

Alma Mater Studiorum - Università di Bologna

Dottorato in Diagnostica Collaterale in Medicina Interna Veterinaria

Ciclo XXII

Settore scientifico disciplinare VET/08

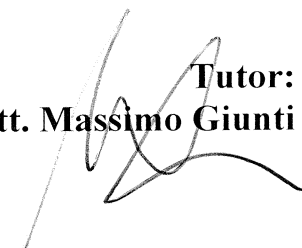
**VALUTAZIONE PROGNOSTICA DI INDICATORI CLINICI E
MARKER DI FLOGOSI IN CORSO DI PARVOVIROSI CANINA**

**Tesi di dottorato di:
Dott.ssa Eva Sala Gutiérrez**

**Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Paolo Famigli
Bergamini**



**Tutor:
Dott. Massimo Giunti**



Esame finale anno 2010

SOMMARIO

SOMMARIO	3
INTRODUZIONE	9
1 L'INFIAMMAZIONE	15
1.1 IL PROCESSO INFIAMMATORIO	15
1.2 LA RISPOSTA IMMUNITARIA	16
1.2.1 IMMUNITÀ NATURALE O INNATA	16
1.2.2 IMMUNITÀ SPECIFICA	16
1.3 COMPONENTI DELL'IMMUNITÀ INNATA	18
1.3.1 BARRIERE FISICHE	18
1.3.2 LE CELLULE SENTINELLA	19
1.3.2.1 Granulociti neutrofilo	19
1.3.2.2 Fagociti mononucleati	21
1.3.2.3 Cellule Dendritiche (DCs)	22
1.3.2.4 Mastociti	23
1.3.2.5 Linfociti <i>Natural Killer</i> (NK)	24
1.3.2.6 Sistema del complemento	24
1.3.3 I PRODOTTI DELLE CELLULE SENTINELLA	25
1.3.3.1 Le Citochine	25
1.3.3.2 Funzioni delle Citochine	27
1.3.3.3 PRINCIPALI CITOCHINE	29
1.3.3.4 Le Chemochine	31
1.3.4 LE PROTEINE DI FASE ACUTA o APPs	32
1.3.4.1 Organi di Sintesi delle APPs	32
1.3.4.2 Classificazione delle APPs	33
1.3.4.3 Le APPs Positive	37
1.3.4.4 Le APPs Negative	46
1.4 FASI DEL PROCESSO INFIAMMATORIO	47
1.4.1 RICONOSCIMENTO DEI PATOGENI	47
1.4.1.1 Toll-Like Receptors (TLRs)	48
1.4.1.2 Nod-Like Receptors (NLRs)	50
1.4.1.3 Rig-Like Receptors (RLRs)	50
1.4.2 RECLUTAMENTO	50
1.4.3 RIMOZIONE	52
1.4.4 RISOLUZIONE	52
1.5 RISPOSTA DI FASE ACUTA	54
2 LA SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA	61
2.1 LA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA	61
2.2 SEPSIS E SIRS	62
2.3 NUOVI CRITERI DIAGNOSTICI PER LA SEPSI	65
2.4 IL SISTEMA PIRO	66
2.5 BIOMARKER	70
2.5.1 MARKERS DI SIRS/SEPSIS	71
2.5.1.1 Proteina C- Reattiva	72
2.5.1.2 Le Citochine	73

2.5.1.3	La Procalcitonina (PCT).....	75
3	LA SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA IN MEDICINA VETERINARIA.....	81
3.1	LA SIRS NEL CANE.....	81
3.2	IL SISTEMA PIRO NEL CANE.....	82
3.3	LE APPS IN MEDICINA VETERINARIA.....	86
3.4	APPLICAZIONE CLINICA DELLE APPS COME MARKER DI MALATTIA.....	88
3.4.1	APPs VS ALTRI MARKER DI INFIAMMAZIONE.....	88
3.4.2	FATTORI CHE POSSONO INFLUENZARE I RISULTATI.....	91
3.4.2.1	Stoccaggio.....	91
3.4.2.2	Anticoagulanti.....	91
3.4.2.3	Emolisi, lipemia e bilirubinemia.....	92
3.5	DIAGNOSI E MONITORAGGIO DI MALATTIE.....	94
3.5.1.1	MALATTIE INFETTIVE.....	95
3.5.2	Chirurgia/ Interventi chirurgici.....	99
3.5.3	Malattie gastrointestinali.....	99
3.5.4	Patologie autoimmuni.....	100
3.5.5	Malattie endocrine.....	101
3.5.6	Neoplasie.....	101
3.6	ALTRE APPLICAZIONI DELLE APPS.....	104
3.7	LIMITAZIONI DELL'UTILIZZO DELLE APPS PER MONITORARE LE TERAPIE.....	105
3.8	LINEE GUIDA PER IL CORRETTO UTILIZZO DELLE APPS.....	106
4	LA PARVOVIROSI CANINA.....	111
4.1	INTRODUZIONE.....	111
4.2	EZIOLOGIA DELLA PARVOVIROSI.....	113
4.3	EPIDEMIOLOGIA.....	114
4.4	FATTORI PREDISPONENTI.....	114
4.5	TRASMISSIONE E PATOGENESI DELLA PARVOVIROSI.....	116
4.6	SINTOMATOLOGIA CLINICA.....	117
4.6.1	FORMA ENTERICA.....	118
4.7	MANIFESTAZIONI SISTEMICHE DELLA PARVOVIROSI.....	119
4.8	DIAGNOSI.....	121
4.9	TRATTAMENTO.....	122
4.9.1	FLUIDOTERAPIA: Rianimazione e mantenimento.....	123
4.9.2	ANTIBIOTICOTERAPIA.....	124
4.9.3	ANTIEMETICI.....	125
4.9.4	IMMUNOTERAPIA.....	127
4.9.5	NUTRIZIONE.....	127
4.10	FATTORI PROGNOSTICI.....	128
4.11	PREVENZIONE.....	129
4.12	IMMUNITÀ.....	130
4.12.1	IMMUNITÀ NATURALE.....	130
4.12.1.1	Immunità passiva naturale.....	130
4.12.1.2	Immunità naturale attiva.....	131
4.12.2	IMMUNITÀ ARTIFICIALE.....	132
4.12.2.1	Immunità attiva artificiale.....	132
4.13	LA PARVOVIROSI COME MODELLO ANIMALE DI SEPSI.....	133
4.14	IL SISTEMA PIRO NELLA PARVOVIROSI CANINA.....	135
5	MATERIALI E METODI.....	143
5.1	OBIETTIVO DELLO STUDIO.....	143
5.2	CRITERI DI INCLUSIONE E POPOLAZIONE IN STUDIO.....	143

5.2.1.1	Animali	143
5.2.1.2	Disegno sperimentale	144
5.3	CONFERMA DIAGNOSTICA DI PARVOVIROSI	145
5.4	RACCOLTA DEI CAMPIONI EMATICI	145
5.4.1.1	Modalità di Prelievo	145
5.4.1.2	Processazione e Conservazione dei Campioni	146
5.5	DETERMINAZIONI	147
5.5.1	<i>Esame Emocromocitometrico</i>	147
5.5.2	<i>Proteine di Fase Acuta</i>	147
5.5.2.1	Aptoglobina	147
5.5.2.2	Proteina C Reattiva (CRP)	149
5.5.2.3	Ferritina	150
5.5.2.4	Fibrinogeno	155
5.5.2.5	Tranferrina	156
5.5.2.6	Albumina	159
5.6	ANALISI STATISTICA	159
6	RISULTATI	163
6.1	STUDIO DELLA POPOLAZIONE IN BASE AI CRITERI SIRS	184
6.2	STUDIO DELLA POPOLAZIONE IN BASE AI <i>CUT OFF</i>	186
6.2.1	<i>Cut off proteina c reattiva</i>	186
6.2.2	<i>Cut off Albumina</i>	193
6.2.3	<i>Cut off Score clinico</i>	198
7	DISCUSSIONE	205
8	BIBLIOGRAFIA	217

INTRODUZIONE

INTRODUZIONE

L'inflammation è il primo meccanismo di difesa che l'organismo attiva in seguito ad un qualsiasi stimolo flogogeno (Tizard, 2009). È fondamentale che questo processo avvenga in maniera controllata, in modo tale che esso, non diventi causa di patologia: se questa risposta risulta esuberante può rivelarsi nociva e condurre l'organismo ad una reazione sistemica massiva, caratterizzata da fenomeni ipotensivi, alterazione della temperatura, tachicardia, depressione del sensorio, che costituiscono la **sindrome da risposta infiammatoria sistemica** (SIRS). Quando tale sindrome si verifica in seguito ad una infezione viene definita **sepsi** (Bone et al., 1992; Bellin, 1999). Quest'ultima rappresenta, sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria, una delle più frequenti cause di morte nelle unità di terapia intensiva. tale da intraprendere un intervento terapeutico aggressivo e tempestivo per migliorare L'unico strumento per combattere la sepsi è l'identificazione precoce della suddetta sindrome in modo la prognosi dei pazienti ricoverati. La mancanza di un gold standard diagnostico rende complessa l'identificazione di questa condizione clinica e l'impostazione precoce di una terapia efficace. Nella *International Sepsis Definitions Conference* del 2001, è stato proposto per la prima volta **il sistema PIRO** per l'approccio diagnostico al paziente settico. Questo sistema è costituito da 4 variabili che aiutano a caratterizzare il processo settico: la predisposizione dell'ospite all'infezione, la natura e la estensione dell'infezione, le caratteristiche della risposta dell'ospite e l'eventuale compromissione funzionale multiorganica del soggetto (Levy et al., 2003). Il terzo elemento, ossia la risposta dell'ospite, si è ritenuto un punto fondamentale nella comprensione della patogenesi della sepsi e nella caratterizzazione da un punto di vista quali-quantitativo di essa, rappresentando un ausilio diagnostico e prognostico utile nella gestione dei pazienti settici. Un considerevole contributo viene anche fornito dai *biomarker*, molecole bioattive, oggettivamente misurabili e rinvenibili nel sangue o nei campioni biologici in

grado di identificare processi fisiologici e patologici (Marshall et al., 2003; Opal, 2005).

Le **proteine di fase acuta** (APPs) sono una classe di molecole che aumentano (APPs positive) o diminuiscono (APPs negative), simbolicamente, nel corso di una stimolo infiammatorio di almeno il 25% rispetto ai valori normalmente misurabili (Paltrinieri, 2008). Negli ultimi anni diversi studi su tali proteine hanno evidenziato la loro utilità nella individuazione e nel monitoraggio di pazienti settici fornendo inoltre, indicazioni prognostiche utili (Eckersall, 2000; Cerón, 2004).

Nel presente studio, sono stati analizzati i livelli delle APPs, in una popolazione di cani affetti da **parvovirosi** pervenuta presso l'Ospedale Didattico Veterinario del Dipartimento Clinico dell'Alma Mater Studiorum di Bologna nel periodo che va da Gennaio 2007 a Dicembre 2009. La scelta di tale patologia è stata effettuata in quanto essa rappresenta un **modello animale di sepsi spontanea** dovuto agli effetti dannosi che il parvovirus esercita sulla barriera intestinale con conseguente traslocazione batterica (Otto, 2007).

I criteri SIRS utilizzati in Medicina Veterinaria per caratterizzare i pazienti affetti da sindrome settica (Hauptman et al., 1997; Otto e Brady, 2001; Okano, 2001), si sono dimostrati scarsamente sensibili come indicatori prognostici e diagnostici di tale sindrome. Di conseguenza, l'obiettivo di questo lavoro è lo studio delle APPs come possibili strumenti ausiliari a tali criteri.

I risultati preliminari ottenuti consentiranno di valutare l'eventuale possibilità che tali *biomarker* possano rappresentare uno strumento diagnostico e prognostico nella sepsi.

PARTE COMPILATIVA

CAPITOLO I

L'INFIAMMAZIONE

1 L'INFIAMMAZIONE

1.1 IL PROCESSO INFIAMMATOARIO

Il processo infiammatorio si definisce come la risposta di difesa dell'organismo in seguito ad un insulto, sia esso rappresentato da un agente infettivo (batteri, virus, funghi, parassiti), chimico o fisico o da cellule anomale (tessuto necrotico, tumorale) (Tizard, 2009).

Le cellule e molecole destinate a combattere questa aggressione e proteggere l'organismo dall'agente flogogeno appartengono al Sistema Immunitario. L'insieme di meccanismi messi in atto, in modo coordinato, con lo scopo di eliminare, *in primis*, l'agente flogogeno e secondo, di rigenerare il sito danneggiato (Bochsler e Slauson, 2002) formano parte della risposta immunitaria che nei vertebrati ha due espressioni: l'immunità innata o naturale e l'immunità acquisita o specifica (Abbas et al., 2000).

Il processo infiammatorio, che si sviluppa nei tessuti vascolarizzati dell'organismo dopo pochi minuti dall'insulto, mediante modificazione del circolo e l'attivazione di cellule e molecole, cerca di eliminare la noxa flogogena e di delimitare l'area danneggiata in modo che la lesione non si estenda ai tessuti circostanti (Tizard, 2009).

L'infiammazione acuta può dividersi in quattro fasi, le quattro "R" che sono: il riconoscimento dei patogeni grazie alle cellule *sentinella*, il reclutamento dei leucociti nel sito d'infezione, la rimozione dell'agente flogogeno e la risoluzione del processo infiammatorio (Abbas et al., 2000).

1.2 LA RISPOSTA IMMUNITARIA

1.2.1 IMMUNITÀ NATURALE O INNATA

La prima linea difensiva dell'organismo nei confronti dei patogeni é rappresentata dall'*immunità innata o naturale*.. Tutti gli esseri viventi, dagli invertebrati, alle piante, ai funghi, ai più evoluti vertebrati possiedono questo sistema di difesa. La sopravvivenza dei primi, nel corso dei millenni, evidenzia la sua straordinaria efficienza nella salvaguardia di queste specie dotate unicamente di questa risposta immunitaria (Linde et al., 2008). I componenti della risposta immunitaria innata sono rappresentati da:

- 1- Barriere fisico-chimiche dell'organismo: cute, epitelio delle mucose e sostanze antimicrobiche da loro prodotti.
- 2- Cellule presenti nel sangue con capacità fagocitarie, come i neutrofili e i macrofagi, e cellule con attività citotossica, come i natural killer, cellule dendritiche.
- 3- Proteine circolanti, come il sistema del complemento, e altri mediatori dell'infiammazione, come le proteine di fase acuta e la cascata della coagulazione (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004).
- 4- Proteine denominate citochine, che regolano e coordinano la risposta infiammatoria.

L'immunità innata è caratterizzata dalla mancanza di specificità; queste cellule hanno di recettori di superficie capaci di riconoscere strutture estranee all'ospite e comuni ad un elevato numero di patogeni.

1.2.2 IMMUNITÀ SPECIFICA

I vertebrati hanno inoltre, un altro meccanismo più complesso la cui potenza e capacità difensiva si accrescono ad ogni successiva esposizione allo stesso microbo. Questa risposta immunitaria dotata di specificità e memoria viene denominata immunità acquisita o specifica. I suoi componenti principali sono i linfociti e le molecole da essi prodotte.(Abbas et al., 2000)

L'immunità innata coordina e amplifica l'immunità specifica, che a sua volta impiega come meccanismi effettori per l'eliminazione di microbi meccanismi propri dell'immunità naturale.

- a) Immunità Umorale: i linfociti B presenti nel torrente sanguigno, producono gli anticorpi che sono strutture imputate a riconoscere molecole estranee all'ospite e specifiche di microbi, denominati antigeni, neutralizzandoli e favorendo la loro eliminazione da parte dei meccanismi effettori. Essa rappresenta la principale difesa contro i microbi extracellulari e le tossine da essi prodotte.
- b) Immunità Cellulo-mediata: i linfociti T sono specializzati nel riconoscimento dei patogeni intracellulari, es. virus, parassiti intracellulari. La loro difesa consiste nella distruzione dei microbi intracellulari e nella lisi della cellula infetta (Abbas et al., 2000).

L'immunità attiva è acquisita tramite la risposta che si scatena nell'ospite nell'affrontare un agente patogeno. L'immunità passiva è trasmessa all'animale mediante il "trasferimento adottivo" di anticorpi o linfociti T specifici per quel patogeno. Entrambi conferiscono resistenza all'infezione del suddetto patogeno, essendo specifiche per gli antigeni del microbo; ma unicamente l'immunità attiva genera memoria immunologica.

Le caratteristiche fondamentali dell'immunità specifica sono:

- 1- Specificità; per i diversi antigeni. La porzione degli antigeni riconosciuta da ogni singolo linfocita viene chiamata determinate o epitopo, i diversi microbi evocano risposte specifiche.
- 2- Diversificazione; consente al sistema immunitario di rispondere a una vastissima gamma di microbi. Il numero totale delle diverse specificità antigeniche dei linfociti di un individuo sono il suo reperto linfocitario e rappresenta la variabilità strutturale dei siti di legami con l'antigene presenti nei recettori antigenici dei linfociti.
- 3- Memoria; ad ogni esposizione ad un dato antigene si espandono numericamente i cloni linfocitari specifici per quell'antigene. Le cellule di memoria diventano sempre più efficienti (i linfociti B di memoria producono anticorpi che si legano

con maggior affinità rispetto ai B vergini) e più veloci ad arrivare al focolaio d'infezione (linfociti T di memoria).

- 4- Specializzazione: modula e permette la generazione della risposta ottimale per contrastare i diversi agenti patogeni; es. La risposta umorale per microbi extracellulari e la risposta cellulo-mediata per quelli intracellulari.
- 5- Autolimitazione: la risposta immunitaria viene scatenata dagli antigeni e ha lo scopo di eliminarli, per cui nel momento in cui l'antigene viene eliminato, viene a mancare lo stimolo essenziale dell'attivazione del linfocita tornando allo stato di riposo o di omeostasi.
- 6- Non reattività verso il *self*: capacità di riconoscere e non danneggiare gli antigeni autologhi, grazie all'eliminazione dei linfociti che esprimono recettori specifici per alcuni antigeni propri. La non risposta immunologica viene denominata *tolleranza*. Alterazioni della tolleranza al *self* portano alle *malattie autoimmuni* (Abbas et al., 2000).

1.3 COMPONENTI DELL'IMMUNITÀ INNATA

1.3.1 BARRIERE FISICHE

Le barriere fisiche esterne dell'organismo sono le superfici epiteliali. Le principali superfici attraverso cui l'ospite si interfaccia con l'ambiente sono la cute, la mucosa dell'apparato respiratorio e quella dell'apparato gastroenterico. Queste superfici sono formate da uno strato epiteliale continuo, che impedisce, se intatto, l'ingresso dell'agente patogeno. Gli epitelii sono formati da peptidi dotati di attività microbica naturale: come le *defensine* e le *criptocidine*. Le defensine sono presenti nel epitelio della cute dei nostri animali e si trovano all'interno dei granuli dei neutrofili. Sono dotate di attività antimicrobica ad ampio spettro potendo uccidere una ampia gamma di microrganismi patogeni. La sintesi di queste proteine viene stimolata da citochine pro-infiammatorie come l'interleuchina-1 (IL-1) o il fattore di necrosi tumorale (TNF) (Abbas et al, 2000).

Le criptocidine sono presenti nelle cripte della mucosa dell'apparato gastro-intestinale; anche esse sono dotate di capacità antimicrobica che permette loro di sterilizzare il lume intestinale (Abbas et al., 2000).

1.3.2 LE CELLULE SENTINELLA

I leucociti, che originano nel midollo osseo e che sono specializzati nella distruzione degli elementi patogeni, sono gli immunociti mieloidi: i granulociti neutrofili e i fagociti mononucleati (Beutler, 2004).

1.3.2.1 Granulociti neutrofili

I neutrofili, chiamati anche leucociti polimorfonucleati, rappresentano il 50-60 % della popolazione leucocitaria circolante. Sono la prima linea di difesa contro gli agenti invasori e i primi ad arrivare nel sito d'insulto (Smith, 1994). La loro produzione avviene nel midollo osseo a partire da cellule staminali ematopoietiche. Il processo è controllato da due fattori di crescita: il *Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)* e il *Granulocyte-Macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)* (Smith, 1994; Dale et al., 2008). Una volta maturati, i neutrofili vengono rilasciati in circolo dove permangono per 4-10 ore prima di ripartirsi tra "pool marginale" nell'endotelio vascolare e "pool tissutale" extravascolare, dove sopravvivono per 1 o 2 giorni. I neutrofili invecchiati vanno incontro ad apoptosi (morte cellulare programmata) e vengono quindi rimossi dai macrofagi del fegato e della milza (Smith, 1994; Beutler, 2004).

I neutrofili posseggono diversi tipi di **granuli intracitoplasmatici**, che si formano sequenzialmente durante la differenziazione delle cellule progenitrici mieloidi. I granuli primari o *azzurrofilo* contengono numerose proteine con attività battericida. Le più rappresentative sono la *mieloperossidasi (MPO)* e le α -defensine. La MPO è un enzima che si forma solo nei primi stadi di sviluppo della cellula, a livello di promielocita. La MPO, quando viene secreta dal neutrofilo attivato, fa reazione con H_2O_2 formando

NADPH ossidasi, che incrementa la tossicità di questo ossidante. Le α -defensine sono i maggiori costituenti dei granuli azzurrofilo, rappresentando il 5% delle proteine in essi contenute. I granuli secondari o *specifici*, che si formano nelle cellule che si trovano allo stadio di mielocita e metamielocita, contengono prevalentemente lisozima e lattoferrina. I granuli terziari, solo presenti nelle forme immature come i neutrofilo banda o segmentati, sono ricchi di lisozima e di gelatinasi (Faurischou e Borregaard, 2003). Nel momento in cui, il neutrofilo circolante e inattivo, viene a contatto con qualsiasi stimolo patogeno si trasforma in un potente fagocita con la capacità inoltre, di rilasciare mediatori enzimatici e intermedi relativi all'ossigeno (Bellingan, 1999; Faurischou e Borregaard, 2003). I meccanismi microbicidi sono una combinazione di processi ossidativi ed enzimatici (ossigeno-dipendenti), che sono attivati contemporaneamente con la fagocitosi. I processi ossidativi avvengono nel fagosoma, che è la struttura che si forma conseguentemente all'invaginamento del microbo da parte della membrana del neutrofilo. A questa struttura si fondono i granuli azzurrofilo e i granuli specifici creando, con il rilascio delle sostanze contenute al loro interno, un ambiente altamente microbicida. I granuli azzurrofilo sono principalmente composti da lisozima, proteasi, azzurrocidine, defensine e mieloperossidasi (MPO). Le reazioni chimiche, che ne conseguono, aumentano di 50-100 volte il consumo di ossigeno da parte della cellula, la cosiddetta "respiratory burst" o esplosione respiratoria, avendo in questo modo la progressiva formazione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e di specie reattive all'azoto (RNS) ad azione battericida e batteriostatica. Queste sostanze prodotte, come l'ossido nitrico (NO), sono responsabili nel processo flogistico della vasodilatazione con lo stravasamento dei fluidi e conseguente edema tissutale (Smith, 1994).

Con la degranolazione dei neutrofilo vengono liberati enzimi idrolitici e polipeptidi antimicrobici, quali i prodotti derivati dal metabolismo dell'acido arachidonico, come le prostaglandine e i leucotrieni. Queste molecole vengono rilasciate, sia all'interno del fagolisosoma, sia nello spazio extracellulare, e insieme ai ROS e RNS sono in grado di danneggiare i tessuti dell'ospite (*neutrophyl paradox*) amplificando il processo infiammatorio. Per controllare gli effetti potenzialmente dannosi dei neutrofilo sui tessuti esistono diversi meccanismi regolatori (Smith, 1994). Oltre al meccanismo di

fagocitosi, i neutrofilo, sono in parte modulatori della risposta infiammatoria attivando il rilascio di alcune citochine ad azione pro-infiammatoria come la interleuchina-1 (IL-1), la interleuchina 6 (IL-6) e il fattore di necrosi tumorale (TNF- α). Viene anche liberato il fattore attivante le piastrine (PAF), che da una parte rende le cellule endoteliali vascolare più adesive per i neutrofilo stessi e d'altra, attiva le piastrine promuovendo l'aggregazione piastrinica e stimolando la sintesi di molecole vasoattive e di trombossani. Dopo la marginazione e la adesione dei neutrofilo alla parete vascolare avviene la diapedesi attraverso l'endotelio verso il sito di flogosi (Muller, 2002). I neutrofilo una volta giunti nel sito d'infiammazione hanno la capacità di sopprimere parzialmente il fenomeno flogogeno mediante l'azione dell'acido arachidonico sulle membrane delle cellule, dando origine a prodotti che inibiscono l'ulteriore migrazione dei neutrofilo stessi (Tizard, 2009).

