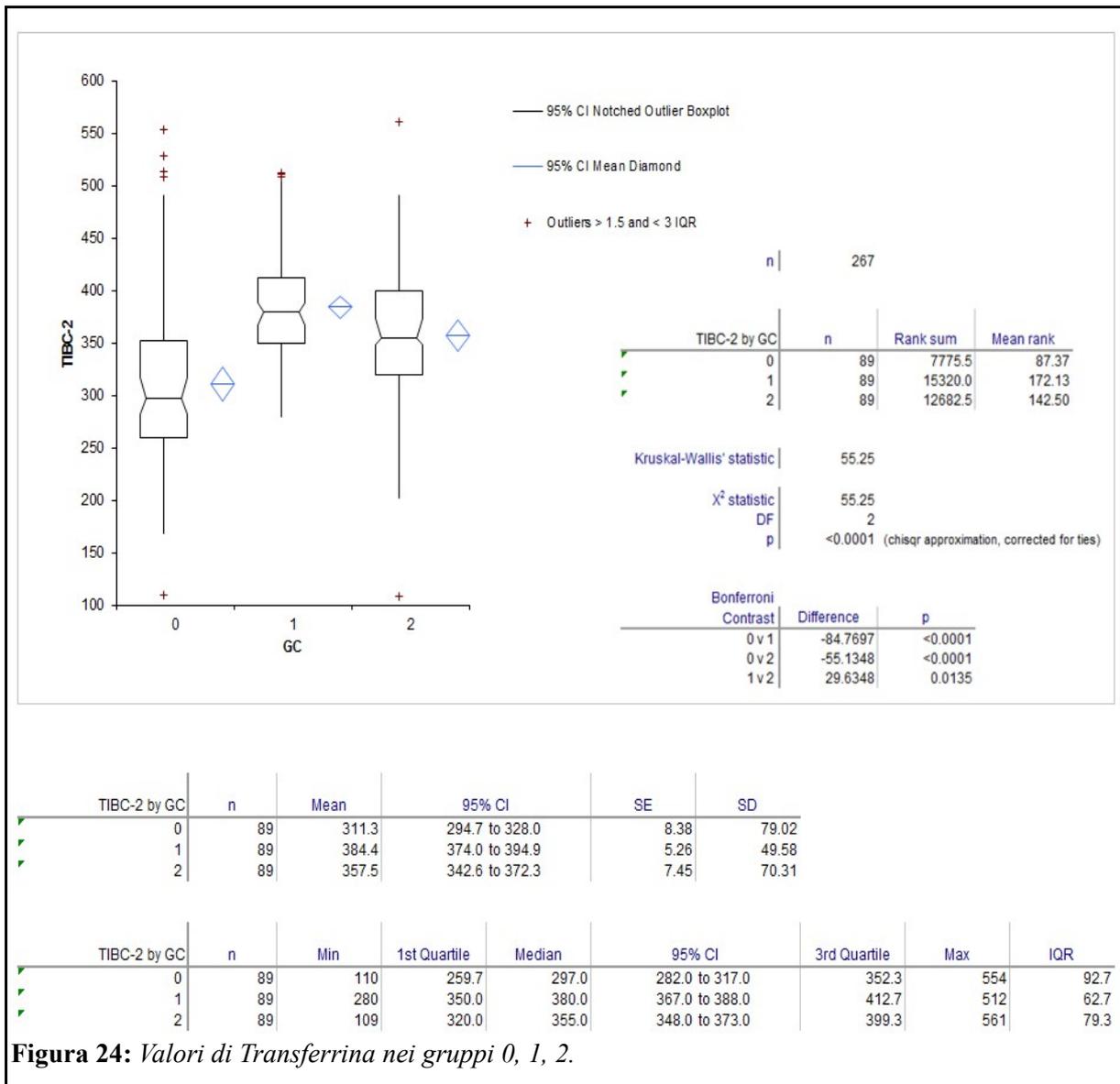


Figura 24: Valori di Transferrina nei gruppi 0, 1, 2.

## Fibrinogeno

È stato possibile effettuare l'analisi in 89 soggetti appartenenti al gruppo 0, 1, 2.

Il gruppo 0 presentava un valore minimo di 144 mg/dL ed un massimo di 554 mg/dL, con una mediana di 413 mg/dL, statisticamente ( $p < 0.0001$ ) maggiore rispetto alle concentrazioni misurate nel gruppo dei soggetti malati, gruppo 2.

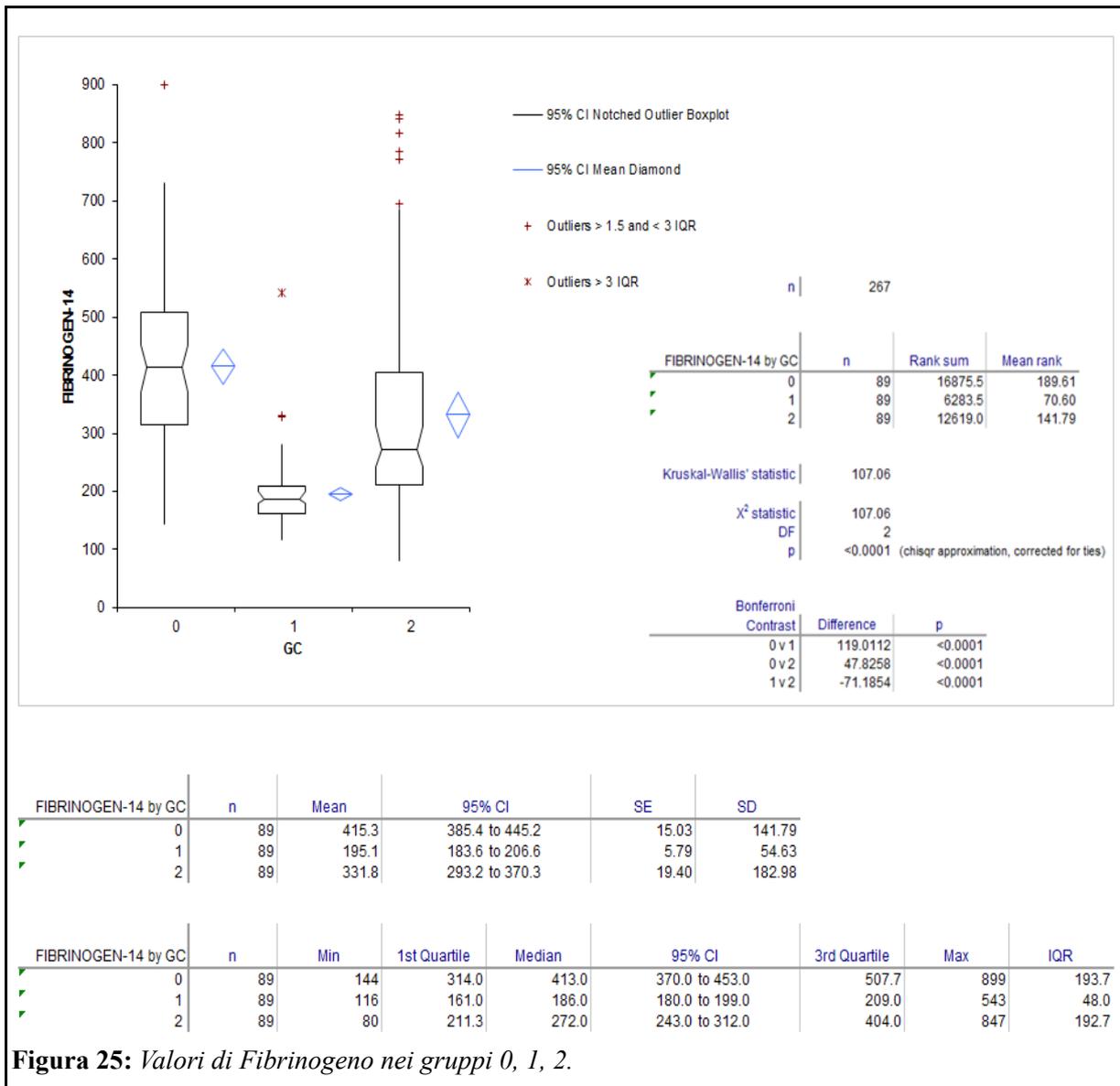
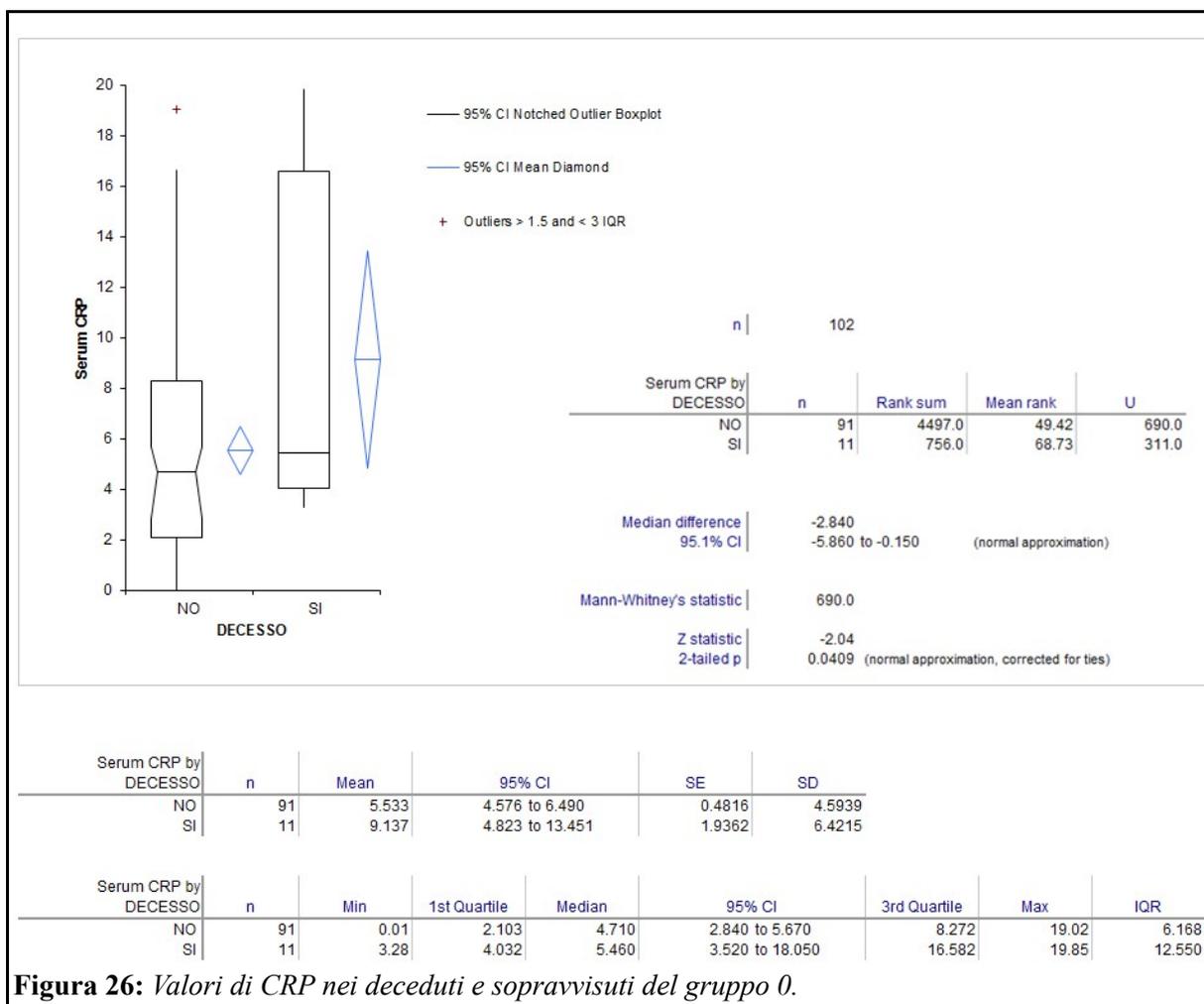


Figura 25: Valori di Fibrinogeno nei gruppi 0, 1, 2.

## Mortalità

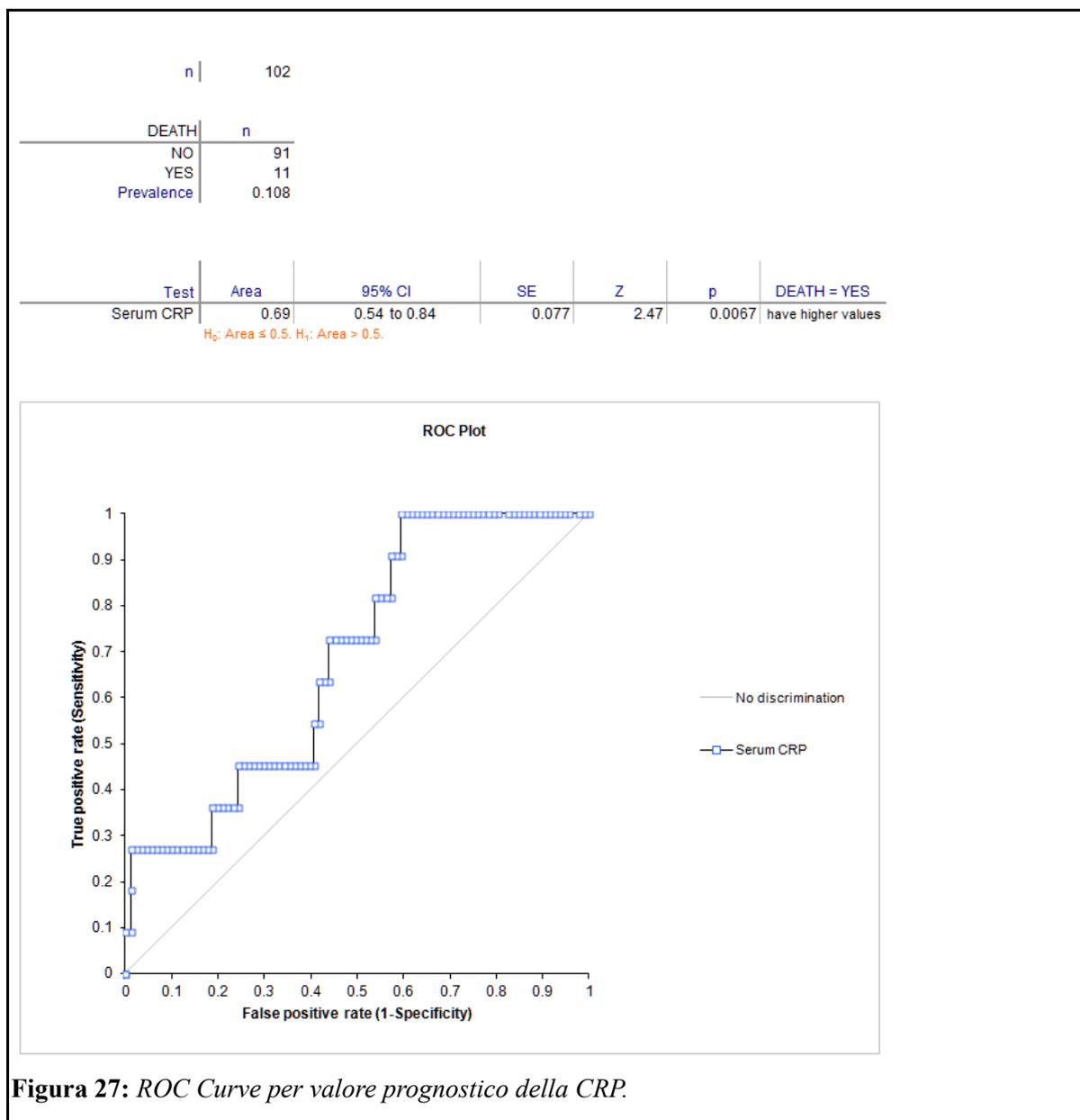
Non è stata rilevata una differenza di mortalità statisticamente significativa ( $p=0.12$ ) tra il gruppo 0 di cani avvelenati ed il gruppo 2 di cani malati di controllo.