1.3.2.2 Fagociti mononucleati

I macrofagi e i loro precursori, i monociti, rappresentano il 5% della popolazione totale dei leucociti. I precursori del sistema dei fagociti mononucleati originano, anche loro, dal midollo osseo. Grazie allo stimolo delle citochine, mediante il fattore stimolante le colonie (CSF), i monoblasti si trasformano in promonociti. Questi ultimi, una volta raggiunto il torrente circolatorio, vengono denominati monociti e, a differenza dei neutrofilo, mantengono capacità proliferativa. Una parte di questa popolazione permane nel sangue trasformandosi dopo circa 3 giorni in cellule dendritiche; mentre la maggior parte migra nei tessuti formando i macrofagi. (Abbas et al, 2000; Dale et al., 2008). I macrofagi formano parte del patrimonio cellulare di tessuti e organi in cui vi è una maggior probabilità di venire a contatto con patogeni. In funzione dell'organo a cui appartengono essi modificheranno la loro struttura: istiociti quelli localizzati nel tessuto connettivo, cellule di Kupffer quelli con sede nei sinusoidi epatici, cellule della microglia quelli che raggiungono il sistema nervoso centrale, macrofagi alveolari e macrofagi polmonari intravascolari quelli dei polmoni, osteoclasti quelli del tessuto osseo, e così via in milza, midollo osseo e linfonodi. Tutte queste cellule formano il

cosiddetto sistema fagocitico mononucleare (MPS), hanno una vita relativamente lunga (1-3 giorni) e vengono rimpiazzati ad un tasso di circa l'1% al di, se non vengono attivati da una risposta infiammatoria (Tizard, 2009). I macrofagi, oltre a fagocitare e uccidere i microorganismi invasori, hanno un'azione immunomodulatoria, in quanto, secernono diverse sostanze in grado di regolare l'attività degli elementi coinvolti nella risposta immunitaria, sia acquisita che innata. Queste sostanze, citochine, come il TNF- α , e chemochine, favoriscono il richiamo, la crescita e la maturazione dei neutrofili ed altre cellule imputate nella reazione di fase acuta (Abbas et al, 2000; Dale et al. 2008; Tizard, 2009). I macrofagi raggiungono il sito d'infezione più o meno nello stesso tempo dei neutrofili, con la differenza che, essendo più longevi, saranno loro a dominare negli ultimi stadi della risposta immunitaria. I macrofagi sono cellule accessorie che presentano l'antigene ai linfociti T, in quanto espongono sulla propria superficie molecole del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) associate a peptidi derivati da antigeni proteici extracellulari. Inoltre, nella fase di risoluzione dell'infiammazione, i macrofagi favoriscono la rigenerazione tissutale grazie alla secrezione di fattori angiogenetici, come il fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari (VEGF); di fattori che stimolano la produzione di fibroblasti, come il fattore di crescita di derivazione piastrinica (PDGF) e di fattori che regolano la sintesi di componenti del tessuto connettivo, quali il fattore di crescita trasformante (TGF- β) (Abbas et al, 2000).

1.3.2.3 Cellule Dendritiche (DCs)

Le cellule dendritiche sono così denominate per la loro morfologia caratterizzata da molti e sottili processi citoplasmatici chiamati "dendriti", che incrementano la funzione di captazione degli antigeni ampliando la superficie disponibile per il contatto. Queste cellule sentinella costituiscono una popolazione molto eterogenea e vengono suddivise in due sottopopolazioni: le cellule dendritiche mieloidi (MDCs) e le cellule dendritiche plasmocitoidi (PDCs). Le prime derivano dai monociti, sono le più rappresentate e integrano il pool di DCs tissutali, ritrovabile in tutti gli organi tranne che nel cervello,

parti dell'occhio e testicoli. Esse sono particolarmente abbondanti in linfonodi, pelle e superfici mucosali, ovvero in tutti i punti dell'organismo con maggior probabilità di venire a contatto con i patogeni. Le PDCs invece, di derivazione linfoide, si trovano nel torrente sanguigno e negli organi linfoidi (Tizard, 2009).

1.3.2.4 Mastociti

I mastociti sono cellule tonde e molto grandi originarie delle *stem cells* del midollo osseo con una vita media di settimane o mesi. Esse si trovano localizzate a livello di pelle, superfici mucosali, tessuto connettivo e intorno ai nervi. In tali sedi, sono vicini ai vasi sanguigni in modo tale da potere svolgere le loro due funzioni principali: intervenire nella regolazione del flusso sanguigno e influenzare la migrazione cellulare al sito di infiammazione. La loro composizione molecolare è diversa a seconda di quale organo appartengano: ad esempio, i mastociti della pelle e del tessuto connettivo sono ricchi di istamina ed eparina, mentre quelli della mucosa intestinale hanno una elevata concentrazione di condroitin solfato. I granuli citoplasmatici dei mastociti contengono una miscela di sostanze, tra cui istamina, lipidi vasoattivi, enzimi (triptasi e chimasi), citochine e chemochine, che, una volta rilasciate, agiscono sulla parete dei vasi sanguigni producendo la flogosi. Una delle molecole più importanti è l'istamina: i suoi effetti sono mediati da due recettori, H1 e H2, espressi da cellule nervose, cellule della muscolatura liscia, cellule endoteliali, neutrofili, eosinofili, monociti, DCs, cellule T e B. L'istamina, che si lega ai recettori H1, stimola la produzione di ossido nitrico (NO), potente vasodilatatore, da parte delle cellule dell'endotelio. Di conseguenza, si verifica un aumento della permeabilità vascolare con lo stravasamento di fluidi allo spazio interstiziale e la comparsa di edema nella zona insultata. I mastociti sono capaci di riconoscere un ampio spettro di patogeni grazie alla presenza di diversi recettori sulla loro superficie, i Toll-Like Receptors (TLRs), che generano una risposta specifica per l'eliminazione dell'insulto. Gli stimoli che portano alla degranolazione dei mastociti sono molto diversificati: un antigene legato a una Immunoglobulina E, provoca una rapida e completa degranolazione con rilascio di enormi quantità di istamina. Batteri o prodotti

da essi derivati (lipopolisaccaride) causano ugualmente la degranulazione, ma senza liberazione di istamina. Altri stimoli come piccoli peptidi (come le defensine, i neuropeptidi, le endoteline) o cellule tissutali danneggiate o morte, mostrano una risposta più moderata (Tizard, 2009).

1.3.2.5 Linfociti *Natural Killer* (NK)

Un altro tipo di linfocita coinvolto nell'immunità innata poiché riconosce come patogeni una ampia gamma di molecole è il linfocita *natural killer* (NK). I NK vengono attivati dal riconoscimento di tre tipi di strutture: cellule rivestite da anticorpi, cellule infettate da patogeni intracellulari e cellule che non esprimono molecole del complesso maggiore di istocompatibilità di classe I (*Major Histocompatibility Complex*, MCH-I) (Abbas et al., 2000; LaRosa e Orange, 2008). Le funzioni effettrici degli NK sono la lisi delle cellule infettate e di cellule tumorali, nonché la secrezione di interferon gamma (IFN- γ) e di altre citochine (IL-5 e IL-13), che potenziano le funzioni dei macrofagi. La lisi cellulare avviene grazie alla liberazione di due proteine contenute nei granuli intracitoplasmatici di questi linfociti: le *perforine*, che provocano la formazione di pori di membrana sulla cellula bersaglio e i *granzimi*, che penetrano per questi pori inducendo l'apoptosi (Abbas et al., 2000).

1.3.2.6 Sistema del complemento

Il sistema del complemento è costituito da un complesso di più di 30 proteine plasmatiche e di recettori di superficie cellulare prodotti in diverse sedi, ma principalmente dai macrofagi, dagli epatociti e da cellule epiteliali dell'intestino e delle vie urinarie. Il complemento svolge diverse funzioni che vanno dalla lisi cellulare al rinforzo delle risposte dei linfociti T e B (Carroll, 2004). La cascata del complemento viene attivata in corso di infezioni e danno tissutale attraverso tre vie che condividono un passaggio: l'attivazione della componente C3. La via "classica", così definita perché scoperta per prima, si basa sull'interazione di IgM, IgG o IgG3, legate alla membrana

dell'agente patogeno con una proteina chiamata C1. La via "alternativa", scoperta successivamente, ma filogeneticamente più antica, viene attivata dall'interazione diretta di certe strutture di membrana dei microorganismi con C3. La terza via o "via della lectina" viene attivata da una proteina, la lectina legante il mannosio (*Mannose Binding Lectin*, MBL) (Sherwood e Toliver-Kinsky, 2004). La MBL interagisce con carboidrati provvisti di un residuo di mannosio o fruttosio terminale, tipicamente presente nelle glicoproteine e nei glicolipidi della parete batterica, quindi si unirà esclusivamente a proteine microbiche *non-self*. La MBL, in circolo, si trova associata ad una proteina sierica, che può attivare le componenti C2 e C4, bypassando così le prime tappe dell'attivazione del complemento per le prime due vie (Abbas et al., 2000). Ognuna di queste tre vie attiva il clivaggio della componente C3 in C3a e C3b. C3a è chemioattiva per i neutrofili, C3b si lega alla superficie dei microorganismi patogeni facilitando il riconoscimento di questo complesso da parte dei fagociti e forma un complesso proteolitico con altre componenti del complemento per permettere il clivaggio di C5 nelle porzioni a e b. C5a richiama neutrofili ed altera la permeabilità vasale. C5b si lega alla membrana microbica e facilita la formazione del complesso composto da C6, C7, C8 e C9, che lisa la membrana cellulare dei batteri (Sherwood e Toliver- Kinky, 2004).

1.3.3 I PRODOTTI DELLE CELLULE SENTINELLA

1.3.3.1 Le Citochine

La maggior parte delle cellule del sistema immunologico (macrofagi, neutrofili e linfociti) secernono in differenti combinazioni e frequenza delle molecole polipeptidiche, che svolgono la funzione di messaggeri nella regolazione della risposta infiammatoria e vengono chiamate citochine, per indicare il loro ruolo nella comunicazione cellula-cellula (Smith, 1994; Kelso, 1998). Le citochine hanno una affinità elevatissima per i loro recettori per cui sono in grado di mediare effetti biologici a concentrazioni picomolari. La produzione di queste proteine immunomodulatrici

avviene in risposta a diversi stimoli, sia endogeni, come l'attivazione di cellule fagocitarie, sia esogeni, come il contatto con endotossine lipopolisaccaridiche (LPS), prodotti dai batteri Gram negativi, o con esotossine dei batteri Gram positivi. Le citochine, invece, oltre a venire prodotte da cellule di diversa natura, vanno a legarsi a recettori presenti in molteplici cellule bersaglio. La secrezione delle citochine è un evento *breve ed autolimitante*; poiché non vengono stoccate e vengono sintetizzate come risultato di una nuova trascrizione genica a seguito di una stimolazione cellulare. La azione delle citochine può essere *locale o sistemica*. Una citochina può legarsi ai recettori presenti sulla membrana della stessa cellula che l'ha secreta, esercitando un effetto *autocrino*. La citochina può legarsi a recettori delle cellule vicine dalla cellula secernente, esercitando una azione *paracrina*; o può invece legarsi a una cellula bersaglio distante da dove è stata prodotta, svolgendo una azione *endocrina*.

Le differenze tra le citochine e gli ormoni del sistema endocrino sono le seguenti:

- 1- Gli ormoni classici tendono ad agire specificamente sull'organo bersaglio, mentre le citochine hanno un'azione pleiotropica agendo su una ampia varietà di cellule e di organi contemporaneamente (Hopkins, 2003; Dinarello, 2007).
- 2- Raramente una citochina viene secreta singolarmente; normalmente, quando le cellule immunitarie vengono stimulate, avviene la liberazione di una cascata di citochine, che influenzeranno la sintesi di altre, evento denominato "cascata d'induzione". Le citochine possono poi avere tra di loro effetti antagonisti oppure sinergici.
- 3- Le citochine sono ridondanti nella loro attività biologica, perché molte hanno effetti simili, per cui se una citochina viene eliminata altre potrebbero compensare la sua mancanza (Abbas et al., 2000).

Le citochine interferiscono con tutti gli organi e le cellule coinvolti nella di reazione di difesa, provocando diverse reazioni nell'organismo come la febbre, i cambiamenti della pressione arteriosa, la coagulabilità del sangue, l'induzione delle proteine di fase acuta da parte del fegato e la guarigione dei tessuti danneggiati. Di conseguenza, esse sono responsabili delle alterazione fisiologiche e patologiche osservate come manifestazione sistemica di una reazione infiammatoria o di un'infezione grave .

1.3.3.2 Funzioni delle Citochine

Le Citochine possono essere suddivise in tre gruppi in base a le loro funzioni biologiche:

- I- Citochine che mediano e regolano l'immunità innata: sono prodotte principalmente dai fagociti mononucleati in risposta ad un agente immunogeno e sono responsabili delle prime reazioni infiammatorie. Tra queste vanno comprese le cosiddette "citochine pro-infiammatorie", quali IL-1, IL-6, il TNF- α , IL-12 e IL-18; sono responsabili della sintesi di nitric oxide synthase-2 (NOS-2), che genera ossidanti come l'ossido nitrico, e dell'enzima ciclossigenasi-2 (COX-2), che dà origine a molecole infiammatorie come le prostaglandine e i leucotrieni (Abbas et al., 2000, Tizard ,2009).
- II- Citochine che mediano e regolano l'immunità acquisita: sono prodotte dai linfociti T in risposta al riconoscimento di un antigene specifico. Ci sono due tipi: quelle che regolano la crescita e la differenziazione di altre popolazione linfocitarie e altre che nelle fasi effettrici reclutano cellule specializzate nella rimozione degli antigeni.
- III- Citochine che stimolano l'emopoiesi: sono prodotte da cellule stromali del midollo osseo, da leucociti e da altri tipi cellulari e sono in grado di stimolare la crescita e la differenziazione dei leucociti immaturi.

Le funzioni biologiche delle citochine, più specificamente, nella risposta infiammatoria fanno sì che le si possa suddividere in altri 2 gruppi:

- I- *Citochine pro-infiammatorie*, già sopra nominate, sono coinvolte nell'amplificazione della risposta infiammatoria. Le prime ad essere secrete dalle cellule attivate sono il TNF- α e IL-1, che riescono ad attivare l'induzione a cascata di altre molecole pro-infiammatorie, come l'IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, l'IFN- γ , il Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor

(GM-CSF), la Macrophage-Inflammatory Protein-1 (MIP-1) e le chemochine; ma anche altri mediatori come il platelet-activating factor (PAF), le prostaglandine, i leucotrieni (LC), i trombossani (TX) e l'ossido nitrico. Tutti questi fattori responsabili di regolare la reazione infiammatoria locale, hanno effetti sui vasi sanguigni provocando vasodilatazione, aumento della permeabilità e la fuoriuscita di cellule e liquido plasmatico. Con l'edema che si forma si ha l'irritazione dei nervi locali dovuto all'alterata anatomia e fisiologia della parte e all'azione di tutti i mediatori biochimici. Tutti questi fenomeni messi insieme caratterizzano il processo infiammatorio con i classici punti cardini: *rubor*, *calor*, *tumor* e *dolor*. Se l'infiammazione diventa grave e questi mediatori raggiungono il torrente circolatorio si avranno conseguenze sistemiche; il processo infiammatorio locale si amplifica ad una infiammazione sistemica, ossia una risposta di fase acuta. La risposta di fase acuta è in grado di provocare: febbre, anoressia, abbattimento, alterazione del flusso sanguigno e modificazioni nelle concentrazioni di diverse proteine plasmatiche, le cosiddette proteine di fase acuta (Van Miert, 2002).

- II- La modulazione dell'azione pro-infiammatoria è determinata da meccanismi controregolatori, a cui contribuiscono *citochine anti-infiammatorie*, come l'IL-4 e l'IL-10. Queste sostanze limitano i potenziali effetti dannosi che darebbero luogo a una risposta flogistica eccessiva (Opal e DePalo, 2000). Le citochine anti-infiammatorie sono il *Transforming Growth factor- β* , IL-4 e IL-10, che sono prodotte fundamentalmente dai linfociti T helper. Gli altri mediatori coinvolti in questo meccanismo controregolatore sono: i glicocorticoidi, le catecolamine, le lipocortine e gli antagonisti per i recettori delle citochine (Opal e DePalo, 2000).

1.3.3.3 PRINCIPALI CITOCHINE

1.3.3.3.1 *Tumor Necrosis factor- α (TNF- α)*

Il TNF- α , considerato il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta, appartiene a una super famiglia di fattori di necrosi tumorale (TNFSF) integrata per 18 peptidi. Il TNF- α è una proteina trimerica di 25 Kda prodotta principalmente da macrofagi, mastociti, linfociti T attivati dalla presenza di antigeni, cellule endoteliali, linfociti B e fibroblasti. La sua produzione è scatenata da qualunque insulto cellulotissutale, ma lo stimolo più potente è rappresentato dai lipopolisaccaridi (LPS) presenti nei batteri Gram negativi. Come il suo nome indica, il TNF- α colpisce cellule tumorali e cellule infette da virus, mediante la attivazione di caspasi e proteasi che sono i principali mediatori dell'apoptosi (Tizard, 2009). La funzione principale del TNF- α deriva dell'effetto che ha sull'endotelio vascolare e la sua attività procoagulante: provvede al reclutamento e all'attivazione delle cellule deputate alla rimozione dello insulto agendo sull'endotelio vascolare e sui leucociti e stimola le cellule del endotelio ad esprimere sulle loro superfici dei recettori, in modo tale da aumentare la adesività dei leucociti "*rolling neutrophyl*"; inoltre, stimola le cellule endoteliali e i macrofagi a secernere le *chemochine*, che sono molecole capaci di richiamare nel sito d'infezione altri leucociti, e quindi di regolare la loro diapedesi dal sangue al sito del insulto. Il TNF- α è in grado di potenziare la attività microbica dai fagociti mononucleati e polimorfonucleati e di amplificare il processo flogistico promuovendo la sintesi di altri mediatori dell'infiammazione quali: IL-1, NOS-2, COX-2 e di altro TNF- α . D'altra parte, nell'infiammazione cronica ha un ruolo fondamentale nel favorire la proliferazione di fibroblasti e la produzione di collagene. Questo mediatore è responsabile, tramite la sua azione endocrina, di effetti sistemici: a livello ipotalamico provoca la febbre e la diminuzione dell'appetito (Johnson, 1997), a livello muscolare attiva il catabolismo proteico, a livello epatico promuove la glicogenolisi, la gluconeogenesi e la sintesi di proteine di fase acuta, e possiede un'azione protrombotica. Se la concentrazione di TNF- α circolante aumenta ulteriormente si può

arrivare ad una diminuzione della contrattilità cardiaca, una riduzione del tono della muscolatura liscia dei vasi sanguigni, che esita in vasodilatazione con caduta della pressione arteriosa e conseguente shock ipotensivo e settico. Altri membri di questa super famiglia includono: TNF- β (NFSF1), CD40L (TNFSF5) e CD95L (TNFS6) (Abbas et al., 2000; Tizard, 2009).

1.3.3.3.2 Interleuchina-1 (IL-1)

L'IL-1, come il TNF- α , è sintetizzata principalmente dai macrofagi e dalle cellule dendritiche, da cellule T e B, da cellule NK, da neutrofili, da cellule dell'endotelio vascolare, da fibroblasti e da cheratinociti. Le sue proprietà biologiche sono sovrapponibili a quelle del TNF- α , poiché legandosi agli stessi recettori attiva i medesimi fattori di trascrizione genica (Dinarello, 1997; Smirnova et al. 2002). L'IL-1 attiva è formata da due molecole: IL-1 α e l'IL-1 β , che sono 2 membri di una famiglia di 10. Anche l'IL-1 può avere effetti locali e sistemici, in base alla concentrazione con cui viene liberata. Nelle infezioni gravi, l'IL-1 viene prodotta in quantità eccessiva e raggiunge la circolazione sanguigna provocando effetti endocrini: a livello del sistema nervoso centrale (febbre, malessere, letargia, anoressia, dimagrimento), epatico (sintesi delle proteine di fase acuta), ematopoietico (con neutrofilia mediante la produzione di *Colony Stimulating Factors*, GM-CSF promuovendo il loro rilascio, e con uno stato di anemia secondario a una riduzione della risposta all'eritropoietina.), sul metabolismo osseo e sull'immunità acquisita (regolando la crescita e differenziazione dei linfociti e reclutando cellule specializzate nella rimozione degli antigeni) (Tizard, 2009).

1.3.3.3.3 Interleuchina-6 (IL-6)

L'IL-6 è prodotta, insieme a IL-1 e TNF- α , dopo la stimolazione ad opera di esotossine batteriche. Viene sintetizzata, non solo dai macrofagi attivati, ma anche dalle cellule T e B, mastociti, cellule dell'endotelio vascolare, fibroblasti, cheratinociti e cellule mesenchimali (Song e Kellum, 2005). Viene prodotta, inoltre, dalle cellule muscolari durante l'esercizio fisico. Questa citochina agisce sui linfociti T e B provocando la

secrezione delle immunoglobuline, sugli epatociti inducendo la sintesi di alcune proteine di fase acuta, quali il fibrinogeno e la proteina C-reattiva, e sulle cellule stromali del midollo osseo stimolando la differenziazione di monociti in macrofagi (Gaini et al., 2006). Sembra che l'IL-6, regoli il passaggio, nelle prime fasi dell'inflammatione, da uno stato dominato dai granulociti, ad uno successivo dominato dai macrofagi. Possiede un'attività pleiotropica, in quanto ha un ruolo chiave nel processo flogistico, dunque nell'immunità innata, che nei meccanismi dell'immunità acquisita. L'IL-6 è il mediatore più importante della risposta di fase acuta e dello shock settico (Tizard, 2009).

1.3.3.4 Le Chemochine

Le chemochine sono un altro prodotto delle cellule sentinella. Sono un gruppo di citochine chemiotattiche, che garantiscono l'attrazione di popolazioni specifiche di cellule durante il decorso naturale della risposta infiammatoria e inoltre attivano i leucociti. Sono piccole proteine (8-10 Kda) prodotte da macrofagi e mastociti. Sono state identificate 50 chemochine classificate in 4 famiglie: α , β , γ e δ secondo la posizione nella molecola del residuo di cisteine.

La CXCL8 o IL-8, è una chemochina β prodotta dai macrofagi ed è in grado di attirare ed attivare i neutrofili, facendoli rilasciare il contenuto dei loro granuli, favorendo l'esplosione respiratoria e il rilascio di leucotrieni. Un'altra chemochina importante della stessa famiglia, sarebbe la CXCL2 o macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) secreta dai macrofagi e responsabile dell'attivazione dei neutrofili.

Chemochine della famiglia α agiscono predominantemente sui macrofagi e sulle cellule dendritiche, come ad esempio CCL3 e CCL4 (MIP-1 α e MIP-1 β rispettivamente (Tizard, 2009).

1.3.4 LE PROTEINE DI FASE ACUTA O APPS

La risposta di fase acuta è una reazione infiammatoria sistemica non specifica che accade nell'organismo subito dopo un danno tissutale. La risposta include, tra altri cambiamenti, variazioni nella concentrazione plasmatica di proteine denominate *proteine di fase acuta* (Cerón, Eckersall, 2005). Il loro scopo non è altro che, intervenire nel ristabilimento dell'omeostasi mediando o inibendo i processi infiammatori e permettendo il trasporto di altre molecole proteiche per la riparazione del tessuto. Le APPs sono considerate come un componente non specifico della risposta immunitaria innata che agiscono prima che l'animale sviluppi una risposta specifica per l'insulto patogeno. Queste proteine interagiscono con i leucociti attivando o sopprimendo il rilascio di altri mediatori. Le APPS presentano attività emostatica, antitrombotica, antiproteolitica e microbica. Durante la risposta di fase acuta, le citochine pro-infiammatorie rilasciate nel sito dell'insulto tissutale arrivano al torrente sanguigno provocando il coinvolgimento di tutto l'organismo; in particolare modo, sul sistema nervoso provocano la *sick syndrome* (letargia, anoressia, malessere) e sul fegato ed altri organi inducono la sintesi di proteine di fase acuta (Gruys et al., 2005). La natura dell'insulto può essere molto varia, tra le più frequenti abbiamo: infettiva, immunologica, neoplastica, traumatica, chirurgica. Lo scopo della risposta di fase acuta è quella di ristabilire l'omeostasi e la rimozione della causa del disturbo (Cerón, 2005).

1.3.4.1 Organi di Sintesi delle APPs

Le proteine di fase acuta o APPs sono sintetizzate in diversi organi, anche se la maggior parte, viene prodotta nel fegato. Gli epatociti esprimono una ampia gamma di recettori per le citochine pro-infiammatorie, in particolare per TNF- α , IL-1 e IL-6, che costituiscono i mediatori più potenti delle APPs (Ramadori e Christ, 1999). I linfociti producono alfa-1-glicoproteina acida (AGP) (Gahmberg e Andersson, 1978), questo spiegherebbe le alte concentrazioni di questa proteina in cani e gatti affetti da linfoma.

Nell'uomo l'AGP è stata descritta anche in organi come il rene, l'intestino, il cuore e in

diversi tipi di globuli bianchi (Fournier et al., 2000). Inoltre, l'AGP è originata anche nella prostata, essendo stata trovata anche nel liquido seminale (Poland et al., 2002).

La proteina siero amiloide A è stata trovata in diverse specie animali: nell'intestino, nel rene, nel midollo osseo, negli adipociti (in corso di iperglicemia), nella ghiandola mammaria (in corso di mastiti) (Lin et al., 2001, Eckersall et al. 2001).

Nell'uomo, si è visto che il rene era in grado di produrre la proteina C reattiva (CRP), questa proteina può essere utilizzata come indicatore di rigetto nel trapianto renale (Jabs et al., 2003).

È stato postulato che la produzione di APP nel sito iniziale della APR, in aggiunta alla produzione epatica, possa contribuire al mantenimento dell'omeostasi, riducendo il danno tissutale associato al processo flogistico (Fournier et al., 2003).

1.3.4.2 Classificazione delle APPs

Lo studio delle APPs consente classificarle in base a diversi criteri:

- I- in base alla natura dello stimolo che media la sua sintesi, cioè al tipo di citochina coinvolta
- II- in base alla loro cinetica e magnitudo
- III- in base al andamento della loro concentrazione plasmatica

1.3.4.2.1.1.1 Classificazione I

Le APPs si possono classificare in due tipi di proteine in base alle citochine coinvolte nella loro sintesi:

- **“Risposta tipo I”** quelle indotte dalla IL-1 e dal TNF- α che agiscono sinergicamente all'IL-6, come ad esempio: la proteina C reattiva, la siero amiloide A, l' α 1-glicoproteina acida. Il TNF- α mobilita gli aminoacidi periferici attivando il processo proteolitico nei muscoli. IL-1 modula la sintesi proteica nel fegato inibendo la produzione di APPs negative e stimolando la

formazione di APPs positive. L'IL-6 contribuisce al rilascio di queste proteine nel sangue (Petersen et al., 2004).

- “**Risposta tipo II**” quelle indotte esclusivamente dalla IL-6 o da citochine simili ad essa. Esempio di proteine di questo tipo sono: il fibrinogeno, l'aptoglobina, e la macroglobulina α -2.

Le APPs sono state chiamate da diversi Autori come i “termometri chimici”, ma attualmente si sa che sono molto più stabili che le misurazioni della temperatura corporea dei mammiferi, poiché questi animali sono dotati da importanti meccanismi regolatori dell'omeostasi. La risposta delle APPs può essere rapportata all'andamento della malattia o del ricovero (Eckersall, 2004).

1.3.4.2.1.1.2 Classificazione II

La concentrazione in sangue delle APPs può variare di circa il 25% dopo uno stimolo infiammatorio. La risposta di queste proteine sieriche alla stimolazione delle citochine pro-infiammatorie varia, provocando un incremento della concentrazione nel caso delle proteine di fase acuta “**positive**”, e una diminuzione nel caso delle proteine di fase acuta “**negative**”. La proteina C reattiva (CRP), la siero amiloide A (SAA), l'aptoglobina (Hp), l'alfa-1-glicoproteina acida (AGP), la ceruloplasmina (Cp) e il fibrinogeno (Fb) sono le APPs positive, mentre l'albumina, la transferrina, la transtiretrina TTR o prealbumina, la proteina legante il retinolo (RBP) e la globulina legante cortisolo, sono alcune delle APPs negative (Ingenbleek e Young, 1994).

APPs POSITIVE	APPs NEGATIVE
Proteina C-Reattiva	Albumina
Amiloide A Sierica	Transferrina
Aptoglobina	Transtiretrina (prealbumina)
Fibrinogeno	Proteina legante il retinolo
Ferritina	Globulina legante il cortisolo
Antitripsina α 1	
Glicoproteina Acida	
Ceruloplasmina	
Macroglobulina α 2	
Proteine del complemento	

Tabella 1.1 – Elenco delle proteine di fase acuta positive e negative più importanti.

1.3.4.2.1.1.3 Classificazione III

Le APPs nel cane e nel gatto possono essere classificate in base alla magnitudo della loro risposta agli stimoli come maggiori, moderate o negative (Boschler e Slauson, 2002; Murata et al., 2004; Petersen et al., 2004; Cerón et al., 2005).

Le concentrazioni ematiche delle cosiddette **maggiori**, che aumentano di 10-100 volte fino a 1000 volte (Eckersall, 2006) rispetto ai valori basali, sono rappresentate dal CRP e SAA. Queste proteine hanno un rapido e cospicuo aumento ed un altrettanto rapido declino. La rapida produzione e declino rendono la CRP un utile marker di flogosi per valutare lo stato del paziente al momento del prelievo (Caspi et al., 1984).

Le APPs **moderate** aumentano di 2-10 volte rispetto ai valori basali, nel cane sono rappresentate dalla Hp, dalla AGP e dalla Cp. Queste proteine necessitano di tempi più lunghi per aumentare la loro concentrazione e anche per rientrare nei valori normali, hanno un andamento più graduale. Ad esempio, la ceruloplasmina, inseguito ad un intervento chirurgico nel cane, richiede 4 giorni per raggiungere un picco plasmatico di

circa il doppio del valore basale (Conner et al., 1988a). La Cp nel cane aumenta in modo più significativo e precoce rispetto all'uomo (Cerón et al., 2005). È interessante notare che le APPs moderate hanno concentrazioni normali negli animali sani e più alte rispetto alle APPs maggiori, che spesso sono valori pari allo zero. Di conseguenza, nonostante aumentino di poche volte rispetto ai valori basali, la loro concentrazione totale durante la risposta di fase acuta risulta più elevata (Cerón et al., 2005). Il tempo necessario per un APP per raggiungere il picco massimo e la grandezza di quest'ultimo, può variare in base al tipo di stimolo che scatena la APR. Come nel caso della Hp e la Cp nei cani affetti da leishmaniosi aumentano di circa 5 volte i valori normali (Martínez-Subiela et al. 2002), mentre aumentano di 2-3 volte in seguito ad un insulto di tipo chirurgico (Conner et al., 1998a). Tuttavia, la grandezza della APR non dipende dal tipo d'insulto, poiché simili risposte sono state rilevate in processi patologici di eziologia diversa. Inoltre, la stessa patologia può determinare aumenti variabili delle singole proteine (Tecles et al., 2005). Esistono differenze sostanziali tra le diverse specie, ad esempio la CRP è una proteina maggiore nell'uomo, nel cane e nel suino, e invece nei ruminanti, difficilmente risulta alterata. Al contrario, la Hp nei ruminanti è una APP maggiore e presenta valori pressoché nulli nei soggetti sani, per aumentare di oltre 100 volte dopo un insulto. Nel cane, la Hp è una proteina di fase acuta moderata ed è normalmente presente in circolo nei soggetti sani (Conner et al., 1988). Nel gatto, le APPs positive che hanno un ruolo più importante nell'approccio diagnostico sono la SAA e AGP (Petersen et al., 2004; Cerón et al., 2005). In questa specie, l' α -1-glicoproteina acida si usa per la diagnosi di peritonite infettiva felina.

Una volta che lo stimolo infiammatorio è stato eliminato, la concentrazione di APPs positive diminuisce precocemente, diversamente, se la causa scatenante persiste le concentrazioni nell'organismo permangono elevate; questo ultimo caso può rappresentare un ausilio per eventuali modifiche delle strategie terapeutiche utilizzate (Paltrinieri, 2008).

In un tracciato elettroforetico delle proteine sieriche, la maggior parte delle APPs migra nell'area delle α e β -globuline. Una semplice elettroforesi sierica può identificare un

aumento delle concentrazioni delle APPs, tuttavia questo metodo risulta meno sensibile della valutazione individuale delle stesse (Martínez-Subiela et al., 2002).

1.3.4.3 Le APPs Positive

Le APPs positive includono: proteine con attività antibatterica e immunomodulatrice come la proteina C-reattiva (CRP), frazioni del complemento quali C3 e C4, la alfa-1-glicoproteina (AGP), la proteina legante lipopolisaccaride (LBP); proteine trasportatrici come l'aptoglobina (Hp) che lega l'emoglobina, la ceruloplasmina (Cp); e proteine che proteggono i tessuti legando molecole potenzialmente pericolose come la siero amiloide-A (SAA) e le alfa-globuline con attività anti-proteasica come l' α 1-antitripsina (Paltrinieri, 2007).

1.3.4.3.1 Proteina C-reattiva (CRP)

Tillet e Francis nel 1930, scoprirono la CRP nel sangue di pazienti affetti da polmonite da *Streptococcus pneumoniae*. Questa sostanza, che si lega al polisaccaride-C della parete cellulare di questo pneumococcus, fu prima chiamata sostanza C-reattiva e in seguito ha preso l'attuale denominazione di proteina C-reattiva. È stata la prima proteina di fase acuta descritta ed è il prototipo di proteina di fase acuta in medicina umana (Marnell et al., 2005; Tillet e Francis, 1930).

La CRP canina è una pentraxina ciclica di 100 kDa di peso molecolare, composta da 5 subunità (protomeri) di 20 kDa ciascuna unite da legami non-covalenti. La CRP ha una struttura cristallina con tre siti per legare due ioni calcio e una molecola di fosfocolina (PC) sulla superficie B (componente destinata al riconoscimento), ed altri siti di legame, meno conosciuti, sulla superficie A (componente deputata alle funzioni effettrici). Il ligando più importante e più conosciuto, con cui la CRP reagisce, è la PC che è una porzione dell'acido tecoico, che forma parte della struttura della parete cellulare dello pneumococco e di molti altri microrganismi (Eckersall e Conner, 1988; Du Clos e Mold 2004 e Marnell et al., 2005). Questa interazione richiede la presenza di calcio ed è responsabile di legare diversi microorganismi come il disaccaride fosforilato della

Leishmania donovani o il lipopolisaccaride dell'*Hemophilus influenzae*. La differenza della CRP umana con quella canina è che quest'ultima ha due protomeri glicosilati (Eckersall e Conner, 1988), che spiegherebbe in parte la difficoltà di utilizzare kit con anticorpi anti-CRP umani per la misurazione della CRP canina. La sintesi della CRP avviene principalmente a livello di reticolo endoplasmatico (ER) degli epatociti in risposta all'azione della citochina pro-infiammatoria IL-6 e dell'IL-1. L'IL-6 è responsabile dell'attivazione del fattore di trascrizione genico STAT3 e l'IL-1 media la trascrizione del fattore NF-κB (Marnell et al., 2005). La concentrazione sierica di CRP si eleva da 100 a 1000 volte nelle 24 ore dopo uno stimolo flogistico, per cui è ampiamente usata come sensibile e precoce marker d'infiammazione in Medicina Umana; in modo simile, accade nella specie canina. La CRP sierica è elevata in cani affetti da malattie infiammatorie, ed un suo aumento è riportato in corso di malattie infettive come la leptospirosi, la babesiosi, la parvovirosi (Cerón et al., 2005), il trauma chirurgico (Conner ed Eckersall, 1988), tumori maligni come il linfoma e l'emangiosarcoma (Teclès et al., 2005), piometra, pancreatite acuta (Holm et al., 2004), anemia emolitica immunomediata, artrite, glomerulonefrite e infiammazione sperimentale.

Le sue funzioni biologiche sono:

- promuovere il legame con il complemento il quale facilita la loro fagocitosi (forma primitiva di anticorpo)
- induzione delle citochine
- inibizione della chemiotassi e modulazione della funzione dei neutrofili
- inibire il fattore attivante le piastrine (PAF), grazie alla sua capacità legante la fosfolina (Marnell et al., 2005)
- degradare i componenti nucleari delle cellule danneggiate o morte (Murata et al., 2004; Cerón et al., 2005).

La misurazione della CRP sierica si effettua, generalmente, mediante dosaggio immunologico, utilizzando anticorpi specifici per la CRP canina. Sono stati sviluppati e descritti diversi metodi di misurazione, come ad esempio metodiche

immunospettrofotometriche su analizzatore biochimico automatizzato (Eckersall et al., 1991), metodiche ELISA (Eckersall et al., 1989), test di agglutinazione su vetrino (Yamamoto et al., 1994b). Recentemente sono stati utilizzati nuovi metodi basati sulla fluorimetria time-resolved (TR-IFMA) su sangue intero (Parra et al., 2005a), sulla saliva (Parra et al., 2005b) e su versamenti (Parra et al., 2004). Questi test richiedono del personale ben formato ed specializzato, e soprattutto del tempo. Un altro metodo molto più veloce che non richiede un operatore specializzato è il *laser nel phelometric immunoassay* (LNIA) per le CRP canina, creato dai giapponesi (Onishi et al., 2000; Ohno et al., 2007) nel 1998 e che ora è già in commercio (Nakamura et al., 2008).

1.3.4.3.2 Siero amiloide-A o Amiloide A sierica (SAA)

La SAA è una piccola proteina sierica con un peso molecolare di 15 kDa che nel plasma si trova associata alle lipoproteine ad alta densità (HDL). Come la CRP, è una delle proteine “maggiori” la cui sintesi nel fegato è indotta principalmente dalle citochine: IL-6, IL-1 e il TNF- α (Murata et al., 2004; Petersen et al., 2004). Si suppone che la SAA sia il precursore della proteina A dell’amiloide, che sarebbe la principale proteina dell’amiloide. Sarebbe, quindi, potenzialmente coinvolta nella patogenesi dell’amiloidosi primaria (disturbo genetico tipico di alcune razze di cani come il sharpei) e dell’amiloidosi secondaria, come malattia conseguente a processi infiammatori cronici come l’artrite reumatoide o episodi ricorrenti d’inflammatione acuta (es. tubercolosi) Uhlar e Whitehead, 1999). Monitorare la SAA può essere utile in gatti Somali, Abyssinian, e Orientali, razze predisposte ad sviluppare amiloidosi, quando un aumento della concentrazione sierica di questa APP sia stato rinvenuto (DiBartola et al., 1989). In Medicina Umana, la SAA mostra una sensibilità, velocità di risposta e dinamicità comparabili a quelle della CRP (Pepys e Baltz, 1983). Tuttavia, il suo utilizzo in Medicina Veterinaria, fino a poco tempo fa, è stato limitato dalle difficoltà di purificazione e quantificazione della proteina, per le sue proprietà strutturali (Yamamoto et al., 1994a). La proteina A dell’amiloide canina e quella umana hanno diverse omologie (Hold e Gruys, 1984), anche se la struttura primaria della SAA canina

ha un peptide di 8 aminoacidi addizionale (Sellar et al., 1991). Sembra comunque che la sequenza e la capacità induttiva della SAA sia fortemente conservata attraverso l'evoluzione delle diverse specie vertebrate (Uhlar e Whitehead, 1999). Per la misurazione della SAA canina e felina, nonostante le difficoltà per le preparazioni di antisieri per la SAA canina, sono stati allestiti degli ELISA sandwich con anticorpi anti-SAA canina (Yamamoto et al., 1994a), e anticorpi SAA felina (Sasaki et al., 2003), rispettivamente. Antisieri monoclonali contro la SAA umana, sono stati utilizzati con successo in un ELISA sandwich per la determinazione della SAA canina (Yule et al., 1997), e antisieri policlonali contro la SAA canina sono stati utilizzati per la determinazione della SAA felina. Inoltre, esiste in commercio un test ELISA per la determinazione della SAA nelle diverse specie di interesse veterinario ma che si avvale di antisiero monoclonale diretto contro la SAA umana, ed è risultato utile per la determinazione di questa proteina nel cane (Martínez-Subiela e Cerón, 2005) e nel gatto (Giordano, 2004).

Le funzioni biologiche della SAA sono:

- il reclutamento chemiotattico delle cellule infiammatorie nel sito di infiammazione
- modulazione del processo infiammatorio, inibendo il rilascio di mieloperossidasi da parte dei fagociti ed inibendo la proliferazione di linfociti
- intervento nel metabolismo e nel trasporto dei lipidi (HDL) che vengono destinati ai macrofagi come fonte energetica (Uhlar e Whitehead, 1999)
- capacità di inibire l'aggregazione piastrinica (Murata et al., 2004 e Cerón et al., 2005)

La SAA è la proteina di fase acuta positiva maggiore più importante nel gatto.

1.3.4.3.3 Aptoglobina (Hp)

Il cane ha solo un sottotipo di aptoglobina, a differenza dell'uomo che ne possiede 3 (Hp 1-1, Hp 2-1 e Hp 2-2). L'aptoglobina canina assomiglia molto alla Hp 1-1 umana: contenuto amminoacidico, peso molecolare di 81 kDa, pattern elettroforetico, struttura

in subunità α e β in una costruzione a catene tetravalenti ($\beta\alpha\alpha\beta$). A differenza dell'Hp umana, però, le due catene $\alpha\beta$ sono unite da un legame non covalente (presente anche nella Hp felina), invece che da un ponte disulfidrilico e la catena α ha una sequenza oligosaccaridica legante ed è glicosilata. Queste particolarità strutturali possono essere responsabili delle divergenze nella rilevazione della Hp canina e felina attraverso l'utilizzo di anticorpi diretti contro la Hp umana. Nel cane, il pattern di glicosilazione della Hp è variabile nei vari tipi di patologie differenziabili in base ad un meccanismo patogenetico su base infiammatoria, autoimmune o neoplastica. La applicazione ed utilizzo del *pattern* di glicosilazione dell'Hp potrebbe essere molto utile per differenziare i diversi processi patologici e per monitorare l'andamento della patologia stessa (Ebersole e Capelli, 2000). Nel cane, la Hp è considerata una APP moderata, infatti aumenta di circa 2-3 volte in risposta ad infiammazioni, infezioni o traumi (Eckersall e Conner, 1988; Eckersall, 1995). Nel siero di cani sani, la Hp è presente a basse concentrazioni, con un picco che richiede 5 giorni dopo lo stimolo chirurgico o traumatico, seguito poi di un graduale declino. I metodi di misurazione della Hp possono essere divisi in 2 gruppi, metodi spettrofotometrici e metodi immunologici.

Le funzioni biologiche di questa APP sono principalmente una attività anti-infiammatoria e antibatterica:

- dopo l'iniziale reclutamento di neutrofili, la Hp inibisce la loro azione: riducendo la attività delle ciclossigenasi e delle lipossigenasi
- promuove la apoptosi delle cellule danneggiate e ne stimola la rimozione da parte dei macrofagi
- lega l'emoglobina libera (prodotto tossico e pro-infiammatorio liberato con il normale *turnover* degli eritrociti e in corso di emolisi)
- modula le cellule effettrici, è in grado di sopprimere la proliferazione dei linfociti T e delle cellule B (interviene sia nell'immunità innata che acquisita) (Quaye, 2008).

1.3.4.3.4 Alfa-1-glicoproteina Acida (AGP)

La principale caratteristica di questa proteina moderata, è quella di essere fortemente glicosilata e di essere la componente proteica fondamentale del sieromucoide, la frazione di plasma che è maggiormente resistente alla precipitazione acida (Eckersall, 2000b). La α -1-glicoproteina canina è stata purificata e caratterizzata ed è analoga a quella umana. È stata descritta come una proteina molto inusuale di 43 kDa di peso molecolare, con un punto isoelettrico di 2,8-3,8 e con un elevato contenuto in carboidrati (45%) (Fournier et al., 2000). La AGP viene principalmente secreta dagli epatociti stimolati dalle IL-1 e IL-6, sebbene possa anche essere sintetizzata in sedi extraepatiche.

La AGP è misurata, solitamente, con una immunodiffusione radiale su agar gel impregnato con siero di coniglio anti-AGP di diverse specie. Questa tecnica si trova in commercio sotto forma di vari kit, i quali sono specie specifici. Attualmente ve sono disponibili per il cane e per il gatto, ma hanno lo svantaggio di richiedere 24-48 ore perché la diffusione sia completa. Sono state proposte metodiche immunoturbidimetriche per la misurazione della AGP canina e felina (Kuribayasi et al., 2003; Bence et al., 2004), le quali offrono il vantaggio di essere più rapide e adattabili all'analizzatore biochimico. Variazioni nella glicosilazione dell'AGP sono state descritte nell'uomo in stati di infiammazione acuta (Fournier et al., 2000, Hochepped et al., 2003) e anche in gatti affetti da peritonite infettiva felina (FIP) (Cecilianani et al., 2004).

Le funzioni biologiche di questa APP sono:

- **Trasportatrice:** sia di molecole endogene (istamina, eparina, serotonina, steroidi) che esogene (farmaci). Questa caratteristica ha una importante implicazione nella farmacocinetica di un principio attivo somministrato in soggetti con una AGP elevata.
- **Immunomodulatrice:**
 - inibendo diverse attività dei neutrofili, come la chemiotassi e la produzione di radicali reattivi dell'ossigeno (ROS)

- incrementando l'espressione di antagonisti per i recettori della IL-1 da parte di macrofagi
- modulando la attività secretoria dei monociti e dei macrofagi
- Anti-infiammatoria:
 - attività anticomplemento
 - inibisce l'aggregazione piastrinica
 - accelera il processo di cicatrizzazione stimolando la proliferazione dei fibroblasti e promuovendo la rigenerazione dei nervi e la deposizione di collagene (Fournier et al., 2000; Miranda-Ribera., 2009).

1.3.4.3.5 Ceruloplasmina (Cp)

La ceruloplasmina è una delle APPs positive moderate nel cane che aumenta la sua concentrazione ematica di due o tre volte circa 5 giorni dopo l'insulto (Martínez-Subiela et al., 2001). La Cp è un' α -2-glicoproteina con un peso molecolare di 151 kDa e rappresenta la principale proteina di trasporto per il rame (Cu), legando l'85- 90% della quota circolante (Ebersole e Capelli, 2000; Cerón et al., 2005).

In Medicina Veterinaria, sono state utilizzate diverse metodiche per la misurazione della Cp, manuali (Conner et al., 1988) e automatizzate (Cerón e Martínez-Subiela, 2004) basati sull'attività della p-fenilenediamina-ossidasi (PPD-asi).

Le principali funzioni biologiche della ceruloplasmina sono:

- proteggere le cellule dai metaboliti tossici del ferro che si formano durante il processo flogistico. La Cp possiede un'attività enzimatica rame-dipendente in grado di ossidare il ferro ferroso Fe⁺² a ferrico Fe⁺³, rendendolo così utilizzabile dalla transferrina
- protegge dai metaboliti dell'ossigeno come agente antiossidante, analogamente alla superossido dismutasi (Murata et al., 2004)

- Inibisce l'adesione dei polimorfonucleati all'endotelio vascolare mediante un particolare meccanismo non mediato da recettori, ma da una repulsione elettrostatica denominata *ingombro sterico* (Broadley e Hoover 1989).