Nel gruppo 0 la concentrazione di CRP è risultata più alta nei deceduti rispetto ai sopravvissuti ( $p=0.04$ ).



**Figura 26:** Valori di CRP nei deceduti e sopravvissuti del gruppo 0.

Il confronto per quanto riguarda la mortalità è stato eseguito solo tra due popolazioni (gruppo 0 e gruppo 2) affinché potesse essere più realistico il valore prognostico della CRP, che è il 69%.



**Figura 27:** ROC Curve per valore prognostico della CRP.

#### 4.4 Discussione

La CRP è molto più elevata nel gruppo 0 rispetto al gruppo 1 e 2 di controllo. Ciò risulta probabilmente ascrivibile all'infiammazione secondaria agli eventi emorragici ed ossidativi conseguenti. Inoltre all'interno del gruppo 0 i soggetti con emorragia interna hanno valori di CRP più alti rispetto a quelli con emorragia esterna.

I 7 soggetti, i cui valori di CRP sono nella norma, sono stati portati a visita con sintomatologia di sanguinamenti esterni (emorragia sclerale, ematoma, epistassi) e per sospetta ingestione di tossico o perchè conviventi con un cane già diagnosticato.

Valori di CRP normali sono associati a paziente scarsamente sintomatici o perchè non ancora emorragici o perchè l'emorragia è talmente recente che non ha consentito l'aumento della CRP sierica.

Per quanto concerne gli altri biomarker è interessante notare come l'aptoglobina, non esprima un'incremento della sua concentrazione, come ci si dovrebbe aspettare considerandola una proteina della fase acuta positiva soprattutto in relazione anche all'aumento del fibrinogeno che normalmente ha un incremento più tardivo. L'emolisi e l'emorragia dei pazienti appartenenti al gruppo 0 giocano un ruolo importante e sono il fattore confondente dell'interpretazione di questa proteina. Il fibrinogeno non risente dell'influenza del sanguinamento e si esprime pienamente come proteina di fase acuta positiva. L'albumina e la transferrina si comportano come proteine di fase acuta negativa: all'aumentare di valori di flogosi diminuiscono le loro concentrazioni, inoltre c'è anche da considerare un fattore diluzionale nei soggetti emorragici ed ipovolemici.

I soggetti deceduti 11/102 nel gruppo 0 e 8/102 nel gruppo 2 non rappresentano dati statisticamente significativi per asserire che in senso lato una concentrazione di Crp elevata al momento della diagnosi si associa ad un maggiore rischio di decesso, al contrario all'interno del gruppo 0, i valori di CRP più elevati sono associati ad una più alta mortalità. Inoltre 9 di questi 11 soggetti si concentrano nella prima metà temporale dello studio, questo forse sta a significare una maggiore attenzione e disponibilità a curare l'animale domestico via via crescente negli ultimi anni. Inoltre tutti i deceduti del gruppo 0 presentano in anamnesi segni clinici trascurati dal proprietario e talvolta mal interpretati e gestiti dal veterinario curante. L'avvelenamento da rodenticidi è potenzialmente mortale, infatti 9 soggetti sono deceduti primariamente per l'avvelenamento mentre gli altri 3 soggetti presentavano gravi patologie concomitanti (chetoacidosi diabetica, setticemia ed endocardite, complicazioni post laparotomiche). Un corretto approccio sia del proprietario sia del medico veterinario può prevenire un'evoluzione fatale e garantire un buon outcome. Il clinico con il valore aggiunto derivante dalla concentrazione di CRP può ritenere opportuno richiedere approfondimenti o pronunciarsi sulla severità dell' evento emorragico in atto. Concludendo l'uso della CRP rappresenta un ausilio diagnostico insieme ai test di PT ed aPTT, grazie al quale il clinico può ritenere opportuno eseguire altri approfondimenti diagnostici per esplorare le sedi di emorragie cavitare e stimare la gravità dell'evento emorragico in atto, di conseguenza emettere anche un giudizio prognostico.

## **PARTE TERZA – I BIOMARKER COAGULATIVI E TERAPIA NEI RODENTICIDI ANTICOAGULANTI**

Nei seguenti capitoli verrà trattata sinteticamente la fisiopatologia del processo emostatico, i cui biomarker possono assumere un ruolo diagnostico ed essere utilizzati nel monitoraggio terapeutico dei pazienti avvelenati da rodenticidi anticoagulanti. Verrà inoltre affrontato il ruolo antidotico della vitamina k nel management clinico di questi soggetti.

### **CAPITOLO 5 – BIOMARKER COAGULATIVI**

#### **5.1 Processo emostatico**

L'emostasi è la risultante di una serie di processi molto complessi e finemente regolati con l'obiettivo di mantenere il sangue ad uno stato fluido da una parte, e di realizzarne la trasformazione in coagulo (trombo o tappo emostatico) laddove la noxa patogena lo richieda (contenimento della diffusione delle infezioni). È regolata da tre componenti: la parete vascolare, le piastrine ed i fattori plasmatici della cascata coagulativa.

Gli eventi dell'emostasi, riassunti brevemente, sono:

- Vasocostrizione arteriolare transitoria a seguito della lesione iniziale; è data dai meccanismi riflessi neurogeni e sostenuta dalla secrezione locale di sostanze come l'endotelina (potente vasocostrittore di origine endoteliale).
- Emostasi primaria: grazie all'esposizione della matrice extracellulare sub endoteliale, le piastrine vi aderiscono e si attivano, modificando la loro forma e rilasciando le sostanze contenute negli  $\alpha$ -granuli; queste richiamano altre piastrine (aggregazione) per formare un tappo emostatico.

- Emostasi secondaria: nella sede di lesione viene esposto il Fattore Tissutale che agisce insieme ai fattori secreti dalle piastrine per attivare la cascata coagulativa
- Formazione di un tappo solido e permanente: grazie alla fibrina polimerizzata ed agli aggregati piastrinici. A questo stadio vengono attivati anche dei meccanismi controregolatori, affinché il tappo emostatico sia limitato alla sede di lesione e via via dissolto.

### Cascata coagulativa

È costituita da una serie di reazioni enzimatiche che portano all'attivazione di enzimi e culminano nella formazione della trombina, responsabile della conversione del fibrinogeno (proteina plasmatica solubile) in fibrina (proteina fibrosa insolubile).

Ogni reazione è il risultato dell'unione di un complesso composto da un enzima (fattore di coagulazione attivato), un substrato (forma proenzimatica del fattore della coagulazione) ed un cofattore (acceleratore di reazione). Queste componenti vengono assemblate su un complesso fosfolipidico e tenute unite dagli ioni calcio. Infatti, la coagulazione tende ad essere localizzata nelle sedi dove tale assemblaggio può verificarsi (superficie piastrinica o endoteliale attivate) (Hoffman & Monroe, 2001). Schematicamente la cascata coagulativa viene suddivisa in una via estrinseca ed una via intrinseca, che convergono nella via comune. Tuttavia, tale divisione è essenzialmente un artefatto delle analisi in vitro; ci sono, infatti, interconnessioni tra le prime due vie citate (Robbins & Cotran, "Le basi patologiche delle malattie" settima edizione 2006).

La via intrinseca può iniziare in vitro con l'attivazione del fattore di Hageman (fattore XII). Viene attivata dal contatto con il collagene sub endoteliale e le proteine coinvolte nella fase iniziale di questo processo sono costituite dal chinogeno ad elevato peso molecolare (HMWK), il quale si complessa con la precallieina (PK) ed il fattore XII (Fattore di Hageman). Successivamente tale

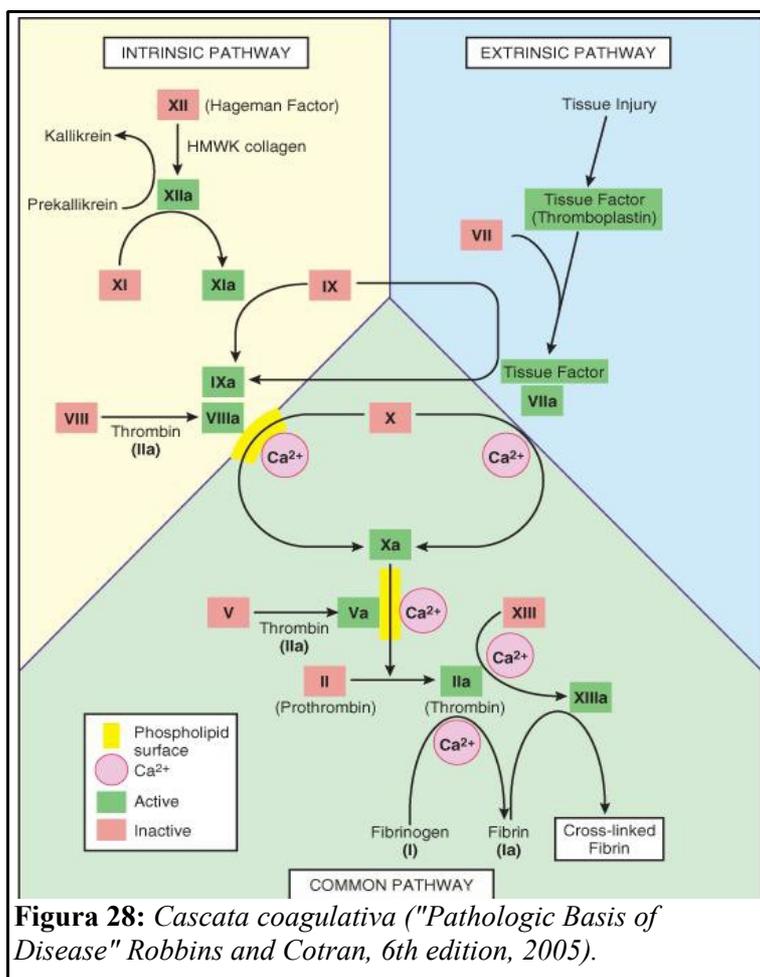
fattore viene attivato (XIIa), catalizzando a sua volta la produzione di callicreina dalla PK, con aumento della produzione del fattore XIIa (processo auto amplificante) e di fattore XIa che interviene nell'attivazione di altre proteine procoagulanti. La produzione del fattore XIa genera la formazione del fattore IXa, il quale attiva e complessa il fattore VIII (VIIIa), assieme allo ione calcio ed ai fosfolipidi piastrinici. Questo processo a cascata è in grado di attivare il fattore X (Fattore Stuart) in fattore Xa, evento che segna l'inizio della via comune. Il fattore Xa complessandosi a sua volta con il fattore Va, con i fosfolipidi piastrinici e lo ione calcio, attiva la protrombina (fattore II) in trombina. La via estrinseca è attivata dal Fattore Tissutale, una lipoproteina cellulare che viene esposta nel sito della lesione (Kato, 2002; Semeraro & Colucci, 1997). Il fattore VII (Proconvertina) complessandosi con il Fattore Tissutale (complesso Tenasico) ed il calcio, attiva la via comune (Fattore X). La via comune, attivata sia dalla via intrinseca che estrinseca, ha come obiettivo finale la produzione di una piccola quantità di trombina, in grado di generare fibrina insolubile dopo il distacco dei fibrinopeptidi A e B dalle catene  $\alpha$  e  $\beta$  della molecola di fibrinogeno. Quindi si ha la formazione del complesso Protrombinasico costituito da: Xa, Va, calcio ione e fosfolipidi, che genera la trasformazione della protrombina in trombina. Essa attacca il fibrinogeno, distaccando i fibrinopeptidi A e B, e generando monomeri di fibrina insolubili che successivamente vanno incontro ad un processo di polimerizzazione e stabilizzazione, quest'ultimo coadiuvato dal Fattore XIII (Fattore di Laki-Lorand). Inoltre, si lega ai recettori a serpentina, li attiva, ed avvia così la trasduzione del segnale di attivazione, con conseguente liberazione dei granuli, attivazione dei recettori del fibrinogeno e infine aggregazione piastrinica. Pertanto, la fase plasmatica influenza la fase piastrinica rendendo le differenti fasi coagulative, parti di un insieme con finalità di bloccare l'eventuale evento emorragico. Una volta attivata, la cascata della coagulazione deve essere limitata al sito della lesione vascolare per evitare eventi trombotici e/o emorragici

incompatibili con la vita. Oltre ai fattori limitanti attivati nel sito di esposizione dei fosfolipidi, essa è regolata da tre anticoagulanti naturali:

- L'antitrombina (AT), il più potente anticoagulante organico esistente, che inibisce l'attività della trombina.
- Le proteine C ed S, due proteine vitamina K-dipendenti. La trombina che sfugge alla complessazione plasmatica con AT interagisce con la trombomodulina. Tale complesso presente sulla superficie endoteliale contigua alla zona vascolare sede di lesione, contribuisce ad attivare la proteina C coagulativa, la quale con il contributo della proteina S, suo cofattore, esercita una potente azione anticoagulante nei confronti dei fattori Va e VIIIa.
- L'inibitore della via del fattore tissutale (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI), proteina secreta dall'endotelio e da altri tipi cellulari. Si lega al fattore Xa ed al fattore tissutale-VIIa, inattivandoli per limitare rapidamente la coagulazione.

Tale sistema anticoagulante non consente di contenere in modo apprezzabile l'evoluzione del trombo e se non intervenisse un sistema ausiliario di riduzione del trombo stesso si giungerebbe all'occlusione completa del vaso con conseguente ischemia organica grave, evento peggiore rispetto all'emorragia. La cascata fibrinolitica evita questa conseguenza, grazie alla produzione di plasmina (enzima proteolitico potentissimo), che limita le dimensioni del coagulo finale. Essa deriva dalla degradazione enzimatica del suo precursore circolante inattivo, il plasminogeno, sia attraverso una via fattore VII-dipendente, sia con due distinti tipi di attivatori del plasminogeno (PA). Il primo è la PA simil-urochinasasi (u-PA), presente nel plasma ed in vari tessuti, che è in grado di attivare il plasminogeno nella fase fluida. Inoltre, a sua volta, la plasmina, converte il precursore inattivo pro-urochinasasi nella molecola attiva u-PA, creando un ciclo di amplificazione. Il secondo e fisiologicamente più importante PA, è il tissue-type PA, sintetizzato soprattutto dalle cellule endoteliali e più attivo quando è attaccato alla fibrina.

Il plasminogeno può essere attivato anche dalle streptochinasi di origine batterica. La plasmina, quindi, scinde la fibrina ed interferisce con la sua polimerizzazione. I risultanti prodotti della scissione della fibrina agiscono anche come deboli anticoagulanti. L'azione della plasmina viene confinata al coagulo. La quota che sfugge viene complessata dalla  $\alpha$ -2-macroglobulina (proteina di fase acuta di origine epatica), che la inattiva, impedendone un'azione sistemica deleteria (Robbins & Cotran, "Le basi patologiche delle malattie" settima edizione 2006). Contemporaneamente le cellule endoteliali rilasciano inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI), che mantengono in equilibrio la produzione plasminica e quindi la proteolisi. Il sistema fibrinolitico porta alla dissoluzione del trombo, formatosi in un lasso di tempo ragionevole affinché la restituito ad integrum, ad opera dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce sotto l'influsso dei fattori di crescita piastrinici, non si sia conclusa.



## 5.2 Biomarker coagulativi

### *Conta piastrinica*

Le piastrine sono elementi anucleati di piccole dimensioni (1/3-1/4 di un globulo rosso), derivano dalla frammentazione citoplasmatica dei megacariociti. La forma è dovuta ad un'impalcatura formata dai microtubuli. Tale sistema tubulare serve alla piastrina per riversare all'esterno l'enorme quantità di sostanze chimiche che essa produce. Queste invaginazioni possono modificarsi nel momento in cui la piastrina si attiva e diventare delle evaginazioni dette pseudopodi o filopodi. Inoltre all'interno delle piastrine sono presenti circa 35 alfa – granuli e 5 corpi densi come compartimenti di stoccaggio (Wurzinger, 1990). Il rilascio dei mediatori piastrinici contenuti negli  $\alpha$ -granuli gioca un ruolo centrale nella regolazione di tutte le fasi infiammatorie e sulle successive fasi riparative del danno tissutale.

In aggiunta alla loro capacità di rilasciare mediatori immagazzinati, le piastrine stimolate sono in grado di generare eicosanoidi per regolare l'emostasi e l'infiammazione. In questo modo le piastrine sono un elemento chiave che collega il processo emostatico, l'infiammazione e la riparazione tissutale.

Una volta attivate hanno un contatto diretto con le cellule endoteliali, i granulociti, i monociti ed i linfociti. In questo modo possono stimolare o inibire gli altri partner cellulari dell'infiammazione ed aiutano la migrazione trans endoteliale dei leucociti nel tessuto circostante (Klinger & Jelkman, 2002).

La conta piastrinica viene ottenuta attraverso conte strumentali (ad impedenza od ottiche) e generalmente nei pazienti canini si aggira tra i 150.000-400.000 elementi cellulari per microlitro.

Le alterazioni della conta piastrinica comprendono le:

- trombocitopenie (da consumo ad esempio nella coagulazione intravascolare disseminata; da sequestro in seguito ad epatomegalia, splenomegalia, shock, emorragie cavitare imponenti; da distruzione a causa di trombocitopenie immunomediate primarie e secondarie ed infine da mancata produzione aplasie/ipoplasie midollari, leucemie,)
- trombocitosi (da infiammazione cronica, da corticosteroidi, da splenectomia, da anemie ferroprive, da risoluzione di trombocitopenie immunomediate da alterazioni mieloproliferative croniche)

### ***Tempo di Protrombina (PT)***

Il Tempo di Protrombina (PT) è un test globale che permette di valutare i fattori I, II, V, VII, X ed è utile nel valutare i deficit congeniti ed acquisiti della via estrinseca della cascata coagulativa, come ad esempio l'ipoprotrombinemia congenita del Beagle. Le proteine coagulative che compongono la via estrinseca devono ridursi significativamente (<30%) prima che il PT aumenti. Questo test non può essere considerato un test sensibile, infatti un PT normale può nascondere un deficit coagulativo lieve/moderato.

La concentrazione di alcuni fattori che compongono la via estrinseca nel cane sono presenti a concentrazione molto più elevate rispetto all'uomo (Fattore VII 300%, Fattore V 900%) da qui i diversi tempi di PT tra uomo e cane (in questa specie molto più brevi). Questa differenza gioca un ruolo significativo nell'interpretazione del test: prolungamenti anche modesti in termini di decimi di secondo si traducono in gravi deficit coagulativi.

Un deficit della via comune, non genera in egual misura un prolungamento dei test che esplorano le vie coagulative globali, in quanto la via estrinseca appare più sensibile a tali deficit. Un prolungamento del PT può essere ascrivibile a:

l'intossicazione da rodenticidi (difetto di attivazione dei fattori II, VII, IX, X);

DIC (coagulazione intravascolare disseminata); iperfibrinogenolisi primaria; insufficienza epatica; disturbi dell'assorbimento della vitamina K (ostruzione delle vie biliari, malassorbimento enterico e/o pancreatico); la sindrome nefrotica e, raramente, la presenza di inibitori. Carenze o inibitori dei fattori della coagulazione all'interno della via estrinseca e comune portano ad un prolungamento del PT.

Il Tempo di Protrombina è il tempo, espresso in secondi, che impiega il plasma citratato a coagulare dopo l'aggiunta di calcio ed un attivatore della via estrinseca (la tromboplastina/ Fattore Tissutale in sospensione con fosfolipidi).

La tecnica prevede l'aggiunta di 0.2 ml di reagente (tromboplastina in sospensione fosfolipidica con calcio) a 0.1 ml di plasma citratato termostato a 37 gradi centigradi. Il tempo necessario alla formazione del coagulo viene rilevato mediante metodo ottico (sviluppo di una torbidità rilevabile fotometricamente) od elettromeccanico (fibrina che blocca l'oscillazione di una sfera metallica sotto l'azione di un campo elettrico) e viene espresso in secondi (Mischke & Nolte, 1997)

I risultati del test devono essere comparati ad un intervallo di riferimento, stabilito da ciascun laboratorio, ottenuto da 40 pazienti privi di segni clinici di malattia (popolazione di riferimento). Tale intervallo varia in funzione del lotto di reagente tromboplastinico e della strumentazione utilizzata.

Lo stoccaggio del campione di plasma canino per 2 giorni a temperatura ambiente, non ha effetti significativi sui risultati del test per il PT (Furlanello et al., 2006).

### ***Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT)***

Il Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT) misura l'integrità della via intrinseca e comune della cascata coagulativa.

Viene utilizzato come test di screening (Kitchens, 1988) per identificare

deficienze congenite, come l'Emofilia A ed acquisite o la presenza di inibitori.

Carenze o inibitori dei fattori della coagulazione all'interno della via intrinseca e comune portano ad un prolungamento dell'aPTT.

L'aPTT si presenta alterato ad esempio nella deficienza del fattore XII, della precallicreina e del chininogeno ad elevato peso molecolare ma deficienze individuali di questi fattori non danno sanguinamento.

Ridotte attività di fibrinogeno, protrombina, del fattore V o X (via comune), possono prolungare l'aPTT, anche se il PT è più sensibile.

Le proteine coagulative che compongono la via intrinseca devono ridursi significativamente (<30%) prima che l'aPTT aumenti. Questo test quindi non può essere considerato un test sensibile ed un aPTT normale può nascondere un deficit coagulativo lieve/moderato. Alcuni fattori che compongono la via intrinseca nel cane sono presenti a concentrazioni molto più elevate rispetto all'uomo (Fattore VIII 800%, Fattore XI 300%, IX 200%, XII 200%), per questo nella specie canina i tempi dell'aPTT sono molto più brevi. Modesti prolungamenti dell'aPTT devono essere interpretati conoscendo la sensibilità della Tromboplastina utilizzata, in quanto i differenti tipi di Tromboplastina generano risultati estremamente differenziati nei medesimi plasmi.

Carenze congenite dei fattori di contatto (chininogeno ad elevato peso molecolare, precallicreina) e del fattore XII, generano tempi di aPTT estremamente elevati a fronte di un'assenza di segni clinici emorragici. Questo evento, dovuto all'attivazione del Fattore XI indipendentemente dal Fattore XII, viene differenziato dosando direttamente il Fattore XII o eseguendo l'aPTT con acido ellagico come attivatore, in quanto l'attivazione, mediante questo agente sintetico, parte dal Fattore XI e trascura i fattori di contatto.

Un prolungamento dell'aPTT può essere dato da fattori pre-analitici (impropria raccolta del campione, utilizzo di un anticoagulante diverso dal citrato di sodio al 3.2%, improprio rapporto tra sangue ed anticoagulante) oppure un paziente con ematocrito elevato (oltre 55%), carenze congenite dei fattori della via

intrinseca, insufficienza epatica, DIC, iperfibrinogenolisi primaria, avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti, presenza di inibitori.

La differenziazione tra carenza dei fattori e presenza di inibitori viene effettuata con la con la prova del miscelamento. Il campione oggetto di studio viene miscelato con un pool di plasmi provenienti da pazienti sani e viene quindi misurato l'aPTT. Se il paziente presenta un prolungamento dell'aPTT da carenza di fattori, il test si normalizza in quanto la mescolanza con il pool dei sani porta un contributo di almeno il 50% di attività dei fattori coagulativi, entità più che sufficiente per normalizzare i tempi di coagulazione anche in pazienti con gravi deficit coagulativi.

Carenze dei fattori VIII, IX e XI, tuttavia, causano disordini emorragici di varia gravità a seconda dei livelli dei fattori individuali.

L'aPTT può essere utilizzato per monitorare la terapia eparinica e svelare la presenza di eventuali inibitori coagulativi come il Lupus Anticoagulant (LA) e le sostanze eparino simili prodotte nelle neoplasie plasmocitarie (mieloma multiplo) e mastocitarie (mastocitoma).

L'aPTT è il tempo, in secondi, che impiega il plasma citratato a coagulare dopo l'aggiunta di frammenti di tromboplastina (accorgimento utilizzato per attivare solo la via intrinseca), calcio ed un attivatore (Caolino, Celite, Silice, Acido Ellagico e Destrano solfato). Il reagente dell'aPTT è chiamato tromboplastina parziale perché il fattore tissutale non è in associazione con il fosfolipide com'è nel reagente per il PT (Bajaj & Joist, 1999).

La tecnica prevede l'aggiunta di 0.1 ml di reagente (frammenti di tromboplastina in sospensione fosfolipidica) a 0.1 ml di plasma citratato termostato a 37 gradi centigradi. Il tempo necessario alla formazione del coagulo, una volta aggiunto alla miscela precedente 0.1 ml di cloruro di calcio, viene rilevato mediante metodo ottico (sviluppo di una torbidità rilevabile fotometricamente) od elettromeccanico (fibrina che blocca l'oscillazione di una sfera metallica sotto l'azione di un campo magnetico) ed espresso in secondi. I risultati del test

devono essere comparati ad un intervallo di riferimento ottenuto su una popolazione di riferimento costituita da 40 pazienti privi di segni clinici di malattia. Tale intervallo varia in particolare in funzione del tipo di tromboplastina (Tromboplastina di encefalo di coniglio, di polmone di coniglio, o Tromboplastina ricombinante umana) (Mischke, 2000). Rivestono minore importanza i differenti lotti di reagente (Mischke, 2002) e della strumentazione utilizzata. Il campione di plasma può essere conservato anche a temperatura ambiente per due giorni senza che si alterino i risultati del test; mentre nel plasma refrigerato dopo 48 o 72 ore di stoccaggio l'aPTT risulta prolungato (Furlanello et al., 2006).

### ***Fibrinogeno***

Il Fibrinogeno è una glicoproteina plasmatica solubile di elevato peso molecolare (340 kDa) (Weng et al., 1996) che viene trasformata in monomeri di fibrina a seguito della scissione operata dalla trombina (Soheier et al., 2010). Viene sintetizzato ed assemblato negli epatociti e nei fibroblasti, quindi secreto nel circolo sanguigno. La sua emivita plasmatica nel cane va dai 2,5 ai 4,5 giorni (Adelson, 1965; Rutherford & Hardaway, 1966). Recenti studi indicano che un incremento della concentrazione del fibrinogeno influenza il microcircolo, dando un incremento della viscosità plasmatica, dell'aggregazione dei globuli rossi e della trombogenesi delle piastrine, alterando la reattività vascolare e compromettendo l'integrità dello strato di cellule endoteliali. Questi cambiamenti provocano disfunzioni vascolari ed esacerbano le complicazioni del microcircolo in corso di patologie vascolari (Lominadze et al., 2009).

La misurazione del fibrinogeno è ritenuta un utile strumento per la diagnosi di DIC ma non si è dimostrata diagnostica in tutti i casi. Infatti, nonostante il consumo continuo, presente in questa condizione clinica, i suoi livelli plasmatici possono rimanere entro l'intervallo di riferimento.

In uno studio la sensibilità dell'ipofibrinogenemia per la diagnosi di DIC era solo del 28% e generalmente indicava le forme di consumo maggiormente ingravescenti (Levi & Meijers, 2010). Viene usato anche per valutare anomalie ereditarie della sintesi del fibrinogeno (ipofibrinogenemia del San Bernardo e del Borzoi), disfunzioni epatiche, sindromi iperfibrinogenolitiche (Zoia et al., 2011) e nel monitoraggio delle terapie trombolitiche. Numerose condizioni non coagulative sono in grado di alterare i livelli ematici di questa glicoproteina come flogosi, corticosteroidi, estrogeni, gravidanza e gammopatia monoclonale di Waldenstrom, quest'ultima ostacola la polimerizzazione della fibrina.

Esistono numerosi metodi per dosare il fibrinogeno. Tempo di coagulazione indotto dalla trombina (tempo di Trombina), dosaggio dell'antigene "fibrinogeno" mediante metodi immunologici ed il metodo gravimetrico. Tra tutti il più diffuso è il tempo di trombina modificato secondo "Clauss" (Clauss, 1957) che prevede l'aggiunta ad un plasma citratato diluito di una elevata concentrazione di trombina. Il tempo di coagulazione del plasma diluito è inversamente proporzionale alla concentrazione del fibrinogeno plasmatico quando vengono utilizzate elevate concentrazioni di trombina.

Il fibrinogeno può essere determinato normalmente anche nei pazienti sotto terapia eparinica. Il tempo di coagulazione osservato dopo l'aggiunta di trombina, viene comparato a quello di un pool di plasmi standard. Ogni laboratorio deve prepararsi una curva standard utilizzando plasmi a valore noto.

La concentrazione di fibrinogeno diminuisce lievemente dopo che il campione è stato stoccato per 48 ore a temperatura ambiente (Furlanello et al., 2006).

Recentemente è stato validato un metodo turbidimetrico automatico basato sulla precipitazione di ammonio solfato (Tecles et al., 2014).

### ***Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's)***

I Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's) rappresentano le scorie derivanti dall'azione esercitata dalla plasmina (enzima proteolitico molto potente) prevalentemente sulla fibrina e sporadicamente sul fibrinogeno, in quanto lo zimogeno di partenza, il plasminogeno, presenta una forte affinità chimica per la fibrina. Di conseguenza, la formazione della plasmina avviene all'interno del coagulo e solo una minima quantità fuoriesce esercitando un'azione proteolitica non selettiva rivolta anche a proteine ormonali ed al fibrinogeno. I frammenti che derivano dall'azione della plasmina sono prevalentemente D ed E (FDP's).

Una volta prodotti, i livelli plasmatici rimangono entro range fisiologici, grazie all'azione dei macrofagi epatici che provvedono alla loro metabolizzazione ed escrezione. Per la misurazione degli FDP's vengono usati dei sistemi di agglutinazione al lattice manuali che utilizzano siero o plasma. I sistemi basati sul plasma sono preferibili in quanto non riconoscono il fibrinogeno e di conseguenza la positività appare maggiormente specifica. Tali test sono stati validati anche nella specie canina (Caldin et al., 1998; Boisvert et al., 2001). Un'elevata concentrazione plasmatica degli FDP's può presentarsi in corso di: DIC (Bovill, 1994), iperfibrinogenolisi primaria (Zoia et al., 2011), insufficienza epatica, terapie immunosoppressive (steroidi, chemioterapici), emorragie come nell'avvelenamento da rodenticidi (Sheafor & Couto, 1999) .

Le affezioni che coinvolgono le cellule di Kupffer (epatopatie diffuse, terapie immunosoppressive) riducono l'attività delle stesse determinando un incremento degli FDP's relativo ad un deficit di metabolizzazione piuttosto che ad una aumentata produzione (iperfibrinolisi).

### ***Dimeri D (prodotti di degradazione della fibrina)***

I Dimeri D sono dei frammenti fibrinici, testimoni diretti della formazione intravascolare di fibrina (trombo), in quanto derivano esclusivamente da essa (coagulo) e non dal fibrinogeno.