1.3.4.3.6 Fibrinogeno (Fb)

Il fibrinogeno è una β -globulina presente nel plasma di tutti i vertebrati. È composto da tre catene polipeptidiche unite tra loro da ponti disulfidrilici. Questa glicoproteina contiene 3-5% di carboidrati, è sintetizzata dal fegato e dal tessuto endoteliale. Il fibrinogeno è una APP moderata che aumenta di circa tre volte i valori basali e rientra ai livelli normale dopo 8 giorni dall'insulto (Conner et al., 1988). Il Fb svolge un ruolo essenziale nel processo della coagulazione poiché esso è trasformato dalla trombina in fibrina, mediante un processo di polimerizzazione. La fibrina è un componente necessario per la formazione del trombo emostatico. La diminuzione della concentrazione ematica del Fb può attribuirsi ad una insufficiente sintesi (insufficienza epatica o difetti enzimatici congeniti) o ad un eccessivo consumo (come succede in corso di coagulazione intravascolare disseminata, CID). Invece, le concentrazioni plasmatiche del Fb aumentano in seguito ad un insulto infiammatorio e continuano a farlo per diversi giorni finché lo stimolo non cessa. Nell'uomo, l'aumento di Fb ematico rappresenta un marker di aterosclerosi subclinica ed è utile nella identificazione dei soggetti con maggior rischio a sviluppare patologie cardiovascolari (Paramo et al., 2005).

Per la misurazione del fibrinogeno è stata descritta una metodica turbidimetrica (Macart et al., 1989).

Le sue funzione biologiche sono:

- riparazione di tessuti con la formazione della fibrina
- mantenimento dell'omeostasi riparando i tessuti poiché rappresenta una matrice chemiotattica per le cellule infiammatorie (Murata et al., 2004).

1.3.4.3.7 Ferritina

Questa enorme proteina è un polipeptide con un peso molecolare di 460000 kDa, che interviene nel metabolismo del ferro. Il ferro ematico in eccesso viene depositato in tutte le cellule del corpo, ma specialmente negli epatociti e meno nelle cellule reticolo-endoteliali del midollo osseo. Nel citoplasma delle cellule, il ferro si combina con l'*apoferritina* per formare la *ferritina*. Il ferro immagazzinato nella ferritina prende in nome di *ferro deposito* (Guyton e Hall, 2007). Si possono utilizzare diverse tecniche per la misurazione della ferritina nei piccoli animali e nei cavalli, ad esempio analisi immunologici specie-specifici. La concentrazione di ferritina plasmatica aumenta nei cavalli dopo l'esercizio. I meccanismi precisi, non sono del tutto conosciuti, sembra che venga rilasciata dai muscoli e dal fegato.

Condizioni che possono causare **iperferritinemia** sono:

- Aumento del ferro totale corporeo; può essere iatrogeno o difetti genetici nella regolazione dell'assorbimento.
- Aumento nella produzione di apoferritina; come proteina di fase acuta positiva può aumentare sia in corso d'inflammatione che nelle patologie di natura neoplastica, es. sarcoma istiocitario (istiocitosi maligna).
- Spostamento della ferritina dei tessuti al plasma; in caso di danno epatico ci sarà la fuoriuscita di essa dagli epatociti al plasma; in corso di emolisi, e in seguito all'esercizio nei cavalli (Stockham e Scott, 2008).

Condizioni d'**ipoferritinemia**:

- Diminuzione del ferro immagazzinato; negli umani la ferritina plasmatica diminuisce precocemente se c'è una deficienza di ferro, diminuisce prima che vengano rilevati un decremento nella concentrazione di emoglobina (microcitosi) o nella concentrazione sierica di ferro .
- Poiché la concentrazione plasmatica di ferritina può essere il risultato di processi opposti, un animale con deficienza di ferro e affetto da una patologia infiammatoria non presenterà ipoferritinemia (Stockham e Scott, 2008).

1.3.4.4 Le APPs Negative

Le proteine di fase acuta negativa sono quelle che hanno un abbassamento della loro concentrazione plasmatica in seguito ad uno stimolo infiammatorio. In Medicina Umana ci fu un dibattito sugli effetti della nutrizione e delle patologie infiammatorie sulla produzione delle APPs negative. Recenti ipotesi sostengono che la risposta di fase acuta ha un impatto più rilevante che non l'alimentazione sulle concentrazioni di transferrina e di albumina. Un decremento della concentrazione della transferrina è più indicativo di una APR che di una povera dieta (Cerón et al., 2005).

1.3.4.4.1 Albumina

L'albumina è la proteina più rappresentata nel sangue, costituendo il 35-50% di tutte le proteine plasmatiche di cani e gatti sani. Nell'elettroforetogramma l'albumina rappresenta la banda maggiore. È responsabile del 75% della pressione colloidale del plasma ed è la maggior risorsa amminoacidica dell'organismo animale. Durante un'APR, il decremento della sua sintesi rende disponibili un'importante quota di amminoacidi che possono, in questo modo, essere utilizzati per la sintesi delle APPs positive (Paltrinieri, 2007). Le albumine sono misurate, generalmente, con metodiche spettrofotometriche utilizzando test colorimetrici come il verde di bromocresolo.

1.3.4.4.2 Transferrina

Questa β -globulina è una glicoproteina plasmatica costituita da un'unica catena polipeptidica di circa 700 amminoacidi. Questa APP negativa è responsabile del trasporto del ferro in circolo. Interviene nei meccanismi di difesa dell'organismo sequestrando il ferro, in questo modo lo sottrae alla disponibilità di microrganismi (Murata et al., 2004; Cerón et al., 2004). Nonostante la transferrina totale possa essere misurata con metodiche immunologiche, tale proteina viene comunemente determinata valutando la capacità totale di legare il ferro (*Total Iron Binding Capacity* o TIBC). Questo test è stato ampiamente usato per la valutazione del metabolismo del ferro (Smith, 1997). La TIBC si misura addizionando ferro esogeno al campione e

determinando la quantità di ferro che si lega alla transferrina. La capacità del ferro legante insatura (*Unbound Iron Binding Capacity* o UIBC) si ottiene sottraendo il valore di sideremia alla TIBC (Stockham e Scott, 2008).

Altre APPs negative sono rappresentate da molecole responsabili del trasporto di ormoni e vitamine, come la globulina legante cortisolo, la transtiretrina (TTR) e la proteina legante retinolo (vitamina A) (RBP). Quando, in corso d'inflammatione, la loro sintesi diminuisce, rilasciano in circolo gli ormoni e le vitamine. Queste una volta liberate acquisiscono la loro forma attiva potendo esserne utilizzate direttamente dall'organismo (Paltrinieri, 2007).

1.4 FASI DEL PROCESSO INFIAMMATORIO

Il processo flogistico è suddiviso classicamente in quattro fasi, le cosiddette quattro “R” ovvero: il riconoscimento, il reclutamento, la rimozione e la risoluzione. Ogni tappa è coordinata dall'azione di mediatori umorali e cellulari e coinvolge diversi tipi di cellule nell'avvio, nella progressione e nel termine del processo (Barton, 2008).

1.4.1 RICONOSCIMENTO DEI PATOGENI

I microorganismi invasori e il tessuto danneggiato emettono un segnale di allerta che sarà riconosciuto dalle cellule sentinella. Questo segnale può essere provocato da:

- la liberazione di “allarmine” da parte delle cellule tissutali danneggiate
- da componenti derivanti dai microrganismi patogeni (LPS)
- da peptidi bioattivi che vengono liberati dalle cellule nervose in seguito a stimoli algici.

Le cellule sentinella (macrofagi, mastociti, cellule dendritiche) hanno sulla loro superficie o all'interno del citoplasma, dei recettori deputati a riconoscere un ampio *range* di patogeni. Questi recettori denominati *Pattern Recognition Receptors* (PRR) sono in grado di riconoscere *pattern* molecolari associati a patogeni (*Pathogen*

Associated Molecular Patterns o PAMPs), esclusivi dei microbi ed imputati a scatenare il processo infiammatorio. Il legame tra PAMPs e PRR attiva una serie di eventi intramolecolari che portano alla secrezione di molecole in grado di attivare le altre cellule dell'immunità innata. I più importanti PRR sono i *Toll-like receptors* (TLRs), il *Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD-like receptors, NLRs)* e il *Retinoic acid inducible gene (RIG-like receptors, RLRs)*. TLRs e NLRs, scoperti neanche una decade fa, si sono rilevati cruciali nella difesa dell'ospite contro le infezioni microbiche eppure nel mantenimento dell'omeostasi della microflora (Albiger et al., 2007; Tizard, 2009).

1.4.1.1 Toll-Like Receptors (TLRs)

I TLRs rappresentano una famiglia di proteine recettoriali transmembrana responsabili del riconoscimento dei PAMPs. Sono espressi in diverse popolazioni cellulari, quali macrofagi, mastociti, cellule dendritiche, eosinofili, cellule epiteliali dell'apparato gastroenterico e respiratorio. Queste proteine recettoriali sono costituite da: una porzione extracellulare ricca in sequenze di leucina responsabile del legame con i diversi PAMPs, e da una porzione intracellulare, denominata TIR o dominio recettoriali Toll/IL-1 perché omologa al recettore per la IL-1 (Barton, 2008). Questi domini interagiscono con diverse proteine citoplasmatiche (MyD88, TIRAP/MAL, TRAM e TRIF) che danno avvio ad una cascata di segnali molecolari che inducono la traslocazione del *Nuclear Factor- κ B* (NF- κ B) nel nucleo. Questo fattore permette la trascrizione di geni codificanti per diversi mediatori pro-infiammatori. Il fatto che un limitato numero di recettori avvii una vasta gamma di risposte infiammatorie, ha portato ad ipotizzare che esistano ligandi endogeni capaci di iniziare la flogosi anche in assenza di invasori. Tra questi legandi vi sono molecole derivate dalle cellule tissutali danneggiate (Warren, 2005). Quando il TLRs si lega al microorganismo invasore o a cellule o frammenti di cellule dei tessuti danneggiati, si scatena un segnale che avvia la produzione di citochine specifiche contro gli elementi estranei (Tizard, 2009).

Ci sono diversi tipi di TLRs e ognuno riconosce una o più molecole microbiche più o meno specifiche come sono i lipopolisaccaridi, i peptidoglicani, il DNA batterico o il DNA virale. Nei mammiferi sono stati identificati 13 TLRs: alcuni (TLRs 2, 4 e 5) localizzati sulla superficie cellulare sono deputati al riconoscimento di proteine microbiche, lipoproteine e LPS ad azione extracellulare, altri (TLRs 3, 7 e 9) intracitoplasmatici sono attivati da segnali come una eventuale proliferazione batterica o la presenza di acido nucleico virale (Barton, 2008; Tizard, 2009).

Il TLRs più studiato è il TLR4, riconosce diversi tipi di legandi però è più conosciuto come il recettore del lipopolisaccaride (LPS).

	LIGANDI MICROBICI	LIGANDI ENDOGENI
TLR1	Lipopeptidi triacile batteri*	cellule necrotiche?
TLR2	peptidoglicano, ac.lipoteicoico, lipoproteine batteriche, porine, zimosano, proteine envelope virale.	Cellule necrotiche
TLR3	ds RNA virus	
TLR4	LPS, ac.lipoteicoico, proteina F virus, pneumolisina, glicoinositolfosfolipidi protozoi	HSP60, HSP70, ac.ialuronico, proteina A surfactante polmonare, fibronectina, fibrinogeno A
TLR5	flagellina batteri Gram –	
TLR6	Lipopeptidi diacile batteri*	Cellule necrotiche?
TLR7/ TLR8	ssRNA virus	
TLR9	CpG DNA (batteri, protozoi, virus), emozoina protozoi	Complessi cromatina-IgG
TLR10	?	
TLR 11	Molecola profilin-like protozoi, componente batteri uropatogeni*	

Tab. 1.2 -Classificazione dei Toll-like Receptors e relativi ligandi microbici ed endogeni (Murphy et al., 2004; Uematsu e Akira, 2006).

1.4.1.2 Nod-Like Receptors (NLRs)

I NLRs costituiscono una famiglia di recettori con localizzazione intracellulare. Una volta stimolati dalla presenza di un patogeno all'interno della cellula, innescano una serie di segnali che in cooperazione con i TLRs avviano la risposta infiammatoria (Tizard, 2009).

1.4.1.3 Rig-Like Receptors (RLRs)

Questa ultima famiglia di *pattern recognition receptors* vengono espressi nel citoplasma cellulare. I RLRs sono in grado di identificare l'acido nucleico virale e di legarlo iniziando la produzione di una citochina antivirale denominata interferone (Tizard, 2009).

1.4.2 RECLUTAMENTO

La migrazione dei neutrofili nel sito d'infezione è guidata dalle citochine e mediata dall'interazione tra recettori di localizzazione espressi dai leucociti e i relativi ligandi presenti sulle cellule endoteliali. Le citochine più importanti in questo processo sono TNF ed alcune chemochine. Il TNF induce nelle cellule endoteliali, l'espressione sequenziale di molecole che mediano l'adesione di diversi tipi di leucociti. Nell'arco di 1 o 2 ore dall'esposizione al TNF, le cellule endoteliali esprimono E-selectina, che determina un debole legame all'endotelio di neutrofili ed altri leucociti, i quali, per l'azione della pressione sanguigna, cominciano a "rotolare" lentamente lungo la parete vasale. A distanza di 6-12 ore, si ha l'espressione sull'endotelio vascolare delle seguenti molecole: *Vascular Cell Adhesion Molecole* (VCAM-1) e *Intercellular Adhesion Molecole* (ICAM-1), che si legano alle integrine presenti su neutrofili e monociti consentendo una solida adesione di questi ultimi, seguita dalla loro migrazione nei tessuti attraverso le giunzioni inter-endoteliali. Anche le chemochine sono coinvolte nel reclutamento dei leucociti nel focolaio di infezione: esse favoriscono il loro legame

all'endotelio e ne stimolano la migrazione nei tessuti. Le chemochine agiscono sui leucociti debolmente adesi alla parete vasale tramite il legame ai glicosaminoglicani espressi sulla membrana delle cellule endoteliali. L'affinità delle integrine per i loro ligandi aumenta, con conseguente stabilizzazione dell'adesione all'endotelio e transmigrazione attraverso la parete del vaso. Dopo che i leucociti hanno fatto il loro ingresso nei tessuti, le chemochine ne stimolano direttamente la migrazione o chemiotassi, lungo un gradiente di concentrazione crescente (Abbas et al., 2000).

Nell'arco di poche ore dall'insulto, si ha localmente l'attivazione delle cellule del sistema immunitario e dell'endotelio con la comparsa dei quattro eventi principali del fenomeno infiammatorio: la vasodilatazione, l'incremento della permeabilità microvascolare, l'attivazione/adesione di cellule e la coagulazione. Questi eventi sono responsabili dei sintomi caratteristici della flogosi: *calor* (aumento della temperatura dovuto alla vasodilatazione), *rubor* (eritema per vasodilatazione con aumento del flusso sanguigno), *tumor* (edema dovuto all'aumento di permeabilità capillare a grandi proteine, specialmente albumine e fibrine), *dolor* e *functio laesa* (perdita di tutte le funzioni relazionate con questa zona) (Goris, 1996).

I principali messaggeri della risposta infiammatoria sono le citochine quali TNF- α , IL-1 e IL-6, *interferons* e *colony stimulating factors* (CSFs); e le cellule effettrici sono i polimorfonucleati (PMN), i monociti/macrofagi e le cellule endoteliali (Davies e Hagen, 1997). La fine di questi mediatori è l'elaborazione di un insieme di reazioni destinate a limitare il danno e a ristabilire l'omeostasi: distruggendo il tessuto danneggiato, promuovendo la crescita di nuovo tessuto e combattendo il microrganismo patogeno, le cellule neoplastiche o gli antigeni estranei (Bone, 1997). Per assicurare che gli effetti dei mediatori pro-infiammatori non diventino distruttivi, l'organismo avvia una risposta anti-infiammatoria mediata dalla IL-4, IL-10, IL-11, recettore solubile del TNF- α , antagonisti dei recettori dell'IL-1, *transforming growth factors*, tra altri. Questi agenti alterano le funzioni dei monociti, impediscono l'attività presentante l'antigene e riducono l'abilità delle cellule a sintetizzare citochine pro-infiammatorie. Alcuni di loro regolano la loro stessa produzione. Le cellule infiammatorie, però, se attivate in maniera

eccessiva o inappropriata, possono condurre ad uno stato incontrollato di infiammazione sistemica, caratterizzato da riduzione della capacità cellulare di utilizzo dell'ossigeno, dalla deplezione di ATP e conseguente danno e morte cellulare (Bellingan, 1999).

1.4.3 RIMOZIONE

In questa fase, il processo infiammatorio si avvale di citochine in grado di attivare e indurre la differenziazione di cellule che provvedono alla rimozione di un antigene o di un agente infettivo. Si tratta di citochine come IFN- γ , IL-2 e IL-6; che promuovono attività nei neutrofili, macrofagi e linfociti (Marcato, 2000). La principale funzione effettrice dei neutrofili e dei macrofagi è la lisi dei microrganismi fagocitati mediante fusione di fagosomi con i lisosomi e la produzione di sostanze ad attività microbica quali lisozima, elastasi, sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNOS) e radicali ossigeno. Il tessuto danneggiato, viene anch'esso rimosso per evitare la continua stimolazione del sistema immunitario. Le sostanze chimiche sopra nominate, non hanno la capacità di discriminare fra microrganismi e strutture *self* quindi, l'eccessiva produzione e il rilascio di queste sostanze nello spazio extracellulare può condurre al danneggiamento dei tessuti dell'ospite e all'ulteriore amplificazione del processo infiammatorio (Abbas et al., 2000).

1.4.4 RISOLUZIONE

Una volta che lo stimolo infiammatorio è stato rimosso, è necessario, affinché possa avvenire la riparazione dell'area interessata e la flogosi possa quindi risolversi, che le cellule infiammatorie, terminata la loro funzione, vengano prontamente rimosse e che si verifichi il passaggio ad una fase contraddistinta dalla produzione di segnali anti-infiammatori (Savill, 2000; Tizard, 2009). I granulociti neutrofili vanno incontro ad apoptosi, meccanismo che non comporta la distruzione della membrana plasmatica. In questo modo, viene impedita la liberazione di metaboliti tossici di derivazione cellulare che potrebbero danneggiare i tessuti circostanti, rappresentando un ulteriore stimolo

infiammatorio. I macrofagi fagocitano i neutrofilii apoptotici il che stimola una risposta anti-infiammatoria; viene inibita la sintesi di TNF- α e incentivata la sintesi del *Transforming Growth Factor- β* (TGF- β). Il TGF- β è una citochina anti-infiammatoria che inibisce la proliferazione dei linfociti e potenzia l'attivazione degli stessi macrofagi (Abbas., 2000). I macrofagi e i linfociti non vanno incontro ad apoptosi cellulare, a meno che lo stimolo infiammatorio non sia troppo intenso; migrano verso il linfonodo regionale dove agiscono da cellule presentanti l'antigene e dove avviene la espansione clonale (Savill, 2000). La breve emivita dei mediatori infiammatori e il fatto che la loro produzione avvenga soltanto durante la permanenza dello stimolo, contribuiscono allo spegnimento del processo flogistico. Inoltre, con il progredire della flogosi, le cellule coinvolte modificano le loro proprietà. I neutrofilii cominciano a liberare l'enzima 15-lipossigenasi, che agisce sull'acido arachidonico provocando la produzione di lipossine, interrompendo in questo modo la produzione di leucotrieni di carattere pro-infiammatorio. I granulociti neutrofilii, in più, secernono recettori solubili per il TNF- α e l'IL-1, essendo in grado quindi di neutralizzare questi mediatori. Il TNF- α induce alla sintesi di IL-12 da parte di macrofagi; questa interleuchina porta alla liberazione da parte dei linfociti di INF- γ . L'INF- γ nelle ultime fasi della risposta immunitaria sopprime l'attività dei macrofagi. I macrofagi iniziano gradualmente a secernere la *Serine Leukocyte Protease inhibitor-1* (SLP-1), che inibisce il rilascio di sostanze ossidanti da parte dei neutrofilii e protegge dalla degradazione il TGF- β . Dopo vengono liberate numerose citochine ad attività anti-infiammatoria come sono l'IL-4 e l'IL-10, capaci di interferire con le azioni pro-infiammatorie del TNF- α (Abbas et al., 2000; Kumar et al., 2005).

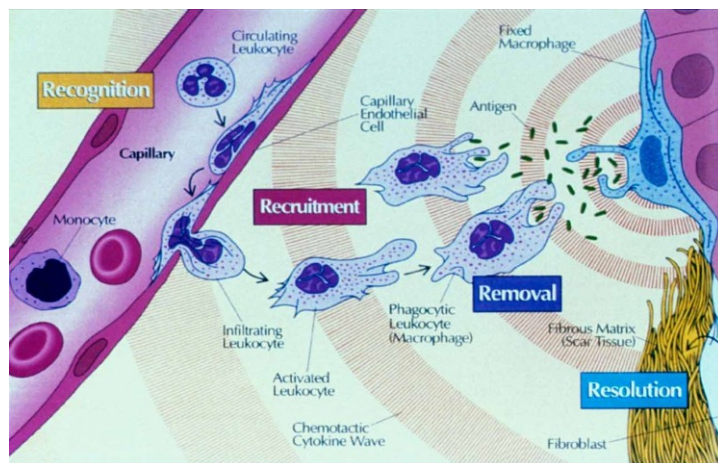


Figura 1.1 . Le quattro “R” del processo infiammatorio.

1.5 RISPOSTA DI FASE ACUTA

La risposta di fase acuta o *Acute Phase Response* (APR) rappresenta una reazione precoce ed estremamente complessa dell'organismo ad un insulto tissutale. Questo insulto può essere di diversa natura: infettiva (batteri, virus, parassiti), traumatica (meccanica o termica), neoplastica o immunologica. La APR è una prominente e immediata reazione sistemica non specifica, caratterizzata da diversi cambiamenti e deputata alla neutralizzazione dell'agente infiammatorio, al ristabilimento dell'omeostasi e alla guarigione dei tessuti danneggiati. La risposta di fase acuta provoca l'induzione di una cascata di mediatori che avranno sia effetti locali vascolari sia effetti sistemici multiorganici. In un secondo momento si avranno modifiche biosintetiche, in particolare da parte del fegato, che altera il profilo e la concentrazione di proteine plasmatiche circolanti. Anche se l'APR avviene come un meccanismo di sopravvivenza nell'immediato, può avere delle conseguenze clinicamente negative se si mantiene a lungo termine come nei casi di infiammazioni croniche (Gabay e Kushner, 1999).

La APR ha inizio nell'area dove l'insulto ha originato la flogosi, ove si assiste alla liberazione di mediatori solubili deputati a richiamare tutti gli elementi cellulari necessari per la difesa. Le molecole imputate all'avvio e la regolazione di questa catena di reazioni sono le citochine. Le citochine sono segnali intercellulari polipeptidiche

prodotte da cellule attivate, come monociti circolanti e i macrofagi tissutali nel sito dell'insulto (Uhlar e Whitehead, 1999). Tali molecole, quando sono secrete, agiscono su molteplici *target* ed svolgendo molteplici funzioni. Possono agire localmente o a distanza, grazie alla sua attività pleiotropica. Le citochine prodotte durante il processo infiammatorio e che in esso partecipano, sono principalmente: l'interleuchina-1, l'interleuchina-6 e il fattore di necrosi tumorale α , *interferon- γ* , *transforming growth factor β* e possibilmente l'interleuchina-8 (Gabay e Kushner, 1999). I primi e più importanti mediatori infiammatori sono l'IL-1 e il TNF- α , essi causano il rilascio di citochine secondarie e chemochine da parte delle cellule stromali locali. Le attività chemiotattiche di queste molecole sono responsabili del reclutamento dei neutrofili al sito d'infiammazione dove rilasceranno citochine infiammatorie (Bouchsler e Slauson, 2002).