La formazione dei Dimeri D necessita, da una parte di fibrina a livello intravascolare, e dall'altra che l'aggressione plasminica avvenga in contemporanea in due siti stechiometricamente opposti della catena fibrinica. Quest'evento è meno probabile rispetto ad un attacco casuale della plasmina sulla fibrina. Ne consegue che la produzione dei Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's) è più rapida di quella dei Dimeri D. È facile pensare anche ad un lasso temporale maggiore per la formazione degli stessi. Questo spiegherebbe perché in corso di traumi acuti, nella primissima fase di valutazione clinica, siano aumentati solo gli FDP's e solo alcune ore dopo anche i Dimeri D. L'obiettivo del test è valutare la fibrinolisi, evento conseguente alla deposizione di fibrina in sede intravascolare.

I test commerciali moderni determinano i Dimeri D con diversi metodi. Tutti utilizzano anticorpi monoclonali che rilevano un epitopo, presente nel fattore XIIIa legato al frammento con dominio D della fibrina, ma non nei prodotti di degradazione del fibrinogeno o nei prodotti di degradazione della fibrina non legati. Il determinante antigenico riconosciuto è una porzione dei polipeptidi del dominio D che è conformazionalmente reattiva dopo che il fattore XIIIa e la plasmina hanno modificato la proteina (Gaffney et al., 1995). Nonostante la loro capacità di misurare specificatamente la fibrina prodotta dall'azione della trombina, fattore XIIIa e plasmina, questi test hanno dei limiti dovuti sia alla loro specificità che alla loro sensibilità. I test disponibili attualmente per determinare i Dimeri D non sono identici perché l'antigene dei Dimeri D è presente in prodotti di degradazione di dimensioni diverse, gli anticorpi monoclonali riconoscono diversi epitopi, ed il tipo di test, gli standard

di calibrazione, e la strumentazione, variano. Poiché l'analita non è una semplice struttura con composizione uniforme, è necessario essere consapevoli delle performance del test utilizzato. Nell'uomo gli sforzi effettuati per standardizzare i risultati del test, fino ad ora non hanno avuto successo.

Esistono metodiche quantitative immunoturbidimetriche (Caldin et al., 2008) e metodiche di agglutinazione al lattice semiquantitative (Stokol et al., 2000) validate per Medicina Veterinaria.

Il test dei Dimeri D può essere effettuato per verificare in quale misura è stata avviata la formazione di fibrina o per sapere se ci sono alcuni cambiamenti in questo processo in corso di una specifica terapia o patologia (Lowe, 2005; Rathbun et al., 2004a-b). In pratica, la determinazione dei Dimeri D è stata più ampiamente validata nell'esclusione della trombosi venosa profonda dell'uomo, e nella diagnosi e monitoraggio della DIC.

La diagnosi di trombosi è complicata dal fatto che i livelli dei Dimeri D sono comunemente elevati nei pazienti ospedalizzati. Questo può rispecchiare alcuni dei diversi processi patologici sottostanti che avviano la formazione intravascolare di fibrina ma non necessariamente esitano in trombosi (Meesters et al., 2007). Nei pazienti che ricevono una terapia anticoagulante per una trombosi acuta, i livelli plasmatici elevati dei Dimeri D si normalizzano gradualmente. L'impiego di agenti con una predominante attività anti-Xa o di agenti con combinata attività anti-Xa e antitrombina, dà cambiamenti equivalenti nella formazione e degradazione della fibrina dopo una trombosi acuta. I livelli plasmatici dei Dimeri D potrebbero quindi essere impiegati per monitorare la risposta alla terapia effettuata con questi agenti. Un incremento dei Dimeri D deve far sospettare al clinico: una coagulazione intravasale disseminata (DIC) o un'evento trombotico.

## *Antitrombina*

La Antitrombina (AT) è l'anticoagulante naturale per eccellenza. È una proteina di sintesi epatica, con peso molecolare tra 50.000 e 60.000 Dalton. Nella specie umana tale marker coagulativo rappresenta una proteina di fase acuta di tipo negativo (Fourrier, 2006), mentre nella specie felina rappresenta una proteina di fase acuta di tipo positivo. La quantità di AT può essere misurata con un test funzionale o immunologico. Quello funzionale deve essere eseguito sul plasma e non sul siero, perché con la coagulazione si verifica un consumo variabile di AT e questo può portare a bassi livelli sierici nonostante i livelli plasmatici siano normali. Esso prevede l'incubazione del plasma con un enzima antitrombinico, di solito trombina o fattore Xa, e successivamente la misurazione dell'enzima residuo. La quantità di AT presente nel campione testato viene calcolata grazie ad una curva di riferimento basata su una concentrazione nota di AT rispetto all'enzima residuo. In alcuni metodi vengono utilizzati dei substrati sintetici per misurare l'enzima residuo. Sono stati sviluppati numerosi test immunologici. I più diffusi sono il metodo ad immunodiffusione radiale di Mancini, elettroimmunoassay di Laurell (McKay, 1981) ed un metodo nefelometrico (Fareed et al., 1982).

La determinazione dell'antitrombina ha tre funzioni:

- 1) funzione diagnostica: può diminuire in corso di insufficienza epatica, coagulazione intravasale disseminata (DIC), malassorbimento, proteinuria (sindrome nefrotica), emorragie (effetto diluizionale).
- 2) funzione prognostica (in soggetti affetti da DIC livelli di antitrombina inferiore al 50-60% hanno prognosi severe).
- 3) funzione terapeutica (la somministrazione di eparina, esercita un'azione anticoagulante aumentando da 100 a 1000 volte l'attività dell'antitrombina). In questo senso appare rilevante conoscere l'attività dell'AT prima di somministrare l'eparina ad un paziente.

## CAPITOLO 6 – LA VITAMINA K

### 6.1 La Vitamina K: storia e classificazione

Il termine vitamina K deriva dalla parola tedesca “Koagulation”, con cui venne identificata nel 1935 da H.C.P. Dam, che grazie alle sue ricerche condivise con E.Doisy il premio Nobel per la Medicina e la Fisiologia nel 1943. Chimicamente si intende una serie di composti, che derivano dal 2-metil-1,4-naftochinone. Distinguiamo tre composti principali della vitamina K:

- Vitamina K1 (fitonadione, alfa-fillochinone)
- Vitamina K2 o menachinoni (MK-n), dove n indica il numero di unità isoprenoidi legate in posizione 3. I menachinoni maggiormente presenti sono quelli con 7, 8, 9 unità isoprenoidi (Shearer et al., 2008), vengono prodotti dalla flora batterica intestinale ad esempio dal genere E.Coli.
- Vitamina K3 o menadione, di origine sintetica, ma può anche rappresentare un prodotto intermedio della conversione di vitamina K in menachinone-4 in tessuti extra epatici specifici (Card et al.,2013)

Sebbene la maggior fonte della vitamina K derivi dall'alimentazione di verdure a foglie verdi, la dieta non è sufficiente a mantenere un'adeguata concentrazione di vitamina K nel torrente ematico, per questo motivo i mammiferi hanno sviluppato un efficiente sistema di ricircolo, conosciuto con il nome di ciclo della vitamina K-epossido (VKOR). Nel 2004 il gene che codifica la subunità1 del complesso (VKORC1) è stata identificata e caratterizzata (Rost et al.,2004). Questo studio è importante per diagnosticare soggetti con polimorfismo genetico e di conseguenza utile per la gestione terapeutica con il warfarin negli umani.

## **6.2 Funzione biologica della Vitamina K**

La vitamina K, liposolubile, riveste un ruolo essenziale come cofattore di una carbossilasi necessaria all'attivazione dei fattori della coagulazione (II,VII,IX,X), della proteina C ed S plasmatiche, dell'osteocalcina della proteina Gla della matrice (Shearer, 2000).

Il fillochinone (vitamina K1) rappresenta la maggior fonte alimentare di vitamina K, viene assorbito predominantemente dall'intestino prossimale, il processo coinvolge sia i sali biliari che i prodotti della lipolisi pancreatico.

Non è noto un carrier proteico della vitamina K, altresì i TRL (triglyceride-rich lipoproteins) ed i VLDL (very low-density lipoproteins) sono ritenuti i principali trasportatori del fillochinone (Kohlmeier et al., 1995). Una volta assorbita, la vitamina K viene rapidamente trasformata in metaboliti più polari, che includono la vitamina K1- 2,3-epossido ed una porzione di questo metabolita viene riconvertita in vitamina K1. L'emivita plasmatica è di circa 1,5-3 ore. Il deposito epatico è costituito per il 90% da menachinoni e per il 10% dal fillochinone, le riserve di quest'ultimo sono molto labili ed in seguito a carenza dietetica possono calare drasticamente (Shearer & Newman, 2008). La vitamina K e' infine estensivamente metabolizzata nel fegato ed escreta nelle urine (20%) e nella bile (40%).

## **6.3 Uso terapeutico nell'uomo e nel cane**

In medicina umana in corso di terapie croniche con anticoagulanti sono segnalate gravi sindromi emorragiche da carenza di vitamina K e secondo alcuni studi la somministrazione di vitamina K e concentrato del complesso di Protrombina (PCC) garantisce ai pazienti un esito fausto (Tazarourte et al., 2014). Inoltre è noto da decenni l'utilizzo della vitamina K nella profilassi della sindrome emorragica neonatale (Laubscher et al., 2013).

Negli animali ed in particolare nel cane, specie oggetto dello studio, la vitamina K1 è l'antidoto nell'avvelenamento da rodenticidi e rappresenta il trattamento d'elezione (Mount et Feldman, 1983). Inoltre un sovradosaggio non produce alterazioni organiche, somministrata ad un dosaggio elevato per bocca (25 g/kg) non ha dato mortalità negli animali testati (McDowell, 1989). La vitamina K3, al contrario, può interferire con le funzioni del glutatione, provocando un danno ossidativo alle membrane cellulari con la conseguenza di anemia emolitica ed iperbilirubinemia nei neonati (Goodman & Gilman's, 1996). La vitamina K3 non è efficace per il trattamento dell'avvelenamento da rodenticidi (Mount, 1988) ed inoltre può causare un effetto tossico sui tubuli renali ed una nefrotossicosi irreversibile nei cavalli (McConnico et al., 1997). Per questi motivi la vitamina K3 non dev'essere usata come antidoto negli animali.

#### **6.4 Vie di somministrazione**

La somministrazione orale è sicura e garantisce un ottimo assorbimento, il quale è influenzato dal cibo e dagli acidi biliari. In soggetti con malassorbimento, disordini gastroenterici come l'atresia biliare, la fibrosi cistica, celiachia e la sindrome dell'intestino corto si può riscontrare un ridotto assorbimento (Savage et al., 1983). Nel cane può essere scelta in soggetti stabili, in assenza di patologie acute o croniche gastroenteriche. E' sicuramente la terapia ideale da prescrivere a casa per il proprietario. La somministrazione sottocutanea può creare lesioni nel sito di inoculo: eczema, orticaria ed evolvere in scleroderma cronico (Wilkins et al., 2000) sono riportati casi anche in neonati (Stewart & Daly, 2009) (Bui et al., 2004). Si sospetta che si tratti di una reazione di ipersensibilità di tipo II (Bruynzeel et al., 1995). Nei cani avvelenati, soprattutto se con disturbi di circolo o disidratazione importante, non garantisce una sicurezza terapeutica ma viene tutt'oggi suggerita.

La somministrazione intramuscolare è da evitare perchè è dolorosa e può causare la formazione di ematomi.

Per quanto riguarda la somministrazione endovenosa vi sono delle controversie: nella letteratura umana si rinvengono segnalazioni di reazioni avverse come un caso di un paziente deceduto per shock anafilattoide associato alla terapia endovenosa con vitamina K (Jethava et al., 2012). Uno studio che ha monitorato 45 pazienti a cui veniva somministrata vitamina K endovenosa, ha evidenziato solo in un paziente un'ipotensione transitoria (Bosse et al., 2002).

Inoltre per avvalorare la maggiore sicurezza della formulazione micellare attualmente in commercio rispetto a quella precedente contenente il veicolo "polyethoxylated castor oil" è stato condotto uno studio su milioni di persone che non ha evidenziato reazioni avverse (Pereira et Williams, 1998). Infine, uno studio retrospettivo in un ospedale universitario americano non ha evidenziato un'incidenza di reazioni anafilattoidi alla vitamina K significativamente più elevata di altri farmaci monitorati. Lo stesso studio sconsiglia di pre-trattare pazienti umani con antistaminici o corticosteroidi (Riegert-Johnson & Volcheck, 2002).

Nella specie canina vi è un'unica pubblicazione che riporta una reazione avversa fatale in due cani a cui era stata somministrata una dose scaduta di 2 mg/kg di vitamina k per via endovenosa lenta (Burgess et al., 2001).

## **6.5 Dosaggio**

Nell'uomo il dosaggio è molto variabile a seconda della condizione fisiopatologica. In uno studio del 1989, Mount e Kass hanno dimostrato che il dosaggio di 5 mg/kg era più efficace di 2.5 mg/kg nei cani avvelenati. Nel corso degli anni, altri autori hanno proposto dosaggi differenti: 1,5 mg-2.5 mg/kg BID PO (Murphy, 2002), 2,5-5 mg/kg SC (Sheafor&Couto, 1999) 5mg/kg (Kirk, 2006), 0,83 mg/kg PO TID (Woody et al., 1992).

## 6.6 Formulazioni in commercio

### Registrata per l'uomo:

- Konakion ®Roche, 10 mg/ml, soluzione orale ed iniettabile per uso endovenoso.

*Principio attivo:* fitomenadione 10 mg.

*Eccipienti:* acido glicocolico, sodio idrossido, lecitina, acido cloridrico, acqua per preparazioni iniettabili.

### Registrata per il cane:

- Vitamin K 1 Laboratoire TVM, 10mg/ml, soluzione iniettabile per uso endovenoso.

*Principio attivo:* fitomenadione 10 mg.

*Eccipienti:* acido glicocolico, lecitina sodio idrossido, acido cloridrico, acqua per preparazioni iniettabili.

# **CAPITOLO 7 – VALUTAZIONE DEI TEMPI DELLA COAGULAZIONE (PT ed aPTT) DOPO SOMMINISTRAZIONE DI VITAMINA K PER VIA ENDOVENOSA NELL'AVVELENAMENTO DA RODENTICIDI ANTICOAGULANTI NEL CANE**

## **ABSTRACT**

### **EVALUATION OF CHANGES IN COAGULATION TIMES (PT AND aPTT) AFTER INTRAVENOUSLY VITAMIN K ADMINISTRATION IN 73 DOGS INTOXICATED WITH ANTICOAGULANT RODENTICIDE**

Senzolo M.<sup>1,2</sup> Gentilini F,<sup>2</sup> Zoia A,<sup>1</sup> and Caldin M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>San Marco Veterinary Clinic, Padova, Italy; <sup>2</sup>Alma Mater Studiorum - University of Bologna, Ozzano dell'Emilia, Italy.

Intoxication with anticoagulant rodenticide may cause haemorrhagic diathesis in dogs. No information is available on how long clotting times take to normalise after vitamin K treatment and literature suggest that intravenously (IV) vitamin K administration may cause anaphylaxis, but no references for this statement are provided.

The aim of this study was to evaluate time to normalisation of activated partial thromboplastin time (aPPT) and prothrombin time (PT) after intravenously vitamin K treatment in dogs with naturally anticoagulant rodenticide (AR) intoxication. Inclusion criteria for AR intoxication were: detection of internal or external bleeding, prolonged coagulation times consistent with AR intoxication, exclusion of any other reasons for the clinical bleeding, a complete clinical record, and a coagulation profiles (PT, aPTT, antithrombin %, fibrinogen, FDPs and D-dimer concentration) collected at presentation (T0). Vitamin K was administered at 5 mg/kg intravenously, over 15 minutes, protected from light. Four hours and 8 hours post-vitamin K administration (T4 and T8) a coagulation profile was repeated.

Seventy-three dogs with AR poisoning referred to the San Marco Veterinary Clinic met inclusion criteria. aPPT and PT values were compared at T0, T4 and T8 with “repeat measures analysis of variances” and “Friedman test”, respectively. At T0 no dogs had PT and aPPT within reference range (6.8-8.6 seconds, and 10.2-12.3 seconds respectively) and mean aPPT and median PT was 45.9 and 120 seconds respectively; at T4, mean aPPT and median PT was 14.5 and 8.5 seconds, respectively; and at T8 (these data were available only in 43 out of the 73 dogs) mean aPPT and median PT was 13.7 and 8.3 seconds respectively.

There was a significant decrease in aPPT and PT between T0 and T4 and between T4 and T8 ( $p < 0.0001$  for all comparison). All 73 dogs survived to discharge, none received blood or plasma transfusion or had an adverse reaction after vitamin K IV supplementation, and by T4 no dogs showed clinical signs of ongoing of external bleeding.

This protocol with vitamin K administration seems to be safe and effective in treatment of dogs with naturally occurring AR intoxication.

## 7.1 Introduzione e Obiettivi dello studio

La maggior parte degli studi pubblicati in letteratura veterinaria riguardanti i tempi della coagulazione in corso di avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti risalgono ormai ai decenni passati. Grazie al lavoro del 1988 di Mount si è a conoscenza dell'emivita dei fattori II, VII, IX, X che è di rispettivamente 41, 6.2, 13.9, 16.5 ore nel cane. In seguito si sono valutati i test diagnostici (PT, aPTT ed ACT) in 4 cani alimentati con dose di 1,1 mg BDF/kg di peso corporeo, gli Autori concludono che, dopo 48 ore dall'inizio della terapia con vitamina K (0,83 mg/kg PO TID) tutti i parametri sopracitati ritornano nella norma (Woody et al., 1992). Nel più recente studio clinico retrospettivo (Sheafor & Couto, 1999) viene riportata la tempistica in cui è stato eseguito il prelievo post terapia in 9 dei 23 soggetti studiati (da 14 ore a 4 giorni). La ristrettezza numerica del campione, la variabilità sia dei prelievi post terapia sia della dose di vitamina K1 somministrata e del concomitante uso di emoderivati non garantisce una chiara ed uniforme valutazione sul tempo di efficacia della vitamina K come unica terapia.

Uno degli studi di farmacodinamica più significativo riguarda la misurazione sia della vitamina K che del suo epossido nel siero canino in seguito ad intossicazione da difenadione ed indica che 5 mg/kg è un dosaggio più sicuro rispetto a quello precedentemente suggerito di 2,5 mg/kg nel trattamento della coagulopatia da rodenticidi (Mount et Kass, 1989).

In base alle informazioni estrapolate dalla letteratura si è deciso di condurre questo studio prospettico.

La finalità del lavoro di ricerca è stata di valutare quando si normalizzano i tempi della coagulazione (PT ed aPTT) in soggetti di specie canina naturalmente intossicati dopo somministrazione endovenosa lenta di 5 mg/kg di vitamina K1.

## **7.2 Materiali e metodi**

### **7.2.1 Database**

Tutti i soggetti di specie canina afferiti a visita presso la Clinica Veterinaria San Marco di Padova in un periodo di tempo compreso tra il 2003 ed il 2013. I criteri di inclusione allo studio sono stati i seguenti: segni clinici ed alterazioni del profilo emostatico (aumento di PT ed aPTT) compatibili con avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti, nessuna somministrazione di vitamina K né di emoderivati prima della valutazione clinica e laboratoristica, esame tossicologico positivo per rodenticidi anticoagulanti. Tutte le informazioni riguardanti il segnalamento, l'anamnesi, l'esaminazione clinica, gli esami di laboratorio e di diagnostica collaterale sono state riportate ed archiviate in apposite schede cliniche del database dedicato (P.O.A. - System 6.0© e segg., software per ambulatori e cliniche veterinarie, Ing. L.Coppola, Mestre-Venezia).

### **7.2.2 Raccolta campioni**

La raccolta dei differenti campioni per le analisi laboratoristiche è stata sempre effettuata da un medico veterinario della clinica per evitare problemi pre-analitici. Si è scelto di prelevare dalla vena safena, solo in soggetti estremamente compromessi dalla vena giugulare, dopo appropriata rasatura, disinfezione dell'arto e compressione emostatica post prelievo.

I campioni ematici per analisi coagulative sono stati messi in una provetta "Vacurette" (sistema sottovuoto) della Greiner bio-one contenente citrato di sodio 0.109 M al 3.2%, rispettando il rapporto sangue/anticoagulante indicato nella provetta (9:1). Dopo la raccolta del sangue le provette venivano delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto miscelamento tra anticoagulante e sangue. Al termine del miscelamento le provette venivano

sottoposte a centrifugazione a 1500 g per 5 minuti e veniva separata la parte plasmatica utilizzando delle pipette in plastica tipo “pasteur” e posta su contenitori barcodati idonei alla processazione. Queste operazioni sono state eseguite dal personale medico o da tecnici qualificati del Laboratorio San Marco. Tutti i campioni sono stati separati entro trenta minuti dalla raccolta del campione. Il sangue destinato all' analisi ematologica (Conta piastrinica) è stato posto in una provetta sottovuoto da 2 ml (BD Vacutainer) contenente K2 EDTA 3,6 mg come anticoagulante. Le provette venivano delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto miscelamento tra sangue ed anticoagulante.

Inoltre in tutti i soggetti è stato eseguito uno striscio ematico a fresco, essiccato all'aria e successivamente colorato con coloratrice automatica 7120 Wescor®, utilizzando come reagenti Eosin (SS-035C), Thyazin (SS-035B), Light Eosinophilic Washer (SS-035A) [Delcon®] per valutare microscopicamente la morfologia eritrocitaria e la stima della conta piastrinica.

Tutti i campioni sono stati processati entro un'ora in orario diurno, se provenienti dalle emergenze notturne stoccati a temperatura ambiente per il plasma ed in frigorifero a 4 gradi centigradi per il sangue intero ed analizzati entro 8 ore.

#### **7.2.4 Somministrazione di vitamina K**

In tutti i pazienti è stata applicata un ago cannula (BD Insyte, Becton, Dickinson &CO., USA) nella vena cefalica, previa tricotomia ed adeguata disinfezione, fissata con cerotti di carta ed innestato un set d'infusione. A tutti i pazienti è stata somministrata fluidoterapia in base al fabbisogno di ogni singolo paziente, valutato dal medico curante, primariamente soluzioni cristalloidi. La vitamina K, nelle formulazioni in commercio disponibili nella struttura nel periodo dello studio (Konakion® 10 mg/ml o Vitamin K Laboratoire TVM 10

mg/ml), è stata somministrata dal tappino perforabile del set d'infusione più vicino al paziente. La somministrazione endovenosa è stata eseguita lentamente in circa 15 minuti ed al riparo da fonti luminose. Per questo scopo è stato appositamente coperto il deflussore per tutta la sua lunghezza (dal tappino perforabile all'ago cannula) con del vetrap.

### **7.2.5 Prelievi ematici seriali e monitoraggio**

In tutti i soggetti si è eseguito un prelievo ematico per profilo coagulativo a distanza di 4 ore (identificato come T4) dalla prima somministrazione di vitamina K endovenosa. Il prelievo ematico a distanza di 8 ore (identificato come T 8) dalla somministrazione di vitamina K non è stato possibile in tutti i soggetti. Tutti i pazienti sono stati detenuti per almeno quattro ore nella struttura, ove ritenuto necessario è stata somministrata ossigenoterapia flow-by ed antibioticoterapia e monitorati dal personale medico mediante la valutazione visiva diretta per quanto riguarda l'angioedema ed il rilevamento dei parametri corporei quali temperatura, frequenza cardiaca e respiratoria.

### **7.2.6 Strumentazione e Metodica**

La determinazione di PT, aPTT e Fibrinogeno ed FDP's è stato eseguito mediante un coagulometro random access multiparametrico automatico STA COMPACT – 2 TM (Diagnostica STAGO®, Albio, France). Tale strumento utilizza una metodica meccanica per la formazione fibrinica.

Per la determinazione dei d-Dimeri e dell'Antitrombina si è utilizzato un analizzatore chimico-clinico random access automatizzato (Olympus AU 2700) distribuito dalla Beckman Coulter. Dal 2008 l'analisi è stato integrata da una valutazione fotometrica semiquantitativa degli interferenti (lipemia, ittero ed emolisi).

Per la determinazione della Conta piastrinica si è utilizzato un contaglobuli laser ADVIA 2120© (Siemens Medical Solutions).

### aPTT

L'aPTT è stato determinato utilizzando un kit commerciale (STA APTT Kaolin Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France). La procedura consiste nel mettere 50 µl di plasma citratato e 50 µl di sospensione di caolino tamponato (5 mg/ml di caolino) e cefalina (sostituto piastrinico), preparata da tessuti cerebrali di coniglio secondo Bell e Alton (Bell WN, Alton HG, 1954), in una provetta preriscaldata a 37°C, lasciando il tutto in incubazione per 4 minuti. Successivamente si effettua l'aggiunta di 50 µl di cloruro di calcio (pre riscaldato a 37°C). Il tempo necessario per la formazione di un coagulo visibile, misurato con metodo cronometrico, viene espresso in secondi e costituisce il Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato.

### PT

Il PT è stato determinato utilizzando un kit commerciale (STA Neoplastin Plus, Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France). La procedura consiste nel mettere 100 µl di reagente (Tromboplastina di cervello di coniglio, liofilizzata) in una provetta preriscaldata a 37°C e successivamente aggiungere 50 µl di plasma citratato. Il tempo necessario per la formazione di un coagulo visibile, misurato con metodo cronometrico, viene espresso in secondi e costituisce il Tempo di Protrombina.

### Fibrinogeno

Il Fibrinogeno è stato misurato in mg/dL utilizzando un kit commerciale (STA-Fibrinogen Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France).

## FDP's

Gli FDP's plasmatici sono stati determinati utilizzando un kit commerciale (FDP's plasma, Diagnostica Stago, Asnieres sur Seine, France), opportunamente validato nella specie canina (Caldin M. et al., 1998; Stokol T. et al., 1999), che utilizza anticorpi monoclonali per la determinazione dei frammenti della fibrina e del fibrinogeno. Il dosaggio degli FDP's plasmatici è stato eseguito a diluizioni di 1:2 e 1:8 ed i risultati sono stati riportati come negativi quelli  $<5 \mu\text{g/ml}$  e positivi quelli compresi tra  $5\text{-}20 \mu\text{g/ml}$  e  $>20 \mu\text{g/ml}$ .

## D-Dimeri

La determinazione dei D-Dimeri plasmatici è stata eseguita utilizzando un kit commerciale (Tina-quant D-Dimer, Roche Diagnostic GMBH, Mannheim, Germany), opportunamente validato nella specie canina (Caldin et al., 2000), che utilizza un anticorpo policlonale per rilevare i frammenti della fibrina.

## AT

L' Antitrombina è stata determinata utilizzando un kit commerciale con substrato cromogenico (STA Antithrombin III, Roche Diagnostic GMBH, Mannheim, Germany) e riportato come valore percentuale di un calibratore standard di plasma umano (STA unicalibrator, Roche Diagnostic GMBH, Mannheim, Germany) che è stato precedentemente usato in uno studio sperimentale che ha dimostrato che l'attività plasmatica dell'AT canina è comparabile a quella umana (Bauer et al., 2009). In breve al campione di plasma citrato viene aggiunta eparina, un substrato cromogenico ed un eccesso di trombina, tutta l'AT viene legata, formando un complesso inattivo. La trombina in eccesso rilascia la p-nitroanilina dal substrato cromogeno. Poiché la quantità residua di trombina è inversamente proporzionale alla concentrazione di AT nel campione, l'aumento dell'estinzione ad una lunghezza d'onda di 405 nm permette di calcolare l'attività della AT.

### **7.2.7 Statistica**

È stato utilizzato il test di Kolmogorov-Smirnov per testare la normalità dei dati. L'aPTT è stato studiato grazie a “ripetute analisi di varianza” nello stesso soggetto in tempi diversi, mentre il PT è stato valutato con l'utilizzo del test di Friedman nello stesso soggetto in tempi diversi.

La soglia di significatività statistica è stata settata per valori di  $p < 0.05$

Il software utilizzato è Analyse-it©, v 2.21 Excel 12+

### **7.3 Risultati**

Sono rientrati nei criteri di inclusione 73 soggetti di specie canina.

#### Sesso

Le femmine rappresentano circa il 63% della popolazione, 46 soggetti di cui 21 intere e 25 sterilizzate. I maschi sono 27, 25 interi e 2 castrati.

#### Razza

Nessuna predisposizione di razza, il meticcio è la razza più rappresentata (39%).

#### Età

Per quanto concerne l'età si nota la presenza di soggetti di età compresa tra 2 mesi e 153 mesi, con una mediana di 37 mesi e una media di 48 mesi.

Segni clinici di presentazione:

<b>SEGNI CLINICI</b>	<b>CASI %</b>
Mucose pallide	45
Letargia	25
Ematomi	25
Dispnea	24
Anoresia	26
Emotorace	14
Emoaddome	12
Tosse	11
Ematuria	11
Emorragia polmonare	10
Ematemesi	8
Sanguinamento buccale	8
Emottisi	8
Vomito (senza sangue)	7
Sanguinamento vulvare	7
Epistassi	5
Emorragia spinale	5
Emorragia sclerale	5
Ematochezia	5

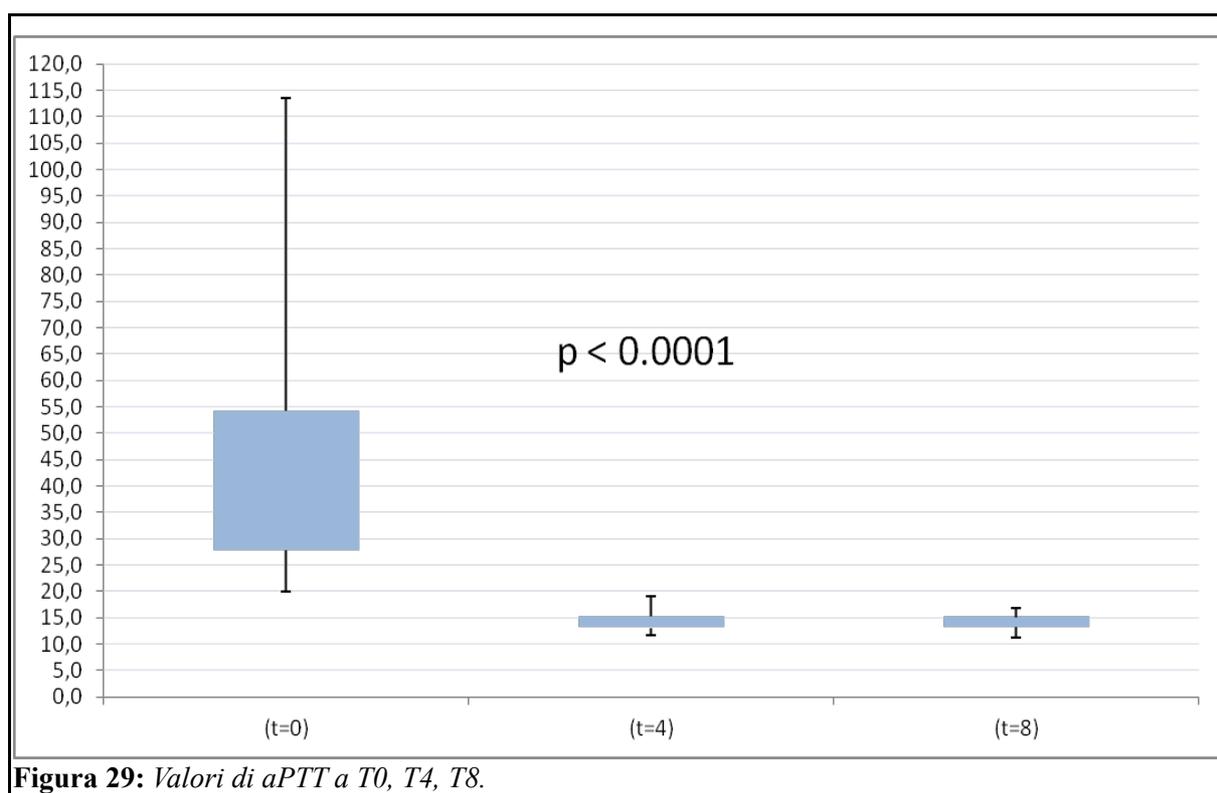
**Tabella 6:** *Frequenza di presentazione in percentuale dei segni clinici.*

## ***aPPT***

Nessun soggetto presentava valori di aPTT all'interno del range di riferimento del Laboratorio San Marco (10,2- 12,3 sec).