In questi cambiamenti non specifici mediati dall'APR, sono coinvolti diversi organi e sistemi: il fegato, il sistema neuroendocrino, il sistema muscoloscheletrico, il sistema immunitario e il sistema nervoso centrale (SNC). Le tre *hallmarks* dell' APR sono: febbre, leucocitosi e alterazioni nella concentrazione della proteine di fase acuta (APPs) (Paltrinieri, 2007). Da un punto di vista laboratoristico, i cambiamenti rinvenuti durante l'APR (Gruys et al., 2005) sono:

- 1- decremento delle lipoproteine plasmatiche leganti colesterolo di bassa ed alta densità
- 2- decremento dei leucociti circolanti
- 3- incremento dell'ormone adrenocorticotropina (ACTH) e dei glucocorticoidi
- 4- attivazione del sistema del complemento
- 5- attivazione dell'asse coagulativo
- 6- diminuzione dei livelli sierici di calcio, zinco, ferro e della vitamine A e del α -tocoferol
- 7- variazione della concentrazione di diverse proteine plasmatiche dovute a cambiamenti del metabolismo del fegato

Una delle risposte sistemiche all'APR più studiate, è l'alterazione del profilo della

biosintesi epatica. Il fegato, inseguito ad una infezione, aumenta il suo peso, questo è dovuto all'enorme quantità di reazione che vi prendono sede. Tra queste, la più significativa è la sintesi, dopo 24-48 ore dall'insulto, delle proteine di fase acuta (APPs). Le APPs positive sono coinvolte nella riparazione del tessuto danneggiato, nella lotta contro i microrganismi invasori e nel ritorno allo stato di salute. Invece si ipotizza che la concentrazione delle proteine di fase acuta negative diminuisca dovuto a, una minor sintesi o ad un aumentato catabolismo (Bayne e Gerwich, 2001).

La risposta di fase acuta epatica è modulata da diverse molecole, alcune pro-infiammatorie e altre che tendono ad spegnere il processo. Tra le molecole pro-infiammatorie vi sono l'IL-6, IL-1 e il TNF- α , che attivano i fattori di trascrizione nucleare legandosi ai recettori sulla superficie degli epatociti e attivandoli per iniziare la trascrizione di geni codificanti le APPs positive. Tra le molecole che antagonizzano le citochine, vi sono l'insulina e altre che competono con esse per gli stessi recettori degli epatociti. I glicocorticoidi hanno un duplice ruolo, da una parte aumentano la sensibilità degli epatociti per le citochine e dall'altra inibiscono la produzione e il rilascio da parte dei macrofagi e dei polimorfonucleati (Moshage, 1997).

La stimolazione sul SNC, sistema nervoso autonomo (ANS) e sul sistema endocrino, accade attraverso l'asse ipotalamo-ipofisi-surrene e ipotalamo-ipofisi-gonade, inducendo dei cambiamenti nel comportamento dell'animale vertebrato.

L'ipotalamo libera *gonadotropin releasing hormone* (GnRH) e la *corticotropin releasing factor* (CRF) che a sua volta stimolano l'ipofisi a secernere *adrenocorticotropic hormone* e le ormoni sessuali (LH e FSH). La ACTH stimola la corticale delle ghiandole surrenaliche producendo cortisolo, il quale ha due ruoli, uno come anti-infiammatorio locale inibendo la sintesi di citochine e l'altro a livello sistemico rendendo gli epatociti più sensibili all'azione dell'IL-6 che stimola la sintesi delle APPs, e provocando leucocitosi.

I cambiamenti sul SNC includono: letargia, anoressia, adipsia e perdita dell'interesse sociale, sessuale e per l'ambiente. Questa stimolazione è dovuta all'azione delle

citochine e ai segnali nervosi di nocicettori e barocettori attivati conseguentemente all'edema tissutale e alla deplezione del volume intravascolare nel sito d'inflammazione.

Studi sperimentali hanno dimostrato che sia il lipopolisaccaride (LPS) che le citochine rilasciate per lo stimolo infiammatorio del LPS, attivano i due componenti del ANS, il sistema nervoso simpatico e il parasimpatico, rilasciando catecolamine e acetilcoline, rispettivamente. Queste due molecole interagiscono con i recettori nicotinici e adrenergici espressi in diversi tipi di cellule, incluse le cellule ipotalamiche e le immunitarie e infiammatorie. La attivazione dell'ANS è in grado di deprimere la liberazione di citochine da parte delle cellule infiammatorie e può influenzare le risposte ipotalamiche modulando la risposta di fase acuta (Paltrinieri, 2008).

Durante la risposta di fase acuta si osservano modificazione nel metabolismo proteico e dei carboidrati. L'aumento del catabolismo proteico nei muscoli rende disponibili gli amminoacidi per la sintesi dell'APPs, per la secrezione di immunoglobuline e di fibre di collagene, per la proliferazione di linfociti e fibroblasti, in un momento in cui l'assunzione di cibo è limitata. D'altra parte, si attivano i meccanismi di gluconeogenesi e di glicogenolisi per l'apporto di energia.

Se la APR si prolunga nel tempo e il processo infiammatorio diventa cronico, tutti questi fenomeni difensivi finiscono per esaurire le riserve energetiche dell'organismo, e con il catabolismo muscolare si va incontro ad un bilancio negativo dell'azoto con la perdita di peso vivo dell'animale ed eventuale cachessia (Gruys, 2005).

Molte citochine non sono in grado di attraversare la barriera ematoencefalica; Non è il caso dell'IL-6 che giunto al SNC stimola la liberazione di agenti pirogeni come le prostaglandine che insieme al TNF- α e ad altre alterano, a livello ipotalamico, il centro termoregolatore occasionando la febbre.

Le citochine causano anoressia mediante il rilascio di leptina da parte degli adipociti (Paltrinieri, 2008) che attraversa la barriera ematoencefalica dando sensazione di sazietà.

CAPITOLO II:

LA SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA

2 LA SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA

2.1 LA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA

La risposta infiammatoria è una reazione fisiologica protettiva e controllata dell'organismo, che si instaura in seguito ad insulti di diversa natura (infezioni, ustioni, pancreatiti, traumi, ischemie, patologie immunomediate, neoplasie). Questa risposta è considerata benigna quando il processo infiammatorio porta alla risoluzione del danno iniziale ed alla riparazione del tessuto danneggiato. L'incapacità dell'organismo di eliminare la causa scatenante può determinare l'attivazione di una risposta infiammatoria esuberante con coinvolgimento sistemico, che clinicamente si identifica con la **sindrome della risposta infiammatoria sistemica (SIRS)** (Bone et al., 1991; Davies e Hagen, 1997).

I segni clinici della SIRS, includono solitamente: ipotensione, alterazione della temperatura corporea, tachicardia, tachipnea e depressione del sensorio (Bone, 1992). Questo quadro clinico, aspecifico e indipendente dalla causa scatenante, sia essa infettiva o non infettiva, è indice di un deficit energetico cellulare, secondario a gravi disturbi del microcircolo dovuti agli effetti dannosi dell'infiammazione, alterazioni del tono vasomotore e dell'emostasi. Da una parte, la vasodilazione locale accompagnata dall'aumento della permeabilità con conseguente essudazione di liquido nel "terzo spazio", e dall'altra, l'aumento dell'aggregabilità piastrinica e l'attivazione della cascata coagulativa innescano la coagulazione intravasale disseminata che ha come conseguenza fenomeni ischemici nei tessuti (Bone, 1996)

Il perpetuarsi di tale condizione ed un mancato intervento terapeutico possono condurre ad una disfunzione multiorganica (MOF) (Bone, 1996; Davies e Hagen, 1997).

Da un punto di vista sequenziale e cronologico, una suddivisione in stadi della SIRS è stata proposta da Bone nel 1996: nel **primo stadio**, in risposta ad un insulto, il microambiente produce dei mediatori che, primariamente, evocano una reazione infiammatoria locale con il fine di reclutare le cellule del sistema reticoloendoteliale. Nel **secondo stadio**, il rilascio nella circolazione sistemica di piccole quantità di citochine è finalizzata al reclutamento ulteriore di elementi cellulari nell'area di flogosi. Questa risposta iniziale, cosiddetta "di fase acuta", viene modulata con la diminuzione del rilascio di mediatori pro-infiammatori e la liberazione di antagonisti endogeni. La risoluzione del processo flogistico, conseguente all'eliminazione della causa scatenante, porta al ripristino dell'omeostasi. Se questo non avviene, si può avere il passaggio al **terzo stadio**, caratterizzato da una risposta infiammatoria esuberante e sistemica, in cui gli effetti predominanti delle citochine pro-infiammatorie sono più nocivi che protettivi o benefici. L'abnorme produzione di agenti infiammatori avvia numerose cascate umorali risultando nell'attivazione del sistema reticoloendoteliale con perdita dell'integrità microvascolare e con l'ulteriore insulto a diversi organi distanti (Bone, 1996).

2.2 SEPSIS E SIRS

Prima della conferenza del 1991, la *sepsis* (dal greco, putrefazione) era intesa come una risposta clinica ad un'infezione. La mancanza di una terminologia e di una classificazione definite ed ampiamente condivise riguardo alla sepsi rendeva difficoltoso lo studio di questa sindrome in campo clinico, con ripercussioni negative sulla gestione dei pazienti affetti da tale patologia. L'utilizzo improprio e generico di termini, quali infezione, batteriemia, sepsi, sindrome settica e shock settico, limitava infatti, la selezione di popolazioni di studio omogenee e impediva una corretta valutazione di trial clinici riguardanti la sepsi.

Da queste premesse si partì nell'ambito della conferenza tenuta dall'*American College of Chest Physicians* e dalla *Society of Critical Care Medicine* (ACCP/SCCM) nel 1991

per trovare un ampio consenso nell'inquadramento della sepsi, tramite la definizione di una terminologia condivisa (Tab. 2.1). L'obiettivo principale di questa conferenza era di fornire uno schema concettuale e pratico che sostituisse al termine generico di sepsi quelli di risposta infiammatoria sistemica all'infezione e disfunzione d'organo sepsi-associata, che meglio definivano il processo patologico sottostante.

Gli altri due obiettivi fondamentali di questa conferenza sulla sepsi furono:

1. L'utilizzo di sistemi di punteggio per valutare la gravità della malattia
2. La creazione di linee guida per l'uso di strategie terapeutiche innovative.

Allora come oggi, la sepsi rappresenta una delle principali cause di mortalità nelle unità di terapia intensiva non coronariche (Niederman e Fein, 1990). Il riconoscimento precoce e l'istituzione di un'aggressiva terapia di supporto rappresentano l'unico strumento efficace per giungere ad un esito favorevole in corso di tale sindrome.

Infezione:

Processo patologico provocato dall'invasione di un tessuto "sterile", un fluido, una cavità corporea da parte di microrganismi patogeni o potenzialmente patogeni.

Batteriemia:

Presenza di batteri viabili nel torrente sanguigno.

Sindrome da Risposta Infiammatoria Sistemica (SIRS):

Manifestazione clinica dell'attivazione sistemica della risposta immunitaria innata, indipendentemente dalla causa.

Sepsi:

Risposta infiammatoria sistemica ad una infezione causata da batteri, virus, protozoi o miceti.

Sepsi grave:

Sepsi associata a disfunzione d'organo, ipoperfusione o ipotensione. Le manifestazioni cliniche includono acidosi lattica, oliguria ed alterazione dello stato mentale.

Shock settico:

Sepsi in cui è presente ipotensione refrattaria alla rianimazione mediante fluidoterapia.

Sindrome da Disfunzione Organica Multipla (MODS):

Alterazione delle funzioni di diversi organi tali da non poter mantenere l'omeostasi senza intervento.

Tabella 2.1 - Definizioni standard di SIRS, sepsis e MODS (Bone et al., 1992).

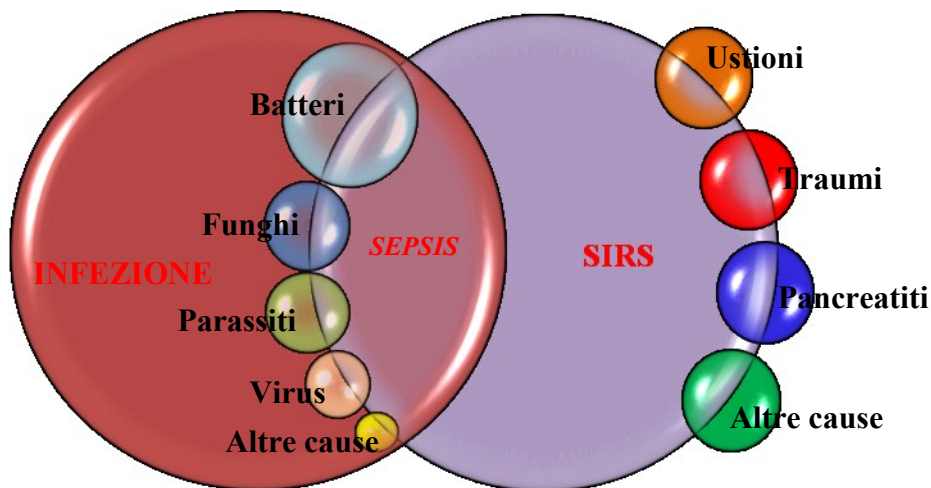


Figura 2.1 - Relazione tra SIRS, Sepsis ed infezione (Bone et al., 1992. Modificato).

Nell'ambito della conferenza sopracitata vennero quindi definiti dei criteri clinici classificativi della sindrome di risposta infiammatoria sistemica (Bone e al., 1992):

1. Temperatura corporea superiore a 38°C o inferiore a 36°C
2. Frequenza cardiaca superiore a 90 battiti per minuto
3. Tachipnea (più di 20 atti respiratori per minuto) o iperventilazione con una PaCO₂ inferiore a 32 mmHg
4. Alterazione nella conta leucocitaria (meno di 4000cell/ μ o più di 12000cell/ μ), oppure la presenza di più di un 10% di neutrofili immaturi o banda.

La progressione della SIRS può portare alla compromissione funzionale di diversi organi (danno polmonare acuto, insufficienza renale acuta, etc.), esitando nella cosiddetta *sindrome di disfunzione multiorganica* (MODS), che rappresenta uno stadio avanzato della patologia, in cui l'omeostasi non può essere ristabilita senza intervento.

La MODS può essere primitiva, quando è l'esito di un insulto diretto su un organo, da cui scaturisce l'alterazione funzionale (ad esempio una contusione polmonare come conseguenza di un trauma toracico). Si parla, invece, di MODS secondaria, quando essa non origina da un danno organico diretto, ma come conseguenza della risposta

infiammatoria esuberante dell'ospite. Quest'ultima è in grado di determinare un danno funzionale anche in un organo distante dall'insulto iniziale, che si manifesta dopo un periodo di latenza a seguito dell'evento dannoso (Bone et al, 1992).

2.3 NUOVI CRITERI DIAGNOSTICI PER LA SEPSI

La mancanza di un *gold standard* rende complicata la diagnosi di sepsi. È fondamentale arrivare ad una diagnosi precoce del processo patologico, visto l'inefficacia delle terapie, se iniziate tardivamente. L'esame potenzialmente più specifico di fronte ad un sospetto clinico di sepsi è la coltura microbiologica: tale procedura ha un'elevata percentuale di falsi negativi e inoltre, l'esito richiede tra 24 e 48 ore di tempo (Mitaka, 2005).

I criteri clinici classificativi della SIRS, stabiliti nel 1991, tuttavia hanno evidenziato scarsa sensibilità e specificità; il che ha portato alla necessaria revisione di essi e all'identificazione di altri criteri che garantissero un migliore inquadramento diagnostico e prognostico dei pazienti settici. Di conseguenza, l'*International Sepsis Definitions Conference*, tenutasi a Washington nel 2001, definì nuovi criteri più ampi, basandosi su parametri infiammatori, emodinamici e relativi all'ipoperfusione tissutale ed all'insufficienza d'organo (fig. 2.3) (Levy et al., 2003). Questi nuovi strumenti consentivano di caratterizzare in maniera più accurata la sindrome settica, rendendosi di grande utilità come criteri prognostici e diagnostici. In questa sede, emerse anche l'utilizzo di indicatori biologici o biomarker, ovvero molecole bioattive oggettivamente misurabili e rinvenibili nel sangue o nei campioni biologici, in grado di identificare e monitorare l'andamento di processi fisiologici o patologici o le risposte ai trattamenti farmacologici (Levy et al., 2003; Marshall et al., 2003). Nell'ambito della stessa conferenza, viene proposto un nuovo sistema di valutazione della sindrome settica, che permettendo la stadiazione clinica, consentiva di suddividere i pazienti in base alla loro predisposizione a sviluppare patologie e alla loro potenziale risposta alla terapia (Levy et al., 2003).

Variabili Generali

Febbre (temperatura >38,3°C) o Ipotermia (temperatura <36°C)
Frequenza cardiaca >90 bpm o >2SD rispetto al valore normale per l'età
Tachipnea > 30apm
Stato mentale alterato
Edema significativo o bilancio fluido positivo (>20ml/kg in 24 ore)
Iperglicemia (glicemia >120 mg/dl in assenza di diabete mellito)

Variabili Infiammatorie

Leucocitosi (WBC >12.000/μl), leucopenia (WBC <4.000/μl) o WBC normale ma con più del 10% di forme immature
Proteina C reattiva plasmatica >2SD sopra il valore normale
Procalcitonina plasmatica >2SD sopra il valore normale

Variabili Emodinamiche

Ipotensione arteriosa (P. Sistolica <90 mmHg, MAP <70 mmHg o calo della P. Sistolica maggiore di 40 mmHg negli adulti o di 2SD inferiore al valore normale per l'età
Saturazione mista venosa d'ossigeno >70%
Indice cardiaco >3,5 l/min/M

Variabili legate a disfunzione d'organo

Ipossiemia arteriosa (PaO₂/FiO₂<300)
Oliguria acuta (output urinario <0,5 ml/kg/h)
Incremento della Creatinina >0,5mg/dl
Alterazione del profilo coagulativo (INR >1,5 o aPTT >60 sec)
Ileo paralitico
Trombocitopenia (Conta piastrinica <100.000/μl)
Iperbilirubinemia (>4 mg/dl)

Variabili legate alla perfusione tissutale

Iperlattemia (>1mmol/L)
Diminuzione del tempo di riempimento capillare

Tabella 2.2- Criteri per la diagnosi di Sepsis (Levy et al., 2001)

2.4 IL SISTEMA PIRO

Visto che le definizioni prima elencate di sepsi, sepsi grave e shock settico non servivano per stadiare i pazienti e stabilire una prognosi, divenne necessario lo sviluppo di un nuovo sistema, che permettesse di classificare e stratificare i paziente affetti dalla sindrome settica in base alla prognosi e alla risposta alle terapie. Levy e colleghi presero come modello il sistema TNM, creato da Pierre Denoix nel 1946, per la stadiazione dei tumori maligni. Per ogni tipo di tumore, la sopravvivenza è correlata ai sottogruppi TNM (Denoix, 1946). Con un approccio simile, venne creato un nuovo schema di classificazione per la sepsi, denominato sistema **PIRO** (*Predisposition, Insult,*

Response, Organ dysfunction). Questo sistema stratifica i pazienti in base alle loro condizioni predisponenti per sviluppare la malattia (P); alla natura ed estensione dell'insulto (I), nel caso della sepsi, un'infezione; alla natura e alla magnitudo della Risposta dell'ospite (R) e al grado di disfunzione d'organo concomitante (O) (Levy et al. 2003).

Predisposizione

I fattori predisponenti hanno un sostanziale impatto sull'*outcome* nella sindrome settica, modificando sia il processo patologico sia l'approccio terapeutico. I fattori genetici giocano un ruolo molto importante nella determinazione del rischio di morte prematura dovuta a sepsi, più di altre patologie, come il cancro o le patologie cardiovascolari (Levy et al., 2003). Uno studio recente ha mostrato una predisposizione su base genetica a sviluppare infezioni gravi e shock settico negli individui (Opal, 2005). Tra i fattori genetici associati ad un maggior rischio di sviluppare infezioni sono compresi i difetti nella risposta immunitaria innata, come ad esempio alterazioni nel Sistema del Complemento, difetti dei neutrofili, alterazioni degli antigeni estranei ed alterazioni nei meccanismi coagulativi e fibrinolitici (Levy et al., 2003; Opal, 2005).

Insulto

L'insulto, nel caso della sepsi, è determinato da un'infezione. Il sito, il tipo e l'estensione dell'infezione ha un impatto significativo sulla prognosi della suddetta sindrome. Ad esempio, una polmonite o una peritonite hanno maggior rischio di mortalità di un'infezione del tratto genito-urinario. Un'infezione provocata da batteri Gram negativi avrà ripercussioni più gravi sulla risposta dell'ospite di un'infezione da Gram positivi (Opal e Cohen, 1999; Levy et al., 2003). La prognosi della sepsi viene influenzata dal sito anatomico dell'infezione e dalla natura e virulenza intrinseca del microorganismo causante l'infezione. La "T" del sistema TNM descrive l'aspetto del cancro che può essere trattato chirurgicamente; mentre la "I" del sistema PIRO descrive l'aspetto del processo settico che risponde a una antibiotico-terapia convenzionale. In assenza di una dannosa risposta dell'ospite che evolva in una disfunzione d'organo, la

terapia per se stessa sarebbe curativa (Marshall et al., 2003).

Risposta

“R” denota la risposta dell’ospite. Se la risposta si scatena in modo adeguato ha un ruolo protettivo, ma può diventare deleteria se si manifesta in maniera eccessiva o insufficiente (Marshall et al., 2003).

Le terapie d’uso corrente nella sepsi mirano più alla risposta dell’ospite piuttosto che all’organismo infettante (Levy et al., 2003).

Questa componente del PIRO rappresenta l’elemento chiave per comprendere la patogenesi della sepsi e dello shock settico. La complessità della risposta dell’ospite e la diversità delle reazioni ai distinti microrganismi rappresenta una difficoltà nel suo studio. Vi sono molti fattori come l’età del paziente, lo stato nutrizionale, il sesso, la genetica, processi patologici sottostanti, che possono incidere sulla risposta immunitaria innata ed acquisita dell’ospite ad un’infezione (Opal, 2005).

La sua caratterizzazione da un punto di vista qualitativo e quantitativo rappresenterebbe un ottimo strumento diagnostico e prognostico nella gestione clinica dei pazienti critici. L’utilizzo di marcatori biologici fornisce un importante contributo in questo contesto (Levy et al., 2003).

Oggi, diverse molecole vengono utilizzate come biomarker nella pratica clinica, fornendo informazioni utili nella gestione dei pazienti affetti da tale sindrome: tra queste vi sono le citochine, le proteine di fase acuta, ormoni dello stress, fattori endocrini e molecole intracellulari. Le molecole più utilizzate sono la proteina C reattiva (CRP), l’interleuchina 6 (IL-6) e più di recente la procalcitonina (PCT) (Levy et al., 2003; Marshall et al., 2003).

Una migliore comprensione dello stato della risposta dell’ospite ad una infezione sistemica faciliterebbe enormemente l’uso più appropriato delle terapie nei pazienti settici (Opal, 2005).

Esiste una chiara sovrapposizione tra i quattro componenti del PIRO, e in determinati

pazienti, uno degli elementi può dominare sopra gli altri determinando, in questo modo, l'*outcome* (Opal, 2005).

Disfunzione d'organo

Analogamente al TNM, "O", ovvero, la presenza di disfunzione d'organo in corso di sepsi è simile alla presenza di metastasi nelle forme tumorali. Certamente, la gravità di questa sequela finale della sepsi è determinante per la prognosi dei pazienti settici (Opal, 2005; Levy et al., 2003).

La ragione per cui pazienti affetti da simili insulti di natura settica sviluppino una progressiva e multipla disfunzione d'organo non è tuttora chiara. Spesso è difficile determinare se la disfunzione d'organo sia dovuta ad un processo patologico sottostante o al meccanismo settico in sé (Opal, 2005).