In ingresso, a T0, il valore minimo era di 20 secondi e massimo di 113,5 sec con un valore medio di 45,9 sec. Dopo quattro ore dalla terapia (T4) il valore minimo era di 11,7 secondi ed il massimo 19 secondi, con una media di 14,4 secondi. Dopo otto ore dalla terapia (T8) il valore minimo era di 11,3 secondi ed il massimo di 16,9 secondi con un valore medio di 14,2 secondi. I risultati a T8 sono stati ottenuti in 43 soggetti su 73.

	<b>MIN</b>	<b>MAX</b>
<b>aPTT (range di rif)</b>	10,2	12,3



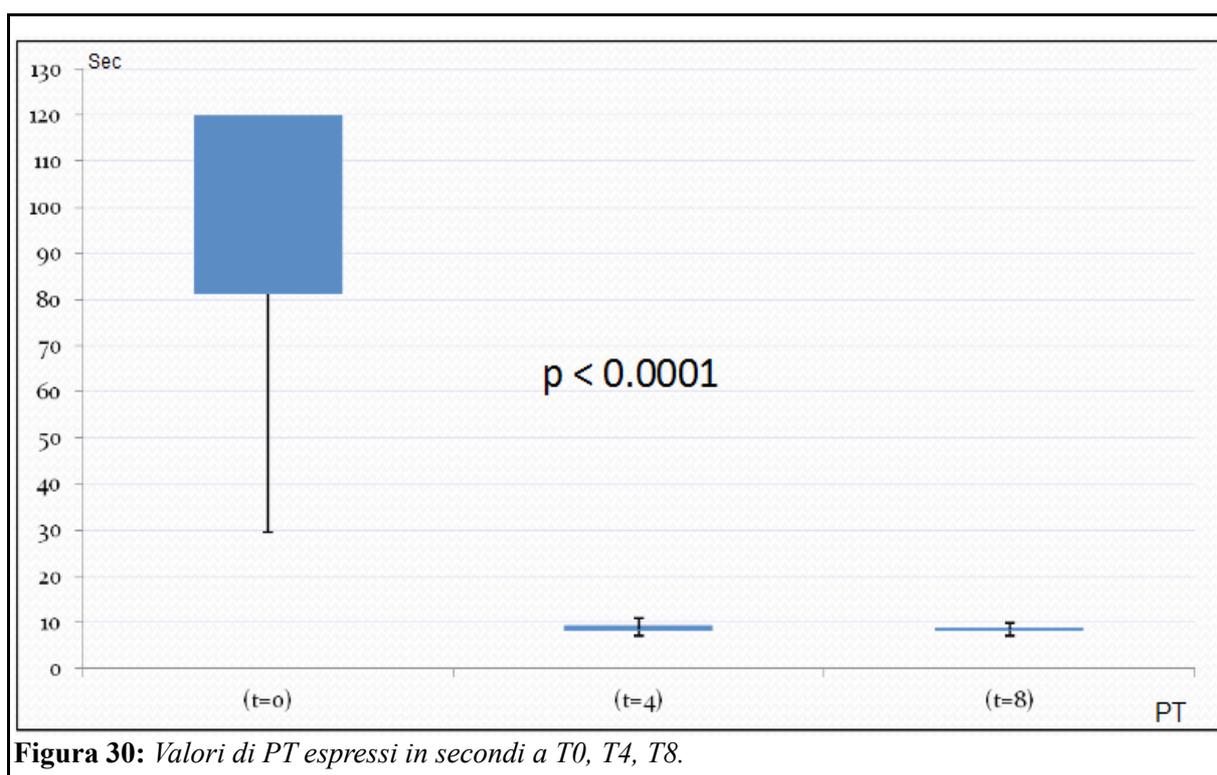
**Figura 29:** Valori di aPTT a T0, T4, T8.

## PT

Nessun soggetto presentava valori di PT all'interno del range di riferimento del Laboratorio San Marco (6,8 - 8,6 secondi).

In ingresso, a T0, il valore minimo era di 29,6 secondi e massimo 120 sec con una mediana di 120 sec. Molti soggetti avevano un PT > 120 sec ma per convenzione del laboratorio è stato inserito il valore massimo di 120 sec. Dopo quattro ore dalla terapia (T4) il valore minimo era di 7 secondi ed il massimo di 11,8 secondi, con una mediana di 8,5 secondi. Dopo otto ore dalla terapia (T8) il valore minimo era di 7,2 secondi ed il massimo di 10,5 secondi con una mediana di 8,5 secondi. I risultati a T8 sono stati ottenuti in 43 soggetti su 73.

	MIN	MAX
PT (range di rif)	6,8	8,6



### *Altri biomarker:*

Le alterazioni degli altri parametri esaminati in ingresso (T0) vengono di seguito riportate.

#### Piastrine

Il range del Laboratorio San Marco varia da 160 a 473 PLT 1000/ $\mu$ L. Sono stati rilevati 11 soggetti su 73 che presentavano piastrinopenia (sia dalla lettura strumentale che dalla stima a vetrino). Valore minimo di 85.000 ed un massimo di 151.000 plt1000/ $\mu$ L.

#### Fibrinogeno

Il range del Laboratorio San Marco è di 152-284 mg/dL. Il 23% dei soggetti (17) presentava un valore di fibrinogeno normale, mentre il 77% (56 soggetti) mostrava un incremento.

#### FDP's

Il range del Laboratorio San Marco, utilizzato al momento dello studio, considerava positivi i valori  $> 5 \mu\text{g/ml}$  e valori  $> 20 \mu\text{g/ml}$ . Sei soggetti presentavano valori  $>20 \mu\text{g/ml}$ .

#### D dimeri

Il range del Laboratorio San Marco è di 0,01-0,34  $\mu\text{g/ml}$ . Il 93% dei soggetti (68 cani) presentava valori all'interno del range soprariportato di riferimento, in 5 cani si è riscontrato un aumento: 0,74; 1,05; 1,79; 1,98; 4,24. Per i primi quattro valori si individuano le seguenti alterazioni concomitanti nel paziente: presenza di emoaddome ed emorragia polmonare mentre per l'ultimo prostatite.

#### Antitrombina (AT)

Il range del Laboratorio San Marco è di 110-167%. Questo dato era normale nell'83% dei soggetti (60 cani), diminuito in 12 cani ed aumentato in un soggetto.

## 7.4 Discussioni

I soggetti inclusi nello studio, 73 cani avvelenati da rodenticidi anticoagulanti, hanno mostrato risultati statisticamente significativi infatti i tempi della coagulazione (PT ed aPTT) dopo quattro ore dalla terapia endovenosa con vitamina K sono ritornati nella norma.

In alcuni soggetti con sanguinamenti di lieve entità rilevati al momento della valutazione clinica (a T0) dopo quattro ore (a T4) non è stata rilevata evidenza di emorragia. Nessuno dei soggetti ha richiesto l'utilizzo di terapia trasfusionale (sangue intero, plasma fresco o congelato).

Per quanto riguarda l'analisi degli altri biomarker, i nostri dati sono discordanti con quelli che si rinvengono in letteratura unicamente per il riscontro di trombocitopenia. A differenza infatti di altri Autori, Sheafor&Couto, 1999 e Waddel et al., 2013, il numero di soggetti che ha evidenziato una trombocitopenia nel nostro studio è limitato e quest'ultima può essere classificata come lieve-moderata. L'iperfibrinogenemia rilevata è correlata alla risposta dell'organismo all'infiammazione che, come argomentato nel capitolo precedente, in questo avvelenamento è intensa. Inoltre l'aumento degli FDP's potrebbe essere spiegato, come nell'uomo, dal fatto che gli anticoagulanti diminuiscono l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (Fareed et al., 1992). È interessante notare come altre patologie concomitanti all'avvelenamento possano aumentare i D dimeri e condurre erroneamente all'esclusione di questa intossicazione dal ventaglio delle diagnosi differenziali. L'antitrombina non subisce variazioni nella maggior parte dei soggetti e solo nel 16% è diminuita forse per effetto diluzionale.

Sulla base del monitoraggio clinico si può affermare che non si è verificata nessuna reazione avversa alla vitamina K durante le ore di permanenza in clinica (almeno quattro ore). Sebbene sia stato riportato che la terapia a 4 mg/kg per cinque giorni consecutivi abbia causato la formazione di

corpi di Heinz (Fernandez et al., 1984), non si è potuto esaminare l'emocromo di un numero significativo di pazienti dopo cinque giorni post terapia.

La totalità dei pazienti, 73 cani, è sopravvissuta ed è stata dimessa. Sono stati effettuati esami coagulativi di controllo dopo 21-28 giorni dall'inizio della terapia ( il prelievo è stato eseguito dopo 48-72 ore dall'ultima somministrazione orale di vitamina K) e nei soggetti che per svariati motivi non si sono presentati al controllo sono stati effettuati follow up telefonici atti a confermare che tutti i soggetti arruolati nello studio godevano di buona salute.

Dati emersi da ulteriori studi interni, ancora composti da una popolazione limitata, indicano che PT/aPTT rientrerebbero nel range di riferimento entro un'ora dalla somministrazione di vitamina k per via endovenosa. Questo dato, avvalorato dai dati statisticamente significativi dello studio presentato, rivoluzionerebbe la gestione di questo avvelamento in Medicina Veterinaria, sia da un punto di vista pratico (reperire gli emoderivati non è sempre facile, soprattutto in strutture che non riescono a produrseli), sia da un punto di vista economico (la vitamina K è molto meno costosa rispetto a qualsiasi emoderivato canino), sia da un punto di vista etico-professionale (scegliere la migliore soluzione terapeutica che sia anche la meno rischiosa per il paziente, infatti gli emoderivati possono provocare reazioni avverse).

Concludendo la terapia con vitamina K endovenosa a 5 mg/kg è sicura, poco costosa ed efficace nella risoluzione in tempi brevi della sintomatologia emorragica nel cane intossicato con composti ad azione anticoagulante.

## CONCLUSIONI

Questo lavoro di ricerca, grazie alla casistica riportata, conferma che l'avvelenamento da rodenticidi anticoagulanti è una delle intossicazioni più frequenti nel cane che il clinico medico può trovarsi a diagnosticare ed a gestire. Se nei soggetti con ingestione recente la gestione medica può essere meno complessa, i pazienti avvelenati molto spesso rappresentano un'emergenza perché portati a visita in condizioni critiche ed il proprietario non sempre sa essere lucido e fornire dati esaustivi durante la raccolta dell'anamnesi. Per questo motivo il clinico deve possedere capacità investigativa e sapere sfruttare gli strumenti diagnostici in suo possesso nel migliore dei modi.

Dallo studio epidemiologico della popolazione afferita in clinica sembrano essere più colpite le femmine di giovane età e normopeso. I composti più frequentemente coinvolti identificati mediante HPLC-MS/MS appartengono alla seconda generazione di cumarinici (flocoumafen, brodifacoum e bromadiolone) ed anche ai derivati dell'indadione (difacinone). Indurre l'emese nei soggetti che hanno ingerito il tossico in un tempo compreso tra 15 minuti e 4 ore può essere utile per decontaminare il tratto gastroenterico ma non dà la certezza di evitare l'assorbimento e prevenire così l'avvelenamento e la conseguente sintomatologia emorragica nel cane. Si consiglia quindi di eseguire un profilo coagulativo di controllo e se questo non fosse possibile è auspicabile instaurare da subito la terapia con vitamina K. L'esame tossicologico rappresenta la conferma diagnostica, sebbene mediante un esame coagulativo completo possa emergere il forte sospetto di avvelenamento.

La misurazione delle proteine di fase acuta, in particolar modo della CRP, può rappresentare un utile ausilio diagnostico in aggiunta ai tradizionali tempi della coagulazione per eseguire una valutazione d'insieme più completa dello stato di malattia.

Infatti se il valore di CRP è elevato il clinico può sospettare la presenza di emorragie cavitare e proporre di conseguenza accertamenti necessari per localizzare il sito di sanguinamento ed impostare tempestivamente un supporto terapeutico. Inoltre se i pazienti presentano segni clinici severi, come emorragie interne, la concentrazione di CRP all'ammissione può avere anche un valore prognostico. Infatti i soggetti con valori più elevati sono risultati essere più a rischio di decesso.

I risultati riguardanti la tempistica di normalizzazione dei biomarker coagulativi, PT ed aPTT, aprono un nuovo scenario sulla gestione terapeutica, limitando ove reputato di estrema necessità l'uso di emoderivati, e confermano la sicurezza dell'utilizzo di vitamina K1 per via endovenosa, infatti dopo quattro ore il soggetto avvelenato non è più a rischio di sanguinamento essendo il valore di PT tornato nel range di normalità.

Questo lavoro di ricerca quindi offre al clinico ulteriori strumenti diagnostici e concetti di “ Evidence Based Medicine”.

## BIBLIOGRAFIA

**Adelson E.** Fibrinogen and fibrin, their roles in health and disease. Normal metabolism. *Fed. Proc.* 1965 Jul-Aug;24(4):810-5. Review.

**Amorena M, Caloni F, Mengozzi G.** Epidemiology of intoxications in Italy. *Vet Res Commun.* 2004 Aug; 28 Suppl 1:89-95.

**Bajaj SP, Joist JH.** New insights into how blood clots: implications for the use of APTT and PT as coagulation screening tests and in monitoring of anticoagulant therapy. *Semin. Thromb. Hemost.*, 1999;25(4):407-18.

**Bauer N, Eralp O, Moritz A.** Reference intervals and methods optimization for variables reflecting hypo- and hypercoagulatory states in dogs using the STA Compact® automated analyser. *J Vet Diagn Invest* 2009;21:803–814.

**Beal MW, Doherty AM, Curcio K.** Peliosis hepatis and hemoperitoneum in a dog with difacinone intoxication. *J. Vet. Emerg. Crit. Care.*, 2008; 18 (4): 338-392.