La quantificazione obiettiva del quarto elemento del PIRO è di vitale importanza per classificare e stadiare i gruppi di pazienti critici e inoltre, per consentire l'identificazione dell'esistenza, del tipo e dell'estensione della disfunzione d'organo. A questo scopo, sono stati creati diversi sistemi di punteggio, che fornissero degli indici di disfunzione organica con la finalità di monitorare il paziente, in modo seriale, e di apportare eventuali modifiche alle strategie terapeutiche intraprese (Marshall et al., 2003). I sistemi più utilizzati sono il MODS (*Multiple Organ Dysfunction Score*), il SOFA (*Sequential Organ Failure Score*) (Bota et al. 2002) e l'APACHE (*Acute Physiology And Chronic Health Evaluation*).

Questi sistemi si basano sulla valutazione di variabili relative alla funzionalità dei diversi organi o apparati (respiratorio, cardiovascolare, renale, epatico, gastroenterico, ematologico, neurologico). Per ciascun organo viene assegnato un punteggio da 0 a 4 secondo il grado di compromissione. Il rilevamento precoce, tramite l'utilizzo di questi punteggi, di una sindrome da disfunzione multiorganica (MODS) consente d'instaurare il più rapidamente una terapia aggressiva di supporto, che risulta attualmente lo strumento più efficace per aumentare la sopravvivenza (Bota et al., 2002; Johnson et al., 2004).

2.5 BIOMARKER

Nell'ambito della conferenza SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS del 2001 venne raccomandato l'utilizzo di indicatori biologici come strumenti per lo studio della sepsi. I marcatori biologici o *biomarker* sono molecole bioattive oggettivamente misurabili e rinvenibili nel sangue o nei campioni biologici. Visto che la **Risposta dell'ospite** si dimostrò come colonna basilare nella patogenesi della sindrome settica, questo fatto determinò l'interesse nello studio dei biomarker. Questi fattori dovrebbero essere in grado di:

- monitorare l'andamento di processi fisiologici e patologici (lo stadio della malattia)
- monitorare le risposte dell'organismo a terapie mediche o chirurgiche
- garantire una diagnosi accurata e precoce
- consentire la formulazione di una prognosi (Levy et al. 2003).

Un biomarker è clinicamente utile quando è altamente sensibile, quindi varia significativamente in seguito ad un determinato processo biologico; molto specifico per la sostanza o per il processo che si vuole monitorare. Inoltre, dovrebbe essere rilevabile in modo semplice ed economico e i risultati ottenuti su uno stesso campione mantenuto in condizioni biologicamente stabili, dovrebbero essere riproducibili (Marshall et al., 2003; Reinhart et al., 2006).

L'utilità derivante dalla misurazione dei biomarker può derivare da:

- stabilire una diagnosi e quindi identificare i pazienti affetti da una determinata malattia e che possono rispondere ad una particolare terapia
- quantificare la gravità di una patologia, in modo da formulare una prognosi
- valutare precocemente il grado di risposta alla terapia in maniera tale da determinare come i pazienti rispondono all'intervento terapeutico stabilito ed eventualmente modificare la strategia terapeutica.

Un biomarker può avere un ruolo diagnostico: classifica i pazienti, differenziando tra quelli affetti o meno da una malattia. L'utilità è quella di provvedere informazioni, che

consentano di stabilire una decisione terapeutica.

Un biomarker può avere un ruolo prognostico, pur non apportando nessuna informazione sulla diagnosi, l'eziologia o i meccanismi della patologia in atto. Ad esempio, l'APACHE II *score* è un potente strumento per predire la mortalità ospedaliera nei pazienti dell'unità di terapia intensiva, ma non è influenzato dal processo responsabile di tale rischio.

I biomarker sono variabili dinamiche, che devono poter essere rapidamente misurabili, per consentire un monitoraggio seriale del processo morboso in corso e dettare eventuali cambi nella strategia terapeutica. Esempi di marker di risposta includono la PO₂, l'indice cardiaco o la concentrazione di emoglobina, conosciuti anche come *target* terapeutici (Marshall et al., 2003).

Diversi biomarker vengono utilizzati nella pratica clinica avendo dimostrato la loro utilità e la loro superiorità nei confronti di reperti clinici e dei test convenzionali e oltre 100 molecole distinte sono state proposte come *biomarkers* di Sepsis (Marshall et al., 2003).

2.5.1 MARKERS DI SIRS/SEPSIS

I primi segni clinici della sepsi sono spesso aspecifici (febbre, leucocitosi); quelli più tardivi e specifici, come l'ipotensione arteriosa o l'aumento della lattatemia, indicano un'imminente progressione verso la disfunzione d'organo (sepsi grave) associata a un aumento del tasso di mortalità dal 35% al 70% (Reinhart et al., 2006). Per ridurre la mortalità significativamente, un marker di sepsi ideale dovrebbe fornire una diagnosi precoce per garantire un trattamento tempestivo (Rivers et al., 2001). I biomarker di sepsi derivano da una complessa risposta dell'ospite (umorale e cellulare) ad un stimolo infettivo. Tossine batteriche o superfici di membrana di antigeni (patroni molecolari associati a patogeni o PAMP) possono avviare l'attivazione dei sistemi della risposta immunitaria innata: plasmatici (Complemento, cascata coagulativa, sistema kallikreina-kinina, eicosanoidi) e cellulari (granulociti, macrofagi, cellule

endoteliali), liberando differenti mediatori e molecole (citochine, chemochine, proteine di fase acuta) (Reinhart et al, 2006).

2.5.1.1 Proteina C- Reattiva

La proteina C-Reattiva (CRP), è la prima proteina di fase acuta che è stata descritta (Pepys e Hirschfield, 2003, Anderson e Schmidt, 2010). Questa APP positiva viene secreta in circolo dal fegato dopo la stimolazione di mediatori dell'infiammazione, come l'IL-1, IL-6 e l'IL-8, a 4 o 6 ore dall'insulto flogogeno, e duplica il suo valore entro 8 ore raggiungendo il picco nelle 36 o 50 ore successive allo stimolo (Gabay y Kushner, 1999; Pepys e Hirschfield, 2003; Ventetuolo e Levy, 2008; Monneret et al., 1997; Brunkhorst et al., 1998; Póvoa, 2002). Elevati livelli plasmatici di CRP riflettono l'insorgenza di una flogosi e/o danno d'organo, mentre in caso d'insufficienza epatica la produzione di CRP verrà profondamente diminuita (Pepys e Hirschfield, 2003).

La CRP possiede proprietà sia pro-infiammatorie che anti-infiammatorie (Black et al., 2004; Pepys e Hirschfield, 2003). Mentre nell'99% degli individui sani il valore normale della CRP plasmatica è inferiore a 10mg/l, questo valore può incrementarsi fino a 500mg/l in risposta ad infezioni gravi di tipo acuto (Bozza et al., 2005). L'emivita della CRP nel plasma è di 19 ore (Vigushin et al., 1993); livelli plasmatici di CRP rimangono elevati per diversi giorni una volta eliminato lo stimolo flogogeno. In aggiunta, la CRP, come biomarker di sepsi, risulta meno specifico di altri indicatori come la PCT (Claeys et al., 2002; Brunkhorst et al, 1998).

Un aumento della CRP circolante si ottiene anche in corso di infezioni minori, ma non sembra essere correlata alla gravità della risposta dell'ospite e non sembra presentare differenze tra soggetti sopravvissuti e non sopravvissuti (Meisner et al., 1999; Ugarte et al., 1999). Concentrazioni elevate di CRP si riscontrano anche in corso di patologie non infettive come patologie autoimmuni, alterazioni reumatiche, sindromi acute coronariche, tumori maligni e dopo traumi o interventi chirurgici. Brunkhorst et al. e Selberg et al. hanno dimostrato che i valori di CRP sierica non consentono di

distinguere tra sepsi e SIRS di natura non infettiva (Brunkhorst et al., 2000; Selberg et al., 2000). Luzzani et al. hanno riportato che livelli plasmatici in corso di sepsi grave erano più bassi che in corso di sepsi, suggerendo che la CRP non riflette la gravità della sepsi (Luzzani et al. 2003).

In un recente studio, Lobo e colleghi, hanno evidenziato una importante correlazione tra l'elevate concentrazioni plasmatiche di CRP rilevate all'ammissione nei pazienti critici, con un elevato rischio di disfunzione d'organo e di morte (Lobo et al., 2003).

La CRP è al momento, il biomarker più comunemente utilizzato per la valutazione della risposta infiammatoria. Per il rilevamento della sepsi, essa, risulta molto più sensibile di parametri come la temperatura o la conta leucocitaria (Póvoa et al., 1998), inoltre, è una tecnica non troppo costosa e ampiamente disponibile. La CRP è inclusa tra i criteri diagnostici per la sepsi nella *International Sepsis Definitions Conference* (Levy et al., 2001) e nonostante le sue limitazioni, la CRP, è impiegata nella diagnosi di sepsi potendo essere utilizzata quando la PCT non sia disponibile come marker di laboratorio (Anderson e Schmidt, 2010).

2.5.1.2 Le Citochine

IL-6, TNF- α , IL-1, IL-8, IL-10 e IL-12 sono le principali citochine valutate in corso di sepsi in Medicina Umana (Bozza et al., 2005; Ventetuolo et al., 2008). L'IL-6, in particolare, non è solo un mediatore della sepsi ma anche un biomarker clinico. L'IL-6 viene sintetizzata dalle cellule endoteliali, fibroblasti, monociti/macrofagi durante la SIRS associata, non solo a cause infettive, ma dovute anche a stress, danni tissutali, trauma e morte cerebrale (Song e Kellum, 2005). La influenza soppressiva dei glicocorticoidi sulla produzione dell'IL-6 è stata dimostrata prima *in vitro* (Woloski et al., 1985) e quindi *in vivo* su pazienti critici (Weis et al., 2009). Nell'uomo, il fegato sembra essere il principale organo *target* dell'IL-6, inducendone la produzione di CRP e LBP (*lipopolysaccharide binding protein*); dunque, elevati livelli di IL-6 plasmatica si rileveranno molto prima dell'incremento delle due proteine sopra nominate (Gaini et al.,

2006). Fong e colleghi, hanno dimostrato un importante incremento della concentrazione di IL-6 nel siero di un gruppo di volontari, in cui, era stata somministrata per via endovenosa una piccola quantità di endotossina, rilevando un picco dell'IL-6 già a due ore dall'iniezione (Fong et al., 1989), mentre il picco della PCT e della CRP non si otteneva prima delle 6-8 ore e delle 36-48 ore, rispettivamente, successive all'iniezione. Perciò, l'IL-6 si ritiene un marker molto interessante nella valutazione della prima fase della sepsi, in più, pare essere superiore alla PCT come marker diagnostico d'infezione e sepsi (Gaini et al., 2009), contrariamente alla maggior parte degli studi che ritengono la PCT come il biomarker più attendibile ed specifico per il rilevamento di una infezione (Harbarth et al., 2001; Muller et al., 2000; Aikawa et al., 2005).

L'IL-6 e l'IL-8 sono strettamente correlate alla gravità della risposta dell'ospite ad un'infezione o ad infiammazione sistemica (Wakefield et al., 1998). Si è visto che l'IL-6 plasmatica aumenta più di 1000 volte nei pazienti con sepsi e inoltre, mostra correlazione con il grado di disfunzione d'organo e con la prognosi (Reinhart et al., 2006). In pazienti neutropenici, i livelli circolanti di IL-6 e IL-8, al contrario della CRP, mostrano una differenza significativa tra pazienti con infezione confermata e pazienti con febbre di origine sconosciuta (Engel et al., 1998).

Misurazioni combinate dei livelli plasmatici di IL-6 e IL-8 si sono dimostrate predittori precoci di sepsi neonatale con alta sensibilità ed specificità (Berner et al., 1998). Diversamente, l'IL-8 ha una bassa sensibilità nel rilevare necrosi infetta in pazienti affetti da pancreatite necrotica (Rau et al., 1989). Livelli elevati di IL-6 e IL-8 sono stati rinvenuti in pazienti dopo una chirurgia maggiore (Shenkin et al., 1989), in seguito ad un grave trauma (Nast-Kolb et al., 1997), in soggetti affetti da patologie autoimmuni (Kutukculer et al., 1998; Robak et al., 1998), da infezioni virali (Gendrel et al., 1997; Malaguarnera et al., 1997) e in pazienti con rigetto dopo trapianto d'organo (Kita et al., 1996). Per cui, l'IL-6 e l'IL-8 sembrerebbero essere meno specifici nella diagnosi di sepsi. Ad ogni modo, l'IL-6 ha dimostrato di essere utile come indicatore di sepsi neonatale (Reinhart et al., 2006).

Diversi studi riportano che l'IL-6 e l'IL-10 aumentano in corso di sepsi e che possono essere indicatori predittivi di shock settico e di morte (Marchant et al., 1994; Pinsky et al., 1993).

L'aumento significativo dei livelli plasmatici di TNF- α in corso di risposta infiammatoria sistemica è potenzialmente deletereo per l'organismo per gli effetti sul metabolismo e sull'emodinamica (Mak e Saunders, 2006), tuttavia, la secrezione di TNF- α in circolo sembra piuttosto variabile in corso di sepsi, per cui il suo utilizzo come biomarker non sembra essere di maggiore utilità (Wakefield et al., 1998).

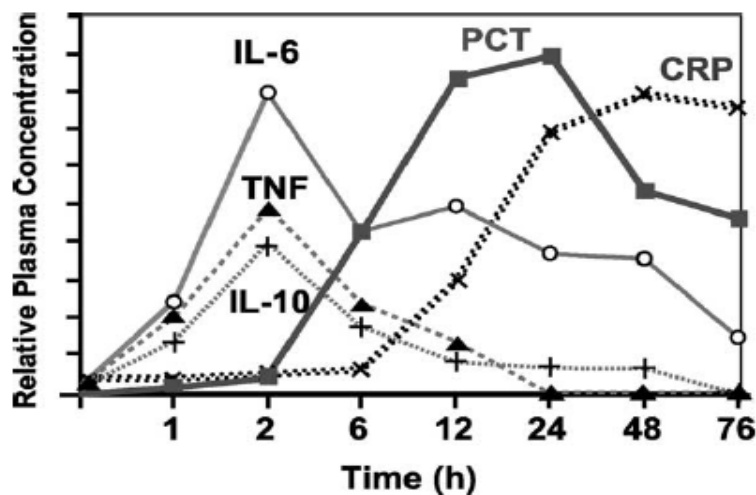


Fig. 2.2 – Cinetica dei marker plasmatici della risposta infiammatoria acuta dopo iniezione di endotossina in un gruppo di volontari. (Modificata da Reinhart et al., 2006).

2.5.1.3 La Procalcitonina (PCT)

La procalcitonina (PCT), pro-ormone della calcitonina (CT), è un polipeptide di 116 amminoacidi e con un peso molecolare di 13 kDa. Essa viene sintetizzata nelle cellule parafollicolari o cellule C, della tiroide e in alcune cellule neuroendocrine polmonari, all'interno delle quali subisce un clivaggio enzimatico originando l'ormone maturo CT (32 AA) coinvolto nel mantenimento dell'omeostasi del calcio. Nei soggetti sani, i livelli plasmatici della PCT sono riportati quasi al di sotto della soglia di rilevamento analitico (minori di 0,1ng/ml). In pazienti settici, la PCT sierica aumenta di oltre 5000 a 10000

volte, mentre i valori di calcitonina rimangono nel range di riferimento (Assicot et al., 1993). Sebbene il ruolo patofisiologico della PCT e i suoi siti di produzione non siano complemente chiari in corso di sepsi, sembra che il maggior stimolo per la sua induzione siano le endotossine batteriche (Dandona et al., 1994) e l'azione delle citochine pro-infiammatorie. Oltre alle infezioni batteriche; anche chirurgia maggiore, ustioni e trauma grave provocano una aumento di PCT. Presumibilmente, queste patologie vanno accompagnate dalla traslocazione di lipopolisaccaride o altri prodotti batterici dall' apparato gastroenterico alla circolazione sanguigna (Ryan et al., 1992; Ammori et al., 2003; Magnotti e Deitch, 2005).

Il monitoraggio giornaliero della PCT può essere utile come indicatore precoce di complicazioni settiche in corso di chirurgia, ustioni o trauma (Reith et al., 1998). I livelli plasmatici di PCT, osservati in queste ultime condizioni, non sono così elevati come lo sono invece in corso di *Sepsis* grave o *Shock* settico. Un'altro studio eseguito su pazienti pediatrici, conferma la sensibilità e specificità superiore della PCT rispetto ad altri marker (CRP e WBC) come valore predittivo dello shock settico (Hatherill et al., 1999). Clec'h et al. concludono che la prognosi su pazienti con shock settico può stabilirsi con la determinazione della PCT al giorno dell'ammissione. L'utilizzo routinario della PCT come strumento diagnostico e per il monitoraggio di essi, migliora la gestione ed incrementa la sopravvivenza (Clec'h et al., 2004).

Il picco di PCT si ha 2 ore dopo l'avvenimento dell'endotossiemia o batteremia (Dandona et al., 1994; Brunkhorst et al., 1998). Diversi studi confermano PCT come marker d'infezione grave e Sepsis (Meisner, 2000). Pazienti con un livello uguale o inferiore a 0,5 ng/ml è poco probabile che siano affetti da Sepsis grave o Shock settico, mentre livelli al di sopra 2 ng/ml identifica a pazienti ad alto rischio (de Werra et al., 1997; Muller et al., 2000). Concentrazioni superiori a 10 ng/ml si verificano spesso in pazienti con disfunzione d'organo lontana dal sito di infezione primario (Monneret et al., 1997; Meisner et al 1999). Diversi studi hanno riscontrato un elevata tasso di PCT sierica in corso di infezione locale con emocultura negativa e in assenza dei classici sintomi della sindrome settica (Becker et al., 2008). Shimetani et al ritengono molto

utile l'inserzione della PCT nel diagnostico differenziale per le infezioni gravi (Shimetani et al., 2004).

In diversi studi, la PCT si è mostrata superiore come indicatore prognostico in pazienti critici rispetto a TNF- α , IL-6 o CRP (de Werra et al., 1997; Oberhoffer et al., 1999). L'uso della PCT con metodi ultrasensibili è in aumento nel monitoraggio delle terapie antibiotiche, avendo dimostrato di ridurre la durata dei trattamenti, il tempo e di conseguenza i costi di ospedalizzazione (Christ-Crain et al., 2007).

CAPITOLO III

LA SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA IN MEDICINA VETERINARIA

3 LA SINDROME DA RISPOSTA INFIAMMATORIA SISTEMICA IN MEDICINA VETERINARIA

3.1 LA SIRS NEL CANE

Molte delle conoscenze in ambito veterinario riguardo SIRS, *Sepsis* e MODS sono state estrapolate dalla letteratura umana (ACCP/SCCM Consensus Conferenze, 1991). Anche se i criteri per definire e classificare queste sindromi risultano, in gran parte, applicabili in Medicina Veterinaria, studi specifici sono richiesti anche nelle specie d'interesse veterinario (Brady e Otto., 2001). Attualmente, non è disponibile un criterio standard ben definito e accettato da tutti per la diagnosi di SIRS nella specie canina. Nell'ultima decade diversi Autori, in seguito a studi effettuati su diverse popolazioni di cani, hanno apportato criteri clinici analoghi a quelli utilizzati in Medicina Umana (vedi tabella 3.1).

Criteri SIRS/ Autori	<i>Okano</i>	<i>Brady e Otto</i>	<i>Hauptman</i>
Frequenza respiratoria (atti/min)	>40	>40	>20
Frequenza cardiaca (battiti/min)	>160	>120	>120
Temperatura (°C)	<37,8° >39,7°	<38° >40°	<38° >39°
Leucociti (cell/μl)	<4.000 >12.000	<5000 >18.000	<6.000 >16.000

Tab.3.1 -Parametri clinici di SIRS nel cane secondo diversi autori. (Okano et al., 2002; Brady e Otto, 2001; Hauptman et al., 1997).

La presenza di due o più di questi parametri è considerata indicativa di SIRS, tuttavia, i criteri riportati mostrano tra di loro una significativa differenza nei range proposti e sono supportati da una casistica molto limitata. In aggiunta, come in Medicina Umana, i suddetti criteri si sono dimostrati poco accurati per poter formulare una diagnosi. La sensibilità di questa varia tra il 77 ed il 97%, mentre la specificità varia tra il 64 e il 77% (Hauptman et al., 1997).

3.2 IL SISTEMA PIRO NEL CANE

L'utilizzo, come in Medicina Umana, del sistema PIRO (*Predisposition conditions, Insult, Response of the host, Organ dysfunction*) per stadare la *Sepsis* è stato proposto, anche in Medicina Veterinaria, basandosi sui medesimi parametri (Otto, 2007):

Predisposizione

È stato dimostrato che certi soggetti sperimentano una risposta più grave con una prognosi peggiore rispetto alla media nei confronti di un insulto simile. Diverse variabili, come i fattori genetici, l'età, il sesso, e lo stato di nutrizione e salute, hanno un impatto nell'esito della *Sepsis* in Medicina Umana (Levy et al., 2003). In Medicina Veterinaria, l'unica possibilità è quella di valutare fattori genetici nelle razze pure. A tale proposito, uno studio ha dimostrato che, in corso di infezione da parvovirus canino, i livelli plasmatici di TNF- α sono significativamente più elevati nei cani di razza Dobermann Pinscher e Rottweiler, rispetto a cani meticci o appartenenti ad altre razze. Questa differenza nella produzione di TNF- α potrebbe essere associata alla nota predisposizione nelle due razze allo sviluppo di parvovirosi (Nemzek et l., 2007).

Una comprensione più profonda delle variazioni genetiche o individuali nella risposta infiammatoria possono consentire l'approfondimento nello sviluppo d'interventi innovativi più mirati come terapia della *Sepsis* (Otto, 2007a). Altri fattori predisponenti allo sviluppo di questa sindrome sono patologie croniche concomitanti quali diabete mellito, ipercortisolismo, parassitosi intestinali, patologie immunomediate e terapie con farmaci immunosoppressivi, condizioni ambientali inadeguate o eventi stressanti come

l'ospedalizzazione ricovero ospedaliero (Otto, 2007b).

Infezione

Il tipo d'infezione, così come la localizzazione di essa, hanno un importante impatto sull'esito del processo morboso. In Medicina Umana le infezioni sostenute da batteri Gram positivi sembrano aver un'incidenza superiore a quelle sostenute da Gram negativi (Martin et al., 2003). Sepsis causata da infezioni da Gram positivi *versus* Gram negativi non sono state ancora ben definite in Medicina Veterinaria (Otto, 2007b). La fonte di Sepsis più frequentemente riportata nell'uomo è il tratto respiratorio seguito dal tratto gastroenterico (Nguyen et al., 2006); mentre nella specie canina, è più comune il tratto gastroenterico: in uno studio condotto su 20 cani, la Sepsis originava per il 35% dei casi dal tratto gastroenterico e per il 20% dall'apparato respiratorio (de Laforcade et al., 2003). Le infezioni nosocomiali sono associate a microorganismi molto resistenti, selezionati dovuto al continuo utilizzo di antibiotici nelle strutture ospedaliere, per cui questi processi, hanno un andamento più deleterio e un tasso di mortalità superiore ad altre infezioni (Cunha, 2008). Le espressioni di *Sepsis* più riportate in letteratura nella specie canina, sono la peritonite settica (de Laforcade et al., 2003; King et al., 1994; Bentley e Otto, 2007), la polmonite batterica (Turk et al., 1990) e la traslocazione batterica intestinale in corso di parvovirosi (Otto, 2007b). I segni clinici della sepsi sono altamente influenzati dal tipo d'infezione, dalla localizzazione dell'infezione e dall'estensione di essa.

Risposta

La risposta dell'ospite è la terza categoria del sistema PIRO. Il riconoscimento precoce della sepsi è essenziale per un rapido intervento. Per definire il terzo elemento possiamo ricorrere ai criteri SIRS, nonostante i già citati limiti di sensibilità e specificità (Hauptman et al., 1997). Diversamente dalle raccomandazioni stabilite dagli Autori, per cui la diagnosi di SIRS richiede la presenza di almeno due dei parametri stabiliti, si è visto, in base ad un'indagine conoscitiva, che nella pratica clinica la maggior parte dei medici veterinari considera la presenza di almeno 3 dei 4 criteri per identificare un

soggetto come affetto da SIRS (Otto, 2007). La sepsi nel cane è caratterizzata inizialmente da una risposta iperdinamica, in cui si ha un normale o aumentato *output* cardiaco e manifestazioni cliniche caratterizzate da mucose di color rosso mattone, tempo di riempimento capillare diminuito, ipertermia, tachicardia, polso martellante, depressione del sensorio e anoressia. L'*output* cardiaco viene mantenuto grazie all'incremento della frequenza cardiaca o del volume d'eiezione per conservare la perfusione quando le resistenze vascolari e il precarico diminuiscono (Brady e Otto, 2001). La fase ipodinamica è lo scompenso della situazione precedente con alterazioni gravi dell'emostasi. I criteri SIRS vanno necessariamente supportati da indicatori precoci utili ad accelerare l'identificazione dei pazienti settici e instaurare un trattamento appropriato. Per cui, come accade in Medicina Umana, la valutazione di marcatori biologici diventa uno strumento potenzialmente utile, supportando anche in Medicina Veterinaria le ricerche in questo campo (Southwood e Russel, 2007; Otto, 2007a). La misurazione dei biomarker circolanti nei soggetti malatti è uno strumento oggettivo, potenzialmente in grado di quantificare la gravità della patologia e predirne l'esito. Uno studio condotto su un totale di 17 cani affetti da parvoviroosi, ha evidenziato la presenza di TNF- α e di endotossine circolanti in 7 di questi; inoltre, lo stesso studio ha mostrato una forte correlazione tra l'incremento dell'attività delle endotossine e il decesso durante la terapia (Otto, 1997). Un altro biomarker molto investigato in Medicina Veterinaria è la proteina C-reattiva (CRP). La presenza di alti livelli di questa proteina nel sangue è stata evidenziata in diverse patologie in grado di scatenare una SIRS o una sepsi, come in corso di pancreatite (Holm et al., 2004) o di patologie gastrointestinali (Otabe et al., 2000). Uno studio eseguito in Giappone ha evidenziato l'aumento della CRP in corso di malattie infettive, quali la leptospirosi e la parvoviroosi canina (Yamamoto et al., 1993). In uno studio recente su 53 cagne affette da piometra, in cui erano state valutate diverse condizioni cliniche e misurate diverse variabili plamastiche, solo la CRP era in grado di evidenziare uno stato di SIRS in corso di questa patologia (Fransson et al., 2007). In uno studio realizzato su 61 cani portatori di SIRS o sepsi, si è visto, invece, che non c'erano differenze significative nei livelli sierici di CRP tra cani con diagnosi di sepsi e cani affetti da una SIRS di origine non infettiva

(Gebhardt et al., 2009). Nel 2000, uno studio sperimentale su 6 cani Beagle, in cui veniva indotto un danno sulla mucosa gastrica, ha evidenziato l'utilità della misurazione della concentrazione sierica di CRP, che rifletteva lo sviluppo e guarigione delle lesioni gastriche osservate per via endoscopica e si correlava al danno indotto sulla mucosa (Otabe et al., 2000).

Un altro potenziale biomarker, oggetto di studio nel cane, è l'interleuchina-6. Elevati livelli di IL-6 sono stati correlati ad un elevato tasso di mortalità nei pazienti SIRS, inoltre, i cani settici erano quelli che presentavano concentrazioni superiori di questa interleuchina (Rau et al., 2007).

Diversi studi hanno investigato le alterazioni dell'emostasi in corso di sepsi nel cane. La presenza di uno stato di ipercoagulabilità in cani affetti da parvovirosi è stato confermato in 5 cani su 9 alterazioni tramite indagini tromboelastografiche (Otto, 2000).

Un altro studio effettuato su cani settici ha evidenziato una diminuzione significativa dei livelli plasmatici di proteina C attivata e di antitrombina, accompagnati da un aumento del tempo della protrombina, del tempo della tromboplastina parziale attivata e dei D-dimeri. Il grado di diminuzione delle sostanze anticoagulanti era direttamente correlato al tasso di mortalità, quindi maggiore nei soggetti deceduti (de Laforcade et al., 2003).

Recentemente anche la Procalcitonina è stata presa in considerazione come biomarker di sepsi nel cane. Una positività al test immunocromatografico, semi-quantitativo, (Brahms PCT-Q, B.R.A.H.M.S. Italia Srl) per il rilevamento della PCT circolante nell'uomo è stata riscontrata in 15 cani su 18 con SIRS o Sepsis (Giunti et al., 2006). Inoltre, sono stati rilevati elevati livelli di PCT circolante in risposta ad endotossemia sperimentalmente indotta nel cane (Yilmaz et al., 2008). Un altro recente studio ha dimostrato l'espressione del RNA messaggero del gene della PCT in sangue intero di cani affetti da diverse patologie infiammatorie (Kuzi et al., 2008).

Questi riscontri offrono un buon punto di partenza nelle ricerche sulla applicazione della PCT come biomarker in corso di SIRS o sepsi nel cane.

Disfunzione organica

La MODS è una condizione clinica critica con frequente esito sfavorevole. Una identificazione precoce seguita da un pronto e aggressivo intervento di supporto sono attualmente le uniche armi per migliorare il tasso di sopravvivenza.

Purtroppo in Medicina Veterinaria, siamo ancora un po' indietro nel riconoscimento e nel preciso inquadramento di questa sindrome. Ulteriori ricerche nel campo dei biomarker e la definizione di sistemi di punteggio, ampiamente condivisi, per valutare la disfunzione organica sono necessari per una migliore caratterizzazione della MODS in Medicina Veterinaria (Johnsson et al., 2004).

Alcuni esempi di sistemi di punteggio per valutare la funzionalità di organi e apparati e stabilire un indice prognostico sono comunque disponibili in Medicina Veterinaria. Platt e collaboratori hanno modificato il *Glasgow Coma Scale* come sistema di punteggio, stabilendo una correlazione tra cani con trauma cranico e le probabilità di sopravvivenza nelle 48 ore successive (Platt et al., 2001). Altri sistemi di punteggio sono stati definiti per: pancreatite acuta (Ruauux et Atwell, 1998), lesioni post-traumatiche (Rockar e Drobatz, 1994) e in generale per il paziente critico (King et al., 2001).

3.3 LE APPS IN MEDICINA VETERINARIA

Durante un'inflammatione locale o sistemica, i fagociti del tessuto infiammato producono delle citochine come l'IL-1, IL-6 e il TNF- α , che vengono rilasciate nella circolazione sistemica inducendo una sequela di risposte, definite con il nome di Risposta di Fase Acuta (APR). Lo scopo finale di questa stimolazione rapida e intensa, è di stabilire una risposta protettiva. Un aspetto importante dell'APR è il suo effetto sul fegato, concretamente, sulla modulazione delle proteine sintetizzate dagli epatociti (Gruys et al., 1994; Ceciliani et al., 2002). Come conseguenza, si avrà un veloce innalzamento della concentrazione di alcune proteine plasmatiche, denominate proteine di fase acuta positive (*Acute Phase Proteins*, APPs) di circa il 25% sopra i valori basali.

Le proteine di fase acuta positive includono proteine con attività antibatterica e

immunomodulatrice: proteina C-reattiva o CRP (Caspi et al., 1987; Du Clos e Mold, 2001), frazioni del complemento come C3 e C4, α -1-glicoproteina acida o AGP (Fournier et al., 2000), proteina legante lipopolisaccaride o LBP; con attività trasportatrice: Aptoglobina o Hp, che lega l'emoglobina; Ceruloplasmina o Cp che trasporta il rame, elemento fondamentale nelle funzioni immunomodulatrici (Bradley e Hoover, 1989); proteine che proteggono i tessuti da molecole potenzialmente pericolose: la siero amiloide A o SAA, l' α -globuline con attività antiproteasica come la α 1-antripsina.

Nei cani e nei gatti, le proteine di fase acuta maggiori, cioè quelle che più frequentemente aumentano e che si usano come marker di elezione nei protocolli diagnostici, sono CRP e AGP rispettivamente (Paltrinieri, 2007). La APP negativa più importante e più abbondante nel plasma di un animale sano è l'albumina. Questa proteina è formata da una vasta gamma di amminoacidi, e durante l'APR, la diminuzione della sua sintesi contribuisce a rendere questi amminoacidi disponibili per la sintesi delle APPs positive (Ebersole e Capelli, 2000; Murata et al, 2004; Cerón et al., 2005). Altre APPs negative come la proteina legante retinolo (RBP), la proteina legante cortisolo (CBP) e la transtiretrina (TTR), trasportano ormoni e vitamine. Quando la loro concentrazione diminuisce, in corso dell'APR, le sostanze che trasportano vengono liberate in circolo. In questo modo, queste sostanze in forma libera diventano biologicamente attive e l'organismo può farne uso senza dover incrementare la loro produzione (Paltrinieri, 2007).

Le APPs costituiscono una classe di molecole rilasciate come mediatori infiammatori in seguito ad un insulto, il loro incremento avviene rapidamente e la loro permanenza in circolo, sebbene transitoria, è tuttavia sufficientemente lunga da permetterne il rilevamento (Watterson et al., 2009).

Molte delle APPs migrano insieme alle α -globuline e l'elettroforesi delle proteine sieriche può indicare la presenza di un'APR. Se vogliamo misurarle individualmente, servono metodi colorimetrici e immunologici come l'ELISA, l'immunoturbidimetria e l'immunoradiffusione (Eckersall et al., 1999; Kjerlgaard-Hansen et al., 2003a, 2003b;

Parra et al., 2005). Non sempre sono disponibili in commercio metodi specie-specifici (Murata et al., 2004), che consentano misurazioni routinarie delle APPs; per questo motivo, il loro utilizzo è ancora, piuttosto, limitato nella pratica clinica.

3.4 APPLICAZIONE CLINICA DELLE APPS COME MARKER DI MALATTIA

L'interesse per le APPs come biomarker è cresciuto dopo la scoperta 30 anni fa, in Medicina Umana, che anche piccole variazioni nella concentrazione sierica di queste proteine, erano indice di predisposizione a malattie gravi e potenzialmente mortali, come le patologie cardiache e coronariche (Eckersall, 2000; Ridker, 2001). Da allora, il rilevamento quantitativo e seriale delle APPs fornisce informazioni molto utili, non solo nel monitoraggio e nella prognosi di una patologia, ma anche nella risposta del paziente ad un trattamento terapeutico. Il tasso plasmatico delle APPs è correlato alla gravità e all'entità della risposta infiammatoria (Eckersall, 2000; Watterson et al., 2009). La misurazione delle APPs si sta diffondendo sempre di più in Medicina Veterinaria e molte metodiche sono già state validate per diverse specie animali (Eckersall et al., 1999b; Murata et al., 2004). Inoltre, l'utilizzo delle APPs potrebbero trovare un'importante applicazione nel campo degli animali di reddito, sia nella loro produttività, sia nella sicurezza alimentare dei prodotti di origine animale (Saini et al., 1998; Chamanza et al., 1999).

3.4.1 APPS VS ALTRI MARKER DI INFIAMMAZIONE

In Medicina Veterinaria, il monitoraggio delle citochine sieriche pro-infiammatorie, come l'IL-6, l'IL-1 o il TNF α , non si è rilevato al momento molto utile, in quanto tali molecole sono molto piccole, hanno una emivita molto breve e vengono prodotte ad un ritmo pulsatile, motivi per cui sono difficilmente rinvenibili (Yamashita et al., 1994). Diversamente, in Medicina Umana, l'IL-6 è uno dei biomarker più attendibili e facilmente rilevabile (Oda et al., 2005), correlato alla gravità della SIRS ed altri

processi infiammatori (Conway et al., 2004; Mokart et al., 2005; Ridker, 2001).

La determinazione del profilo delle APPs è pertanto ampiamente utilizzata nei test di screening per le patologie infiammatorie, perché queste si sono dimostrate più sensibili rispetto a marker infiammatori tradizionali, quali la conta delle cellule della linea bianca, la conta piatrinica, il tasso di eritrosedimentazione (Erythrocyte Sedimentation Rate, ESR) e la valutazione dell'ematocrito (HCT) (Tecles et al., 2005; Matijatko et al., 2007).

In Medicina Veterinaria è stata riportata una correlazione tra la concentrazione plasmatica della CRP, la temperatura corporea, la conta leucocitaria (WBC) in cani affetti da una infiammazione sperimentalmente indotta (Yamashita et al., 1994). I vantaggi di misurare le APPs rispetto alla sola valutazione della WBC, sono i seguenti:

- Le APPs hanno una sensibilità diagnostica molto più elevata della WBC. La ceruloplasmina e l'aptoglobina si sono dimostrate sei volte più sensibili della conta leucocitaria nell'individuazione di un processo infiammatorio, ed il loro incremento si manifesta anche in quei casi in cui la WBC rimane inalterata (Solter et al., 1991). In più, la concentrazione delle APPs sono ottimi marker d'infiammazione negli animali in cui, il midollo osseo, non risponde adeguatamente allo stimolo infiammatorio (mielospressione dovuta ad agenti chemioterapici, tumorali o all'azione diretta da virus) (Kjelgaard-Hansen et al., 2003c; Jain, 1989).
- In uno studio eseguito su 928 cani affetti da patologie infiammatorie, hanno trovato una correlazione tra la CRP e la WBC: comparando la concentrazione sierica di CRP del gruppo con WBC più elevata con il gruppo con WBC nella norma, hanno rilevato che la CRP era significativamente più alta nei pazienti del primo gruppo (Nakamura et al., 2008). In teoria, l'incremento della CRP è precedente ai cambiamenti della WBC, specialmente in corso d'infiammazione, poiché le forme giovanili dei globuli bianchi devono essere generati dal midollo osseo e quindi rilasciati in circolo (Cerón et al., 2005). Invece, in seguito ad

interventi chirurgici, l'aumento delle APPs (inclusive le proteine maggiori come la CRP), non è immediato come lo è l'alterazione riscontrabile nei valori delle cellule ematiche (Kjelgaard-Hansen et al., 2003c)

- Le APPs sono analiti stabili più a lungo. Queste proteine sono più stabili delle cellule del sangue; i campioni si possono conservare per mesi in plasma e siero congelati con la conservazione integra quantitativa e qualitativa di queste proteine (Solter et al. 1991).
- In un recente studio, in cui hanno stabilito come cani piretici, quelli con temperatura corporea superiore a 39,7°C (Battersby et al., 2006), hanno trovato una correlazione tra CRP sierica e la temperatura: la CRP, è significativamente più elevata nel gruppo dei soggetti ipertermici (Nakamura et al., 2008). Il monitoraggio complessivo della CRP, la WBC e la temperatura corporea nei nostri animali, sono un valido test di screening clinico per il rilevamento d'inflammatione (Nakamura et al., 2008).
- La sensibilità di alcune di esse, in particolare della CRP, è maggiore per il fatto che a differenza di altre APPs (come l'Hp) o del WBC, non sembra essere alterata dalla somministrazione di corticosteroidi, risultando un buon marker d'inflammatione anche quando gli animali sono sotto terapia corticosteroidica (Nielsen et al., 2007).

La misurazione contemporanea di più APP piuttosto che di una sola di esse, può fornire indicazioni e informazioni maggiori (Jain, 1989; Eckersall, 1995). L'utilizzo di profili che comprendano almeno una APP maggiore (come la CRP o la SAA), una moderata (come l'Hp, l'AGP, Fib o la Cp) e una negativa, può risultare molto più utile che non la determinazione delle proteine singolarmente (Cerón et al., 2005). L'utilizzo di una APP maggiore come la CRP in associazione con una più moderata come l'Hp è consigliato per individuare stati patologici differenti e per ottenere ulteriori dati sull'evoluzione della malattia. In fine, il monitoraggio combinato delle APPs può permettere di distinguere tra un processo acuto da un cronico (Eckersall, 2003; Cerón et al., 2005).

3.4.2 FATTORI CHE POSSONO INFLUENZARE I RISULTATI

3.4.2.1 Stoccaggio

Uno studio assicura che la CRP canina è stabile a -10°C per almeno 3 mesi (Riley e Zontine, 1972). Un'altro studio sostiene che la CRP è stabile a -20°C per 2 mesi e viene inattivata se sottoposta a 70°C per 30 minuti (Dillman e Coles, 1966). Tuttavia, questi studi devono essere valutati con cautela, poichè sono stati utilizzati anticorpi anti-CRP umana per valutare la CRP canina (Cerón et al., 2005).

La Hp è più stabile nel siero che non in preparazioni purificate (Parra et al., 2004b). Tuttavia, una diminuzione della concentrazione della Hp è stata rilevata in campioni stoccati a -20°C. La temperatura proposta per stoccaggi di lunga durata è stata -70°C (Weidmeyer e Solter, 1996).

3.4.2.2 Anticoagulanti

Uno studio ha comparato il siero con campioni di plasma ottenuti attraverso l'utilizzo di diversi anticoagulanti, quali eparina, EDTA e sodio citrato. Questi autori hanno evidenziato che i valori della CRP sono significativamente più bassi nei campioni di citrato; la SAA, invece risulta significativamente più alta in tutti i campioni di plasma rispetto al siero. La concentrazione di Cp risulta più alta in campioni con eparina, e più bassa in quelli con EDTA (Martínez-Subiela, 2003).

Aumenti della Hp sono stati evidenziati in campioni con eparina (Eckersall et al., 1999a). Tuttavia, gli effetti degli anticoagulanti sulla concentrazione delle APPs sembrano minimi e senza alcuna influenza sull'interpretazione clinica dei dati (Cerón et al., 2005).

3.4.2.3 Emolisi, lipemia e bilirubinemia

Gli effetti dell'emolisi, della lipemia e della bilirubinemia sono evidenziati nella tabella n° . Questi dati devono essere interpretati con cautela, in quanto sono stati ottenuti con metodi e kit specifici e possono esistere variazioni significative qualora siano utilizzati altri reagenti o altri analizzatori (Cerón et al., 2005). Le interferenze causate da questi fattori sono lievi e non hanno un impatto significativo nell'interpretazione clinica dei risultati ad eccezione della Hp e della CRP, qualora siano misurate su campioni emolitici con una metodica immunoturbidimetrica (Shim et al., 1971; Weidmeyer e Solter, 1996).

APP	METODICA	EMOLISI	LIPEMIA	BILIRUBINEMIA
CRP	ELISA	Aumenta*	Aumenta*	Diminuisce*
	Immunoturbidimetrico	Diminuisce del 90% se Hb=80mg/dl	-	-
SAA	ELISA	Nessun effetto	Nessun effetto	Nessun effetto
Hp	Spettrofotometrico	Diminuisce del 25-30% se Hb=0,3-10mg/ml	Nessun effetto	Nessun effetto
	Immunoturbidimetrico	Diminuisce del 70-80% se Hb>25mg/dl	Aumenta quando i trigliceridi>100mg/dl	-
Cp	Spettrofotometrico	Aumenta se Hb<2,5mg/dl; diminuisce quando Hb>2,5mg/dl*	Aumenta*	Aumenta*

Tabella 3.2 -Sostanze che possono interferire nella misurazione delle APPs in alcune metodiche analitiche. (*sin impatto clinico significativo) (Modificato da Cerón et al., 2005).

3.5 DIAGNOSI E MONITORAGGIO DI MALATTIE

Elevati valori di APPs si trovano in animali affetti da diverse malattie. La produzione rapida e intensa delle APPs non è specifica per una malattia. Avendo una scarsa specificità diagnostica le APPs non possono essere utilizzate come prima indagine diagnostica per la ricerca eziologica di una malattia particolare. Le concentrazioni di APPs circolanti segnalano se una risposta di fase acuta è in atto, ma, purtroppo, non ne individuano la causa (Kent, 1992). Le citochine, infatti, inducono la loro produzione con uno stimolo infiammatorio (di qualunque natura ed entità) o non infiammatorio, come tumori o condizioni patofisiologiche (stress o gravidanza) (Gabay e Kushner, 1999; Paltrinieri, 2007). Questa mancanza di specificità rappresenta una limitazione, ma anche un vantaggio: l'incremento di queste proteine indica che l'organismo sta combattendo contro un stimolo immunogeno. A tale proposito, se la sintomatologia persiste, il monitoraggio delle APPs può chiarire: se le alterazioni del paziente sono una sequela dell'interazione ospite-paziente, in questo caso si osservano livelli di APPs bassi; o se l'organismo sta ancora lottando contro un patogeno e allora il loro profilo sarà tuttora alterato essendo quindi necessarie le modifiche del protocollo terapeutico (Paltrinieri, 2007). Quando il trattamento istituito è efficace, le concentrazioni sieriche delle proteine di fase acuta tornano più rapidamente ai valori basali rispetto ad altri indicatori di regressione della malattia (Tecles et al., 2005).

D'altra parte, le APPs possono indurre per se stesse malattie: ad esempio, la SAA prodotta durante il processo flogistico strava nei tessuti per rimuovere le molecole potenzialmente nocive. Quando l'infiammazione persiste e diventa cronica, la SAA satura gli enzimi proteolitici accumulandosi nei tessuti come sostanza amiloide, creando una amiloidosi secondaria sistemica. In modo simile, accade nella amiloidosi ereditaria o primaria, quando fibre di SAA si accumulano nei tessuti e il soggetto è privo geneticamente dei meccanismi proteolitici in grado di eliminarle. Entrambe le reazioni sistemiche possono essere monitorate con il rilevamento di SAA nel siero (Paltrinieri, 2007).

Livelli di APPs canine diminuiscono precocemente dopo una terapia adeguata, indipendentemente dal tipo di malattia, ma rimangono elevate se la risposta al trattamento è insufficiente e il patogeno permane nell'organismo (Lobetti et al., 2000, Tecles et al., 2000). Questo evidenzia il ruolo importante delle APPs nell'impostazione e nel monitoraggio dei protocolli terapeutici nei nostri animali (Paltrinieri, 2008).

D'altronde, le APPs hanno un'altissima sensibilità nel rilevare condizioni che alterano la salute dell'animale evidenziando, inoltre, stati subclinici d'infezione o infiammazione. Ad esempio, la misurazione della AGP fu utile nel rilevamento di malattia subclinica in animali sani, che dopo due settimane, presentavano segni clinici della malattia (Ohwada e Tamura, 1995) o eventuale morte per diverse cause come, ad esempio, la parvovirus canina (Yule et al., 1997).

3.5.1.1 MALATTIE INFETTIVE

Finora, tutti gli studi effettuati su malattie infettive, indotte o naturali, hanno evidenziato un aumento della concentrazione delle APPs, con la CRP come proteina maggiore nella specie canina (Cerón et al., 2005). La SAA ha evidenziato un significativo aumento in cani infetti da *Bordetella bronchiseptica* (Yamamoto et al., 1994) e da parvovirus (Yule et al., 1997). Invece, in cani affetti da *Leishmania infantum*, le concentrazioni di SAA si sono rilevate meno sensibili (Martínez-Subiela et al., 2003).

Aumento delle APPs si è evidenziato sia in infezioni acute che croniche (Rikihisa et al., 1994). Inoltre, è stata descritta una correlazione tra i livelli plasmatici delle APPs e la gravità della malattia, con concentrazioni più elevate nei casi più gravi e complicati (Rikihisa et al., 1994; Yamamoto et al., 1994b; Yule et al., 1997).

I primi studi delle APPs nella specie felina, hanno evidenziato l'aumento della Hp in corso di patologie infiammatorie. Malgrado la sua principale funzione di legare l'emoglobina libera come conseguenza di processi emolitici, non si sono rilevati cambiamenti nella sua concentrazione in corso di anemia dovuta a emoplasmi (Harvey e Gaskin, 1978).