**Begent LA, Hill AP, Steventon GB, Hutt AJ, Pallister CJ, Cowell DC.** Characterization and purification of the vitamin K1 2,3-epoxide reductases system from rat liver. *J. Pharm. Pharmacol.*, 2001; 53: 481-486.

**Berny P, Caloni F, Croubels S, Sachana M, Vandembroucke V, Davanzo F, Guitart R.** Animal poisoning in Europe. Part 2: Companion animals. *Vet. J.*, 2010. 183: 255-259.

**Binev R, Petkov P, Rusenov A.** Intoxication with anticoagulant rodenticide bromadiolone in a dog – a case report. *Vet. Arhiv.*, 2005; 75: 273-282.

**Blocker TL, Roberts BK.** Acute tracheal obstruction associated with AR intoxication in a dog. *J Small. Anim. Pract*, 1999;40:577–580.

**Boermans HJ, Johnstone I, Black WD, Murphy M.** Clinical signs, laboratory changes and toxicokinetics of brodifacoum in the horse. *Can. J. Vet. Res.*, 1991; 55.

**Boisvert AM, Swenson CL, Haines CJ.** Serum and plasma latex agglutination tests for detection of fibrinogen degradation products in clinically ill dogs, *Veterinary Clinical Pathology*, 2001, 30(3), 133-136.

**Bosse GM, Mallory MN, Malone GJ.** The safety of intravenously administered vitamin K. *Vet. Hum. Toxicol.*, 2002 Jun;44(3):174-6.

**Bovill EG, Tracy RP.** Fibrin(ogen) degradation products, *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw Hill, L104-L105.

**Bruynzeel I, Hebeda CL, Folkers E, Bruynzeel DP.** Cutaneous hypersensitivity reactions to vitamin K: 2 case reports and a review of the literature. *Contact Dermatitis*, 1995 Feb;32(2):78-82. Review.

**Buckle A.** Anticoagulant resistance in the United Kingdom and a new guideline for the management of resistant infestations of Norway rats (*Rattus norvegicus* Berk.). *Pest. Manag. Sci.*, 2013 Mar; 69(3):334-41.

**Bui L, Huynh T, Lam V.** Skin reaction to subcutaneous phytonadione injections. *Am. J. Health. Syst. Pharm.*, 2004 Feb 15;61(4):407.

**Burgess TM, Meyer EK, Bataller N.** Practitioner report involving intravenous use of vitamin K1 prompts label review and revision. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2001 Jun 1;218(11):1767-70.

**Caldin M, Furlanello T, Lubas G.** Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma, *Veterinary Clinical Pathology*, 2000, 29, 2: 51-54.

**Caldin M, Tasca S, Carli E, Bianchini S, Furlanello T, Martinez-Subiela S, Ceron JJ.** Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Vet. Clin. Pathol.*, 2009, 38, 1: 63–68.

**Caldin M, Furlanello T et al.** Sensitivity and specificity of citrated plasma FDP's and D-dimer in the diagnosis of the disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 1998.

**Caloni F, Cortinovis C, Rivolta M, Davanzo F.** Animal poisoning in Italy: 10 years of epidemiological data from the Poison Control Centre of Milan. *Vet. Rec.*, 2012 Apr 21;170(16):415.

**Card DJ, Gorska R, Cutler J, Harrington DJ.** Vitamin K metabolism: Current Knowledge and future research. *Mol. Nutr. Food. Res.*, 2013 Dec 27.

**Caspi D, Baltz ML, Snel F, Gruys E, Niv D, Batt RM, Munn EA, Buttress N, Pepys MB.** Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*. 1984 Oct;53(2):307-13.

**Caspi D, Snel FWJJ, Batt RM, et al.** C-reactive protein in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 1987; 48:919–921.

**Ceron J, Ohno K, Caldin M.** A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *The Veterinary Journal*, 2008, 177: 6–7.

**Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S.** Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary Clinical Pathology*, 2005, 34(2), 85-99.

**Chan DL, Rozanski EA, Freeman LM.** Relationship among plasma amino acids, C-Reactive protein, severity, and outcome in critically ill dogs. *J Vet Intern Med.* 2009; 23:559–563

**Cheng T, Mathews KA, Abrams-Ogg ACG, Wood RD.** Relationship between assays of inflammation and coagulation: a novel interpretation of the canine activated clotting time. *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 2008, 73, 97-102.

**Clauss A.** Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol.*, 1957 Apr;17(4):237-46.

**Conner JG, Eckersall PD, Ferguson J, Douglas TA.** Acute phase response in the dog following surgical trauma. *Research in Veterinary Science* 1988a, 45: 107-110.

**Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Aitchison TC, Douglas TA.** Bovine acute phase response following turpentine injection. *Research in Veterinary Science* 1988b, 44: 12182-88.

**Couto CG, Cerón JJ, Parra MD, Martínez-Subiela S, Iazbik MC.** Acute phase protein concentrations in retired racing Greyhounds. *Vet. Clin. Pathol.*, 2009, 38: 219-23.

**Cray C, Zaias J, Altman NH.** Acute Phase Response in Animals: A Review. *Comp. Med.*, 2009, 59, 6: 517-26.

**Crowther MA, Julian J, McCarty D, Douketis J, Kovacs M, Biagoni L, Schnurr T, McGinnis J, Gent M, Hirsh J, Ginsberg J.** Treatment of warfarin-associated coagulopathy with oral vitamin K: a randomised controlled trial. *Lancet.*, 2000; 356: 1551-1553.

**Di Napoli M, Parry-Jones AR, Smith CJ, Hopkins SJ, Slevin M, Masotti L, Campi V, Singh P, Papa F, Popa-Wagner A, Tudorica V, Godoy DA.** C-reactive protein predicts hematoma growth in intracerebral hemorrhage. *Stroke*, 2014 Jan;45(1):59-65.

**DuVall MD, Murphy MJ, Ray AC, Reagor JC.** Case studies on secondgeneration anticoagulant rodenticide toxicities in nontarget species. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 1989;1:66–8.

**Eason CT, Murphy EC, Wright GR, Spurr EB.** Assessment of risks of brodifacoum to non-target birds and mammals in New Zealand. *Ecotoxicology*, 2002; 11: 35-48.

**Eckersall PD.** Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Revue de Medecine Veterinaire*, 2000;151: 577- 584.

**Eckersall ED & Bell R.** Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine. *The Veterinary Journal*. 2010, 185: 23–27.

**Eckersall PD, Conner JG.** Bovine and canine acute phase proteins. *Veterinary Research communications*. 1988; 12: 169-178.

**Eckersall PD, Conner JG, Harvie J.** An immunoturbidimetric assay for canine Creactive protein. *Vet. Res. Comm.*, 1991;15: 17-24.

**Eckersall PD, Duthie S, Safi S, Moffat D, Horagoda NU, Doyle S, Parton R, Bennett D, Fitzpatrick JL.** An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of interference from albumin. *Comp. Haematol. Int.*, 1999; 5: 117–124.

**Eckersall PD, Duthie S, Toussaint MJ, Gruys E, Heegaard P, Alava M, Lipperheide C, Madec F.** Standardization of diagnostic assays for animal acute phase proteins. *Adv. Vet. Med.*, 1999; 41: 643-55.

**Eckersall PD, Saini PK, McComb C.** The acute phase response of acid-soluble glycoprotein, alpha(1)-Acid glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and Creactive protein, in the pig. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 1996; 51: 377-385.

**Eklund CM.** Proinflammatory Cytokines in CRP Baseline Regulation. *Advances in Clinical Chemistry*, 2008, 48, 111-136.

**Endepols S, Klemann N, Pelz HJ, Ziebell, KL.** A scheme for the placement of rodenticide baits for rat eradication on confinement livestock farms. *Prev. Vet. Med.*, 2003; 58: 115-123.

**Esmon CT.** Inflammation and thrombosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2003; 1, 1343-1348.

**Esther A, Endepols S, Freise J, Klemann N, Runge M, Pelz HJ.** Rodenticide resistance and consequences. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*, 2014 May;57(5):519-23.

**Fareed J, Hoppenstedt D, Bick RL, Bacher P.** Drug-induced alterations of hemostasis and fibrinolysis. *Hem. Onc. Clin. N. Am.*, 1992;6:1229–45.

**Fernandez FR, Davies AP, Teachout DJ, Krake A, Christopher MM, Perman V.** Vitamin K-induced Heinz body formation in dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1984;20:711–20.

**Fourel I, Hugnet C, Goy-Thollot I, Berny P.** Validation of a new liquid chromatography- tandem mass spectrometry ion-trap technique for the simultaneous determination of thirteen anticoagulant rodenticides, drugs, or natural products. *J. Anal. Toxicol.*, 2010 Mar ;34(2):95-102.

**Fourrier F.** Hemostasis disorders in severe infections: state of the art. *Med. Mal. Infect.*, 2006; 36(6), 304-313.

**Furlanello T, Caldin M, Fiorio F.** Primary Hyperfibrinolysis in the dog. *Vet. Clin. Pathol.*, 2005; 34 suppl, 293.

**Furlanello T, Caldin M, Stocco A, Tudone E, Tranquillo V, Lubas G, Solano-Gallego L.** Stability of stored canine plasma for hemostasis testing. *Veterinary Clinical Pathology*, 2006; 35(2), 204-207.

**Gaffney PJ, Edgell T, Creighton-Kempford LJ, Wheeler S, Tarelli E.** Fibrin degradation product (FnDP) assays: analysis of standardization issues and target antigens in plasma. *Br. J. Haematol.*, 1995 May; 90 (1):187-94.

**Giuliano Albo A, Nebbia C.** Incidence of poisonings in domestic carnivores in Italy. *Vet. Res. Commun.*, 2004 Aug;28 Suppl 1:83-8.

**Giorgi M, Naso B.** Laboratory diagnostic examinations in veterinary toxicology. *Vet. Res. Commun.*, 2004 Aug;28 Suppl 1:103-6.

**Goodmann & Gilman's** The Pharmacological Basis of Therapeutics 12<sup>th</sup> Edition

**Grand M,** Experimental results on a new anticoagulant rodenticide, bromadiolone. *Phytiatric-Phytopharmacie* 1976, 25:69-88.

**Grobosch T, Angelow B, Schönberg L, Lampe DJ.** Acute bromadiolone intoxication. *Anal. Toxicol.*, 2006 May;30(4):281-6.

**Hansen N, Beck C.** Bilateral hydronephrosis secondary to anticoagulant rodenticide intoxication in a dog. *J. Vet. Emerg. Crit. Care*, 2003; 13: 103-107.

**Hanslik T, Prinseau J.** The use of vitamin K in patients on anticoagulant therapy: a practical guide. *Am. J. Cardiovasc. Drugs*, 2004; 4: 43-55.

**Harvey JW.** Iron Metabolism and Its Disorders, in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6th Edition), Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML (Eds), Elsevier, 2008a, 259-285.

**Hickey M, Gatien M, Taljaard M, Aujnarain A, Giulivi A, Perry JJ.** Outcomes of urgent warfarin reversal with frozen plasma versus prothrombin complex concentrate in the emergency department. *Circulation*, 2013 Jul 23;128(4):360-4.

**Hillström A, Hagman R, Tvedten H, Kjelgaard-Hansen.** Validation of commercially available automated canine-specific immunoturbidimetric method for measuring canine C-reactive protein. *Vet. Clin. Pathol.*, 2014 May 5.

**Hirsh J, Dalen J, Anderson DR, Poller L, Bussey H, Deykin D.** Oral anticoagulants: mechanism of action, clinical effectiveness, and optimal therapeutic range. *Chest.*, 2001;119:8-21.

**Holbrook AM, Pereira JA, Labiris R, McDonald H, Douketis JD, Crowther M.** et al. Systematic overview of warfarin and its drug and food interactions. *Arch. Intern. Med.*, 2005;165:1095–1106.

**Jethava A, Mathew J, Dasanu CA.** Anaphylactic reactions with intravenous vitamin K: lessons from the bedside. Bolahyrli M et al., C-reactive protein as an acute phase protein in cancer patients. *Med. Oncol.*, 2007, 24: 338–344.

**Jialal I, Devaraj S.** Modulation of Biomarkers of Inflammation, in *Clinical Lipidology, A Companion to Braunwald's Heart Disease* Edited by: Christie M. Ballantyne, 2009, 396-409.

**Jones A, Geczy CL.** Thrombin and factor Xa enhance the production of interleukin-1. *Immunology*, 1990 Oct;71(2):236-41.

**Kao PC, Shiesh SC, Wu TJ.** Serum C-reactive protein as a marker of wellness assessment. *Am. Clin. Lab. Sci.*, 2006; 36: 163-169.

**Kato H.** Regulation of functions of vascular wall cells by tissue factor pathway inhibitor: basic and clinical aspects. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2002 Apr 1;22(4):539-48. Review.

**Kitchens CS.** Prolonged activated partial thromboplastin time of unknown etiology: a prospective study of 100 consecutive cases referred for consultation.

*Am. J. Hematol.*, 1988 Jan;27(1):38-45.

**Kjelgaard-Hansen M & Jacobsen S.** Assay Validation and Diagnostic Applications of Major Acute-phase Protein Testing in Companion Animals, *Clin. Lab. Med.*, 2011 Mar;31(1):51-70.

**Kjelgaard-Hansen M.** The Benefits of using Canine C-Reactive Protein Routinely – Diagnostic and Monitoring Aspects, Proceedings of the XX ECVIM Congress, 2010 (CD).

**Klenner S, Bauer N, Moritz A.** Evaluation of three automated human immunoturbidimetric assays for the detection of C-reactive protein in dogs, *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2010, 22: 544–552.

**Klinger M.H.F., Jelkmann W.** Role of blood platelets in infection and inflammation. *Journal of interferon & cytokine research*, 2002, 22, 913-922.

**Kohn B, Weingart C, Giger U.** Haemorrhage in seven cats with suspected anticoagulant rodenticide intoxication. *J. Feline Med. Surg.*, 2003; 5: 295-304.

**Kop WJ, Weinstein AA.** C-Reactive Protein, in *Encyclopedia of Stress* (2nd Ed), Fink G (Ed), Elsevier, 2007, 653-658.

**Kovesdy CP, Lee GH, Kalantar-Zadeh K.** Serum Ferritin: Deceptively Simple or Simply Deceptive? Lessons Learned From Iron Therapy in Patients With Chronic Kidney Disease, *Journal of Pharmacy Practice*, 2008, 21, 6, 411-419.

**Larsen TR, Gelaye A, Durando C.** Acute warfarin toxicity: An unanticipated consequence of amoxicillin/clavulanate administration. *Am. J. Case. Rep.*, 2014 Jan 27;15:45-8.

**Laubscher B, Bänziger O, Schubiger G.** Prevention of vitamin K deficiency bleeding with three oral mixed micellar phylloquinone doses: results of a 6-year

(2005-2011) surveillance in Switzerland. Swiss Paediatric Surveillance Unit (SPSU). *Eur J Pediatr.*, 2013 Mar;172(3):357-60.

**Levi M, Meijers JC.** DIC: Which laboratory tests are most useful. *Blood Reviews*, 2011, 25, 33-37.

**Levi M, van der Poll T, Büller HR.** Bidirectional relation between inflammation and coagulation. *Circulation*, 2004, 109, 2698-2704.

**Lewis DC, Bruyette DS, Kellerman DL, Smith SA.** Thrombocytopenia in dogs with anticoagulant rodenticide-induced hemorrhage: eight cases (1990-1995). *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1997; 33: 417-422.

**Li T, Chang CY, Jin DY, Lin PJ, Khvorova A, Stafford DW.** Identification of the gene for vitamin K epoxide reductase. *Nature*, 2004;427(6974):541-544.

**Litovitz, T.L., Klein-Schwartz, W., Dyer, K.S., Shannon, M., Lee, S.** Powers, M, 1997 annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. *Am. J. Emerg. Med.*, 1998; 16: 443-497.

**Lo VM, Ching CK, Chan AY, Mak TW.** Bromadiolone toxicokinetics: diagnosis and treatment implications. *Clin. Toxicol. (Phila)*, 2008 Sep;46(8):703.

**Lominadze D, Dean WL, Tyagi SC, Roberts AM.** Mechanisms of fibrinogen-induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease. *Acta Physiol (Oxf)*, 2010, 198(1), 1-13.

**Lowe GD.** Fibrin D-dimer and cardiovascular risk. *Semin. Vasc. Med.*, 2005 Nov;5(4):387-98. Review.

**Lutze G, Römhild W, Elwert J, Leppelt J, Kutschmann K.** Case report.

Phenprocoumon as an unusual reason for coumarin poisoning in a dog. *Dtsch. Tierarztl. Wochenschr.*, 2003; 110: 31-33.

**Mansfield CS, James FE, Robertson ID.** Clinical severity index for dogs with acute pancreatitis. *JAVMA*. 2008; 233:936-944.

**Marek LJ, Koskinen WC.** Multiresidue analysis of seven anticoagulant rodenticides by high-performance liquid chromatography/electrospray/mass spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.*, 2007 Feb 7;55(3):571-6.

**Marinova M, Lütjohann D, Breuer O, Kölsch H, Westhofen P, Watzka M, Mengel M, Stoffel-Wagner B, Hartmann G, Coch C, Oldenburg J.** VKORC1-dependent pharmacokinetics of intravenous and oral phylloquinone (vitamin K1) mixed micelles formulation. *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, 2013; 69:467–475.

**Maroni, M, Colosio, C, Ferioli A, Fait A.** Biological monitoring of pesticide exposure: a review. *Toxicology*, 2000; 143: 1-118.

**Martinez-Subiela S, Ceron JJ.** Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirrubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Can. Vet. J.*, 2005; 46: 625-9.

**McConnico RS, Copedge K, Bischoff KL.** Brodifacoum toxicosis in two horses. *J. Am. Vet. Med.Assoc.*, 1997; 211: 882-886.

**McGrotty YL, Knottenbelt CM, Ramsey IK, Reid SWJ, Eckersall PD.** Haptoglobin concentrations in a canine hospital population. *The Veterinary Record*, 2003; 152: 562-564.

**Meesters EW, Hansen H, Spronk HM, Hamulyak K, Rosing J, Rowshani AT, Berge IJ, Cate H.** The inflammation and coagulation cross-talk in patients with

systemic lupus erythematosus. *Blood Coagul. Fibrinolysis*, 2007 Jan;18(1):21-8.

**Mischke R.** Activated partial thromboplastin time as a screening test of minor or moderate coagulation factor deficiencies for canine plasma: sensitivity of different commercial reagents. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2000, 12, 433-437.

**Mischke R.** Evaluation of a prothrombin time optimized for the dog on plasmas with defined coagulation factor deficiency due to coumarin intoxication. *Zentralbl. Veterinarmed. A*, 1995; 42:589-599.

**Mischke R.** Effect of reagent batch on activated partial thromboplastin time in canine plasma and use of the ratio system for standardization. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 2002, 115(5-6), 225-229.

**Mischke R., Nolte I.** Optimization of prothrombin time measurements in canine plasma. *American Journal of Veterinary Research*, 1997, 58(3), 236-241.

**Mount ME.** Diagnosis and therapy of anticoagulant rodenticide intoxication. *Vet. Clin. N. Am. Sm. Anim. Pract.*, 1988;18:115–30.

**Mount ME, Feldman BF.** Mechanism of diphacinone rodenticide toxicosis in the dog and its therapeutic implications. *Am. J. Vet. Res.*, 1983;44:2009–17.

**Mount ME, Kass PH.** Diagnostic importance of vitamin K1 and its epoxide measured in serum of dogs exposed to an anticoagulant rodenticide. *Am. J. Vet. Res.*, 1989;50:1704–9.

**Mount ME, Kim BU, Kass PH.** Use of a test for proteins induced by vitamin K absence or antagonism in diagnosis of anticoagulant poisoning in dogs: 325 cases (1987–1997). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2003; 222: 194-198.

**Murphy MJ.** Rodenticides. *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.*,

2002;32:469–484.

**Murphy MJ, Gerken DF.** The anticoagulant rodenticides. *Kirk RW, ed. Current veterinary therapy IX: small animal practice. Philadelphia: WB Saunders, 1989:143.*

**Newman P, Shearer MJ.** Vitamin K metabolism. *Subcell. Biochem., 1998;30:455-88.* Review.

**Odén A, Fahlén M.** Oral anticoagulation and risk of death: a medical record linkage study. *BMJ.* 2002;325:1073–1075.

**Pacthinger GE, Otto CM, Syring RS.** Incidence of prolonged prothrombin time in dogs following gastrointestinal decontamination for acute anticoagulant rodenticide ingestion. *J. Vet. Emerg. Crit. Care., 2008;18:285–291.*

**Padgett SL, Stokes JE, Tucker RL, et al.** Hematometra secondary to anticoagulant rodenticide toxicity. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc., 1997;33:417–422.*

**Paramo JA, Rodriguez JA, Orbe J.** Fibrinogen. An old hemostatic protein with a new function: non-invasive marker of subclinical atherosclerosis. *Medicina Clinica, 2005: 124: 790-794.*

**Parra MD, Ceron JJ.** Effects of haemolysis, lipaemia and bilirubinaemia in canine C-reactive protein and haptoglobin determination by time-resolved fluorometry: short communication. *Acta Vet Hung, 2007;55: 295-9.*

**Parra MD, Papasouliotis K, Ceron JJ.** Concentrations of C-reactive protein in effusions in dogs. *Veterinary Record, 2006: 158:-757.*

**Parra MD, Tecles F, Martinez-Subiela S, Ceron JJ.** C-reactive protein measurement in canine saliva. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 2005; 17: 139–144.

**Parra MD, Tuomola M, Cabezas-Herrera J, Ceron JJ.** Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Vet. Res. Commun.*, 2006; 30: 113-26.

**Pereira SP, Williams R.** Adverse events associated with vitamin K1: results of a worldwide postmarketing surveillance programme. *Conn. Med.*, 2012 Oct;76(9):549.

**Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH.** Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet. Res.*, 2004; 35: 163-187.

**Petersen HH, Nielsen JP, Jensen AL, Heegaard PMH.** Evaluation of an Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA) for Determination of Porcine Haptoglobin, *J. Vet. Med. Ser. 2001; A* 48: 513–523.

**Peterson J, Streeter V.** Laryngeal obstruction secondary to brodifacoum toxicosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1996;208:352–5.

**Petrus DJ, Henik RA.** Pericardial effusion and cardiac tamponade secondary to brodifacoum toxicosis in a dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1999;215:647–648.

**Petterino C, Paolo B.** Toxicology of various anticoagulant rodenticides in animals. *Vet. Hum. Toxicol.*, 2001; 43: 353-360.

**Petterino C, Paolo B, Tristo G.** Clinical and pathological features of anticoagulant rodenticide intoxications in dogs. *Vet. Hum. Toxicol.*, 2004; 46: 70-75.

**Putnam FW.** Haptoglobin, in: Putnam F.W. (Ed.), *The plasma proteins*,

Academic Press, 1975.

**Rathbun SW, Whitsett TL, Raskob GE.** Negative D-dimer result to exclude recurrent deep venous thrombosis: a management trial. *Ann. Intern. Med.*, 2004a Dec 7;141(11):839-45.

**Rathbun SW, Whitsett TL, Vesely SK, Raskob GE.** Clinical utility of D-dimer in patients with suspected pulmonary embolism and nondiagnostic lung scans or negative CT findings. *Chest.* 2004b Mar;125(3):851-5.

**Riegert-Johnson DL, Volcheck GW.** The incidence of anaphylaxis following intravenous phytonadione (vitamin K1): a 5-year retrospective review. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2002 Oct;89(4):400-6.

**Rikihisa Y, Yamamoto S, Kwak I, Iqbal Z, Kociba G, Mott J, Chichanasiriwithaya W.** C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 912-7, 1994.

**Riley RF, Zontine W.** Further observations on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J. Lab. clin. Med.*, 1972; 80, 698.

**Robey FA, Jones KD, Steinberg AD.** C-reactive protein mediates the solubilization of nuclear DNA by complement in vitro. *J. Exp. Med.*, 1985;161: 1344-56.

**Robben JH, Kuijper EA, Mout HC.** Plasma superwarfarin levels and vitamin K1 treatment in dogs with anticoagulant rodenticide poisoning. *Vet. Q.*, 1998; 20: 24-27.

**Robben JH, Mout HC, Kuijpers EA.** Anticoagulant rodenticide poisoning in dogs in the Netherlands. *Tijdschr. Diergeneeskd.*, 1997; 122: 466-471.

**Robbins e Cotran.** Alterazioni emodinamiche, malattia trombo embolica, shock. *Le basi patologiche delle malattie*, settima edizione, Elsevier, 124-130.

**Robertson KA, Hutchison SMW.** Assessment of iron status and the role for iron-replacement therapy in anaemic cancer patients under the care of a specialist palliative care unit, *Palliative Medicine*, 2009, 23, 5: 406-409.

**Rost S, Fregin A, Ivaskevicius V, et al.** Mutations in VKORC1 cause warfarin resistance and multiple coagulation factor deficiency type 2. *Nature*, 2004;427(6974):537-541.

**Rutherford RB, Hardaway RM 3rd.** Significance of the rate of decrease in fibrinogen level after total hepatectomy in dogs. *Ann .Surg.* 1966 Jan;163(1):51-9.

**Sage M, Fourel I, Cœurassier M, Barrat J, Berny P, Giraudoux P.** Determination of bromadiolone residues in fox faeces by LC/ESI-MS in relationship with toxicological data and clinical signs after repeated exposure. *Environ. Res.*, 2010 Oct;110(7):664-74.

**Savage D, Lindenbaum J.** Clinical and experimental human vitamin K deficiency. 1983:271-320.

**Schulman A, Lusk R, Lippincott CL, Ettinger SJ.** Diphacinone-induced coagulopathy in the dog. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 1986;188:402-5.

**Schwedler SB, Filep JG, Galle J, Wanner C, Potempa LA.** C-Reactive Protein: A Family of Proteins to Regulate Cardiovascular Function. *American*

*Journal of Kidney Diseases*, 2006, 47, 2: 212-222.

**Semeraro N, Colucci M.** Tissue factor in health and disease. *Thromb. Haemost.*, 1997 Jul;78(1):759-64. Review.

**Sheafor SE, Couto CG.** Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 1999; 35: 38-46.

**Shearer MJ, Newman P.** Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thromb. Haemos.*, 2008 Oct;100(4):530-47.

**Shearer MJ.** Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2000 Nov; 3(6):433-8.

**Sheen SR, Spiller HA, Grossman D.** Symptomatic brodifacoum ingestion requiring high-dose phytonadione therapy. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1994 Jun;36(3):216-7.

**Spiller HA, Gallenstein GL, Murphy MJ.** Dermal absorption of a liquid diphacinone rodenticide causing coagulaopathy. *Vet. Hum. Toxicol.*, 2003; 45: 313-314.

**Steensma A, Beaman JA, Walters DG, Price RJ, Lake BG.** Metabolism of coumarin and 7-ethoxycoumarin by rat, mouse, guinea pig, cynomolgus monkey and human precision-cut liver slices. *Xenobiotica*, 1994; 24: 893-907.

**Stewart L, Daly BM.** A localized cutaneous reaction to vitamin K injection in a neonate. *Clin Exp Dermatol.*, 2009 Dec;34(8):939-40.

**Stokol T, Brooks MB, Erb HN, Mauldin GE.** D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation. *American Journal of Veterinary Research*, 2000; 61(4), 393-398.

**Szaba FM, Smiley ST.** Roles for thrombin and fibrin(ogen) in cytokine/chemokine production and macrophage adhesion in vivo. *Blood*, 2002 Feb 1;99(3):1053-9.

**Tagata K, Yokoyama S, Ginbo T, Honda M, Okimura T, Odakura M, Nomura M, Yamamoto S.** Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Vet. Res. Commun.* 1996; 20: 21-30.

**Tazarourte K, Riou B, Tremey B, Samama CM, Vicaut E, Vigué B.** Guideline-concordant administration of prothrombin complex concentrate and vitamin K is associated with decreased mortality in patients with severe bleeding under vitamin K antagonist treatment (EPAHK study). *Crit. Care.*, 2014 Apr 24.

**Tecles F, Tvarijonavičiute A, Caldín M, Martínez-Subiela S, Cerón JJ.** An automated turbidimetric method for fibrinogen determination in dogs. *Vet. Clin. Pathol.*, 2014 Mar 3; in press.

**Valchev I , Binev R, Yordanova V, Nikolov Y.** Anticoagulant Rodenticide Intoxication in Animals- A review. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 2008; 32(4): 237-243.

**Vandenbroucke V, Desmet N, De Backer P, Croubels S.** Multi-residue analysis of eight anticoagulant rodenticides in animal plasma and liver using liquid chromatography combined with heated electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 2008 Jun 15; 869(1-2):101-10.

**Waddell LS, Poppenga RH, Drobatz KJ.** Anticoagulant rodenticide screening in dogs: 123 cases (1996-2003). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 2013 Feb 15;242(4):516-21.

**Weidmeyer CE, Solter PE.** Validation of human haptoglobin immunoturbidimetric detection of haptoglobin in equine and canine serum and plasma. *Vet. Clin. Pathl.*, 1996; 25:141-146.

**Weiss DJ,** Iron and Copper Deficiencies and Disorders of Iron Metabolism, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6th Ed., (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 167-171.

**Wilkins K, DeKoven J, Assaad D.** Cutaneous reactions associated with vitamin K1. *J. Cutan. Med. Surg.*, 2000 Jul;4(3):164-8.

**Woody BJ, Murphy MJ, Ray AC, Green RA.** Coagulopathic effects and therapy of brodifacoum toxicosis in dogs. *J. Vet. Int. Med.*, 1992;6:23–8.

**Wu XR, Church JM, Jarrar A, Liang J, Kalady MF.** Risk factors for delayed postpolypectomy bleeding: how to minimize your patients' risk. *Int. J Colorectal. Dis.*, 2013 Aug;28(8):1127-34.

**Wurzinger LJ.** Histophysiology of the circulating platelet. *Adv. Anat. Embryol. Cell. Biol.*, 1990;120:1-96. Review.

**Yamamoto S, Shida T, Honda M, Ashida Y, Rikihisa Y, Odakura M, Hayashi S, Nomura M, Isayama Y.** Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with *Bordetella Bronchiseptica* (Phase 1 Cells). *Veterinary Research Communications*, 1974; 18: 347-357.

**Yuki M, Itoh H, Takase K.** Serum alpha-1-acid glycoprotein concentration in clinically healthy puppies and adult dogs and in dogs with various diseases. *Vet. Clin. Pathol.*, 2010; 39: 65-71.

**Zivelin A, Rao LV, Rapaport SI.** Mechanism of the anticoagulant effect of warfarin as evaluated in rabbits by selective depression of individual procoagulant vitamin Kdependent clotting factors. *J. Clin. Invest.*, 1993; 92: 2131- 2140.

**Zoia A, Augusto M, Drigo M, Caldin M.** Hypofibrinogenemia with discordant results between elevated FDP's and normal D-dimer in dogs with ascites due to right-sided congestive heart failure. *JAVMA*, 2012; 241 (10): 1336-1343.