Nei gatti, non ci sono ancora molti studi, ma si sa che le APPs positive con ruolo più importante nell'approccio diagnostico sono la SAA e la AGP (Cerón et al., 2005; Paltrinieri, 2007; Petersen et al., 2004; Sasaki et al., 2003). L'incremento della sua concentrazione sierica si ha in corso di malattie infiammatorie, specialmente nella FIP (Giordano, 2004), ma il suo incremento è minore che in altre specie, come nell'uomo (Cerón et al., 2005). Un aumento della SAA si ha anche in corso di patologie come: insufficienza renale, neoplasie, disturbi epatici e diabete mellito (Sasaki et al., 2003). Altri studi mostrano che la misurazione della concentrazione sierica di AGP si è dimostrata significativamente utile per la diagnosi di FIP o peritonite infettiva felina. Ad ogni modo, l'aumento dell'AGP non è patognomonico di questa malattia, poichè alti livelli sono stati rinvenuti anche in gatti affetti da sindrome da immunodeficienza felina. Aumenti di altre APPs, come Hp e SAA, sono stati rilevati in gatti con la FIP. Inoltre, un aumento della Hp è stato descritto in gatti con ascessi o infezioni delle vie respiratorie alte, e un decremento della Hp in gatti affetti da emolisi associata a emobartonella (mycoplasmosi) (Cerón et al., 2005).

Valutare l'andamento delle APPs in soggetti affetti da infezioni, è molto utile nel monitoraggio dell'evoluzione clinica e nello stabilire la risposta alla terapia:

- In cane affetti da *Trypanosoma brucei*, si osservano alti livelli sierici di CRP, che diminuiscono nel momento in cui il parassita viene eliminato grazie alla chemioterapia (Ndungu et al., 1991)
- La CRP e l'AGP diminuiscono in cani affetti da *Ehrlichia canis*, nel momento in cui spariscono i sintomi clinici, anche se il parassita persiste ancora. L'abbassamento di questi biomarker indica il miglioramento del danno tissutale (Rikihisa et al., 1994).
- CRP e Cp canine diminuiscono dopo una corta terapia anti-leishmania con due protocolli diversi (Martínez-Subiela et al., 2003). La SAA con elevata concentrazione pre-terapia, mostra una discesa graduale fino a valori basali al termine della terapia (Martínez-Subiela et al., 2002).

- Livelli di CRP e AGP aumentano durante le fasi pre-sintomatiche di erlichiosi e leishmaniosi (Rikihisa et al., 1994; Martínez-Subiela et al., 2002)
- Cani affetti da babesiosi (Lobetti et al., 2000) così come cani affetti da leptospirosi (Mastrorilli et al., 2007) presentano elevati valori delle APPs . Le concentrazioni sieriche di CRP e di SAA in cani infetti naturalmente da *Babesia canis*, mostrano una diminuzione giornaliera una volta instaurato il trattamento, avvicinandosi ai loro valori basali nell'ottavo giorno (Matijatko et al., 2007).

Per quanto riguarda le malattie neurologiche nei cani, la concentrazione sierica di CRP non aumenta in soggetti affetti da meningoencefalite necrotizzante e neppure in soggetti con protrusione discale. Di conseguenza, la concentrazione sierica di CRP può dimostrarsi utile nel distinguere se la causa di una zoppia sia dovuta ad una artrite (caso in cui si ha un marcato incremento della CRP), oppure ad una patologia discale o intracranica (Nakamura et al 2008).

Malattia	APPS aumentata	Magnitudo dell'incremento	Bibliografia
Babesiosi	CRP	Non specificato	Matijakto et al., 2002
	AGP	3-5x	Lobetti et al., 2000
Bordetella bronchiseptica	CRP	95x	Yamamoto et al., 1994°
	SAA	20x	Yamamoto et al. '94b
Ehrlichia canis	CRP	3,3x-6,5x	Rikihisa et al. 1994
	AGP	1,9-8,6x	
Setticemia da E. coli	CRP	3,5-4x	Hulton et al. 1985
Leishmaniosi	CRP	25-30x	Martínez-Subiela et al, 2002
	Hp	4-5x	
	Cp	3-5x	
	SAA	80-90x†	Martínez-Subiela e Cerón 2002
Leptosirosi	CRP	16-80x (Sperimentale)	Caspi et al.1987
	CRP	30x (Naturale)	Yamamoto et 1993
Parvovirosi	CRP	20x	Yamamoto et al 1993
	SAA	30-800x	Yule et al. 1997
	AGP	2-5x	
Trypanosomiasi	CRP	Fino a 20x	Ndungu et al.,1991
	Hp	3x	

Tab. 3.3 -Incremento delle APPs in diverse malattie infettive del cane. (Modificata da Cerón et al., 2005).

Infine, le concentrazioni delle APPs possono essere influenzate da vaccinazioni, terapie

con corticosteroidi o con barbiturici e durante la gravidanza, in queste situazione è possibile avere di “falsi positivi” (Paltrinieri, 2007).

3.5.2 CHIRURGIA/ INTERVENTI CHIRURGICI

Un incremento nella concentrazione sierica di CRP è stato descritto in seguito a diversi interventi chirurgici nei cani: l'entità dell'incremento è generalmente relazionata all'intensità del trauma chirurgico (Yamamoto et al., 1993), dimostrandosi più spiccata quando il danno tissutale è di grande entità, come succede nella chirurgia ortopedica (Caspi et al., 1987).

Tutti i pazienti senza complicazioni cliniche post-operatorie, presentano un'abbassamento della CRP, al momento della rimozione della sutura e della scomparsa di sintomi, mentre il WBC rimane elevato, dimostrando una maggiore utilità della CRP nel monitoraggio del decorso post-chirurgico (Smith, 1997; Yamamoto et al., 1993).

SAA, AGP e Hp, proteine di fase acuta maggiore nella specie felina (Martínez-Subiela et al., 2003; Paltrinieri, 2007 e 2008) si sono dimostrate più elevate nei gatti ricoverati rispetto ai controlli sani non ricoverati. Inoltre, queste tre proteine si sono rilevate con un incremento da 2 a 4 volte: a distanza di un giorno dell'intervento chirurgico (Martínez-Subiela et al., 2003), indipendentemente dalla presenza o meno di complicazioni post-operatorie e dopo infiammazione sperimentalmente indotta (Kajikawa et al., 1999).

3.5.3 MALATTIE GASTROINTESTINALI

Uno studio sperimentale ha evidenziato un aumento della CRP in cani nei quali era stato indotto un danno acuto nella mucosa gastrica attraverso l'utilizzo di acido acetilsalicilico, indometacina e cloridrato di sodio (Otabe et al., 2000).

Inoltre, sono stati rilevati moderati aumenti della CRP in cani affetti da enterite (IBD) e l'entità dell'aumento ha mostrato una forte correlazione con la gravità della patologia

(Haupt et al., 1997). Gli Autori di questo studio hanno quindi proposto l'utilizzo della CRP come ulteriore criterio per valutare e categorizzare l'IBD canina e per il monitoraggio durante il trattamento terapeutico, poichè la CRP subisce un netto decremento in concomitanza con il miglioramento clinico dei soggetti (Haupt et al., 1997).

Anche in corso di patologie intestinali di altra natura, come enterite batterica e ostruzioni intestinali, sono stati riscontrati elevati valori di CRP sierica, dovuti all'infezione e al trauma rispettivamente (Eckersall, 1995).

In casi di malassorbimento causato da insufficienza pancreatica esocrina, intolleranza alimentare o sovracrescita batterica da anaerobi, tuttavia, non sono stati evidenziati significativi aumenti della CRP sierica (Caspi et al., 1987).

In cani affetti da pancreatite acuta spontanea, sono stati rilevati alti livelli di CRP sierica (Holm et al., 2004) , che erano significativamente correlati con la gravità del processo (pancreatite necrotica) rispetto a forme più moderate/blande come pancreatite interstiziale (Spillmann et al., 2002). Per cui fu suggerito l'utilizzo di misurazioni seriali della CRP per il monitoraggio della progressione clinica della malattia, così come della risposta alla terapia, in cani affetti da pancreatite acuta (Holm et al., 2004).

Le APPs possono essere utilizzate anche come marker di funzionalità epatica in quanto, in corso di cirrosi, si verifica una minore produzione di tali proteine (Sevelius e Andersson, 1995).

3.5.4 PATOLOGIE AUTOIMMUNI

Caspi e colleghi hanno evidenziato un incremento della CRP sierica in corso di artrite reumatoide canina e nella poliartrite non erosiva. In entrambi processi, i cani affetti dalla patologia in fase inattiva mostravano una CRP nei limiti della norma (Caspi et al., 1987).

Gli stessi Autori hanno evidenziato un aumento della concentrazione sierica di CRP in

cani affetti da anemia emolitica autoimmune e, naturalmente, bassi livelli di Hp (Harvey e West, 1987). Tecles et al. hanno riscontrato un significativo aumento della Cp in cani affetti da anemia emolitica autoimmune (Tecles et al., 2005).

McGrotty et al. hanno evidenziato concentrazioni circolanti di Hp nell'intervallo di riferimento o moderatamente aumentati in corso di diverse patologie autoimmuni (McGrotty et al., 2003).

3.5.5 MALATTIE ENDOCRINE

La Hp è stata particolarmente studiata nel cane affetto da ipercortisolismo, ove è stato evidenziato un moderato aumento della concentrazione sierica di Hp attribuibile alla stimolazione indotta dai glucocorticoidi endogeni (McGrotty et al., 2005).

Un incremento della CRP sierica canina si è visto anche in corso di diabete mellito e di chetoacidosi diabetica, superiore in quest'ultima (McGrotty et al 2003), analogamente a quello che accade nell'uomo (Lin et al., 2001).

È importante ricordare che in molte endocrinopatie come diabete mellito, ipercortisolismo e ipotiroidismo, i soggetti affetti da esse, sono predisposti a sviluppare infezioni secondarie, più frequenti a carico delle vie urinarie e della cute (Duclos et al., 1994). Tali processi infiammatori possono quindi, scatenare una risposta di fase acuta, che non origina dalla patologia endocrina di per sé, ma da un processo secondario.

3.5.6 NEOPLASIE

In cani con tumori mammari i valori di CRP sierica sembrano essere più elevati, qualora la neoplasia mostri disseminazione di metastasi o complicazioni, rispetto a forme neoplastiche primarie localizzate o forme benigne (Caspi et al., 1987).

In studi più recenti, si è visto che cani femmina affetti da tumori delle ghiandole mammarie potevano presentare una risposta di fase acuta. Questo accadeva per diversi fattori come: la presenza di metastasi, la grandezza della massa primaria o la

ulcerazione o infiammazione secondaria della neoplasia (Tecles et al., 2009).

Diversamente, in un altro studio eseguito su cani affetti da neoplasie mammarie le concentrazioni sieriche di CRP e Hp non hanno mostrato nè un valore predittivo di malignità, nè diagnostico (Planellas et al., 2009). L'incremento di concentrazione della CRP in cani affetti da carcinoma mammario suggerisce il ruolo infiammatorio di questo tipo di tumore (Planellas et al., 2009).

La misurazione della AGP nel siero di cani affetti da linfoma, si è rivelata particolarmente utile nella diagnosi (Hahan et al., 1999) e nel monitoraggio durante il trattamento con doxorubicina, in quanto la concentrazione della AGP diminuisce in modo significativo con la completa remissione dei sintomi (Ogilvie et al., 1993), per aumentare nuovamente 3 settimane prima della recidiva (Hahan et al., 1999). Anche in Medicina Felina, elevati valori dell'AGP sierica sono stati rilevati in gatti affetti da linfoma (Selting et al., 2000).

Tecles et al. hanno dimostrato che cani affetti da neoplasie ematologiche mostrano un aumento della concentrazione sierica di: Hp, Cp, SAA e CRP; tuttavia, solo la Hp e la CRP sono statisticamente rilevanti. In questo studio, non sono state riscontrate significative differenze tra cani affetti da leucemia e quelli affetti da linfoma (Tecles et al. 2005).

PATOLOGIA	APP AUMENTATA	BIBLIOGRAFIA
Anemia Infiammatoria	Hp, AGP	Ottenjann et al., 2006
Diabete Mellitus	SAA	Sasaki et al., 2003
Infiamm. Sperimentale	Hp, SAA, AGP	Harvey e Gaskin, 1978; Kakiwaka et al. 1999
Coronavirus (FeCoV)	AGP	Cecilianani et al., 2004; Giordano et al., 2004; Paltrinieri et al., 2006-2007.
Calicivirosi Felina	AGP	TerWee et al., 1997
Clamydiosi Felina	AGP	TerWee et al., 1998
Leucemia Felina	AGP	Duthie et al., 1997
Peritonite Infet. Fe (FIP)	Hp, SAA	Harvey e Gaskin, 1978; Bence et al. 2005; Duthie et al., 1997; Giordano et al., 2004
	AGP	Kajikawa et al. 1999; Paltrinieri et al. 2007; Stoddart et al., 1988
Immunodefic. Fe (FIV)	AGP	Duthie et al., 1997
Ricovero	Hp, SAA, AGP	Kajikawa et al., 1999
Malattia Infettive (varie)	Hp, AGP, SAA	Harvey e Gaskin, 1978; Sasaki et al., 2003; Hansen et al., 2006; Paltrinieri et al., 2007
Danno Tissutale	SAA	Sasaki et al., 2003
Linfoma	AGP	Correa et al., 2001
Orientali e Abyssini sani e con Amiloidosi	SAA	DiBartola et al., 1989
Insufficienza Renale	SAA	Sasaki et al., 2003
Interv. Chirurgico	Hp, SAA	Kajikawa et al., 1999; Sasaki et al., 2003
Tumori	AGP	Selting et al., 2000; Sasaki et al., 2003
Patol. del tratto urinario	SAA	Sasaki et al., 2003

Tab. 3.4-Riassunto delle condizioni patologiche o fisiopatologiche che fanno aumentare le APPs nel gatto. (Modificata da Paltrinieri., 2008)

3.6 ALTRE APPLICAZIONI DELLE APPS

Nel cane, aumenti di CRP sierica sono stati descritti in patologie infiammatorie come polmonite e piometra (Yamamoto, 1994 e 1993).

D'accordo con Sevelius e Andersson, le APPs sono state usate come test di funzionalità epatica (Sevelius e Andersson, 1995).

Parra et al. differenziarono tra trasudato ed essudato a seconda della concentrazione di CRP presente (Parra et al., 2004).

Le patologie infiammatorie croniche sono spesso accompagnate da anemia, con una diminuzione della transferrina ed aumento della ferritina sieriche (Liste et al., 1995). La transferrina (TIBC o capacità totale di legare il ferro; che a scopo clinico rappresenta la concentrazione di transferrina), è una APP negativa, la cui concentrazione scende durante l' APR (Nguyen, 1999). La deplezione di ferro disponibile in circolo, in queste situazioni, previene la colonizzazione batterica, limitando la disponibilità di questo ione necessario per il metabolismo dei batteri (Flo et al., 2004).

L'anemia da malattia infiammatoria (AID, *anemia of inflammatory disease*) è un'anemia lieve, normocitica, normocromica e non rigenerativa, associata a processi flogistici acuti e cronici (inclusi i traumi, le infezioni, i processi immunitari e le malattie focali neoplastiche o disseminate), che si manifesta entro diversi giorni o settimane. Probabilmente, l'AID è la più comune e frequente anemia riscontrata nel cane e nel gatto. Clinicamente si tratta di un processo da carenza di ferro, tuttavia, sebbene la causa sia polifattoriale, la base fisiologica risiede nel sequestro del ferro da parte dei fagociti mononucleati (Means e Krantz, 1992; Jurado, 1997). La patogenesi è mediata dalle citochine pro-infiammatorie e deriva dal sequestro di ferro, dalla riduzione della sopravvivenza degli eritrociti e dalla ridotta risposta eritropoietica (Feldman et al., 1981; Weiss e Krehbiel, 1983). La deplezione di ferro è dovuta in gran parte all'apoferrina (lattoferrina ferro-priva), proteina che lega elevate quantità di ferro e viene rilasciata dai neutrofili nei siti d'infezione ove il pH è basso. Oltre a chelare il ferro la lattoferrina ha attività antibatterica intrinseca (Jurado, 1997). Anche le cellule epiteliali intestinali e

epatiche sono sensibili all'azione della lattoferrina contribuendo alla sua attività. L'assorbimento di ferro dal tratto gastroenterico viene diminuito a causa della ridotta sintesi di transferrina durante l'APR (Richter et al., 1989).

infine, APPs sono state utilizzate in diversi studi sperimentali per provare nuovi farmaci e nuove terapie, inoltre SAA e AGP sono state misurate, con successo, per monitorare l'efficacia del vaccino per la parvovirosi canina (Yule et al., 1997).

3.7 LIMITAZIONI DELL'UTILIZZO DELLE APPS PER MONITORARE LE TERAPIE

Quando viene eseguito un profilo biochimico che include le APPs per monitorare la risposta di un soggetto a un determinato trattamento terapeutico, bisogna tenere in considerazione le seguenti premesse:

- Sebbene le APPs rappresentino dei marker molto sensibili sono scarsamente specifiche, per cui diverse condizioni patologiche possono determinare la permanenza di livelli elevati, nonostante il soggetto risponda in maniera adeguata alla terapia instaurata (Cerón et al., 2005).
- Nei casi in cui la concentrazione di APPs rimanga nei range fisiologici nonostante lo stato di malattia, il loro dosaggio non sarà utile nel monitoraggio terapeutico (Martínez-Subiela S, et al., 2003).
- La determinazione della CRP per valutare la risposta a breve termine ad una terapia con farmaci anti-infiammatori non steroidei (FANS) non è di grande utilità, in quanto essi, non bloccano direttamente l'IL-6, principale induttore della produzione di CRP (Borer et al., 2003).
- Per il monitoraggio di una terapia a base di glicocorticoidi, è necessario l'utilizzo di una APP diversa alla Hp, data l'influenza che essi hanno su questa proteina (Martínez-Subiela et al., 2004; Harvey, 1986).

3.8 LINEE GUIDA PER IL CORRETTO UTILIZZO DELLE APPS

Nel 2008, Cerón e i suoi collaboratori hanno stabilito, basandosi negli studi che ci sono finora in Medicina Veterinaria, delle linee guida per ottimizzare l'utilizzo delle APPs nei nostri animali (Cerón et al., 2008):

1. Si devono sempre utilizzare reagenti specie-specifici. Se vengono utilizzati dei kit disegnati per altre specie, bisogna effettuare la loro completa validazione ogni volta che si sostituiscono le partite anticorpali. Si devono sempre usare controlli e standard già definiti per la specie in uso (Eckersall, 1995).
2. Un profilo completo dovrà includere almeno una delle proteine maggiori (es. CRP nel cane e la SAA o l'AGP nel gatto) e una delle proteine moderate (es. Hp, Fib, Cp, in tutte le due specie) (Cerón et al., 2005). Le APPs positive maggiori hanno un innalzamento precoce ed un altrettanto rapido declino, invece, le moderate richiedono più tempo per aumentare e anche per ritornare ai valori basali. La albumina, come APP negativa, può essere inclusa completando il profilo (Cerón et al., 2008)
3. Il profilo infettivo-infiammatorio è caratterizzato dall'incremento delle APPs moderate e maggiori e dal decremento delle APPs negative. La misurazione delle APPs si può eseguire insieme ad altri marker infiammatori come la WBC e la conta di neutrofili banda, tuttavia, le APPs risultano più sensibili nel rilevare un processo infettivo o infiammatorio (Cerón et al., 2008). Inoltre, queste molecole, hanno il vantaggio di essere molto più stabili, in quanto vengono dosate dal plasma e dal siero. Solitamente, valori molto elevati delle APPs maggiori si riscontrano in corso di patologie infettive, come infezioni batteriche sistemiche, e in processi immunomediati (Harvey e West, 1987; Ohno et al., 2006; Tecles et al., 2005).
4. In presenza di una sindrome clinica associabile a molteplici cause, infiammatorie e non, la presenza di un profilo di APPs positive fornisce elementi per sospettare una malattia infettiva-infiammatoria. In caso di zoppia, il profilo delle APPs, può

differenziare tra una poliartrite immunomediata o una patologia degenerativa come la artrosi o l'ernia discale, rendendosi fondamentale per una corretta diagnosi (Ohno et al., 2006).

5. Quando le APPs vengono serialmente misurate in corso di malattia infettiva-infiammatoria, il ritorno ai valori basali è indicatore di una risposta adeguata al trattamento e di solito si correla ad una buona prognosi. Un esempio di questo reperto è dimostrato in corso malattie infettive, come la leishmaniosi (Martínez-Subiela et al., 2003) e la babesiosi (Matijatko et al., 2007), in corso di malattie autoimmuni, come la poliartrite idiopatica canina (Ohno et al., 2006) e in corso di patologie tumorali. Quando l'utilizzo delle APPs è deputato a monitorare l'efficacia di un protocollo terapeutico, è importante ricordare l'effetto di alcuni farmaci sulla loro sintesi. I corticosteroidi e alcuni antelmintici usati nel cane possono indurre la produzione di Hp (Martínez-Subiela et al., 2004).
6. Il rinvenimento di un aumento delle APPs in animali sani senza alcun segno clinico, può essere indice di una patologia subclinica, che si svilupperà nel futuro, oppure di una ricaduta di una malattia parassitaria (Martínez-Subiela et al., 2002; Suzuki et al., 2007) o tumorale (Ohwada et al., 1995; Cerón et al., 2008).
7. Una divergenza tra i valori delle APPs maggiori e delle APPs moderate può fornire informazioni cliniche rilevanti. Un cane con un aumento della Hp e con una CRP nella norma, può indicare una produzione eccessiva di glicocorticoidi, come si verifica nell'ipercortisolismo, già morbo di Cushing. In cani affetti da ipercortisolismo con un profilo infiammatorio in cui la CRP e la Hp sono alte, può suggerire la presenza di altre condizioni patologiche di natura infettiva-infiammatoria coesistenti (es. infezioni delle vie urinarie) ma non evidenti clinicamente dovuto all'effetto anti-infiammatorio dei corticosteroidi (Caldin et al., 2006).

CAPITOLO IV

LA PARVOVIROSI CANINA

4 LA PARVOVIROSI CANINA

4.1 INTRODUZIONE

La parvovirosi canina è una malattia infettiva, molto grave, che solitamente decorre con vomito, diarrea e leucopenia e che colpisce, soprattutto, i cuccioli tra le 6 settimane e i 6 mesi di età (Pollock e Coyne, 1993).

Nel 1978, questa malattia emerse, quasi simultaneamente, in Europa e Nord America, come un nuovo agente patogeno per i cani, responsabile di miocardite nei feti e neonati e di gastroenterite emorragica nei cuccioli dopo lo svezzamento. L'agente eziologico fu identificato come parvovirus canino tipo 2 (CPV2) (Kelly, 1978; Appel et al., 1979; Burtonboy et al., 1979; Johnson e Spradbrow, 1979).

Ci sono diverse teorie per esplicitare l'origine e l'evoluzione di questo mutabile virus (Truyen, 1999). La stretta similitudine del parvovirus canino (CPV) con il virus della panleucopenia felina (FPV) ha portato a considerare quest'ultimo come un suo possibile progenitore (Parrish, 1999; Truyen et al., 1995).

Alla fine degli anni 70, il parvovirus fu identificato come la causa di un patologia gastrointestinale e respiratoria che colpiva i cani, e fu denominato virus minuto canino (Binn et al., 1970). Più tardi, questo ceppo di parvovirus canino (CPV) fu rinominato CPV-1, dopo l'emergenza del nuovo CPV-2, antigenicamente e geneticamente distinto al primo. Questa emergenza del CPV-2 nei cani fu riportata per i ricercatori tra il 1978 e il 1982 (Eugster et al., 1978). CPV-2 causò gravi enteriti con alti tassi di mortalità tra la popolazione canina (Appel e Parrish, 1987). D'allora ad oggi, l'evoluzione del FPV e del CPV-1 rimase stabile, contrariamente al CPV-2 che evolse rapidamente durante i 30 anni successivi alla sua scoperta (Truyen, 2006).

In seguito all'introduzione dei vaccini nella popolazione canina, l'attacco del virus

rimase limitato ai soggetti non vaccinati o non correttamente vaccinati e ai cani selvatici.

Negli anni 80, emerse una nuova variante di CPV-2, che fu denominata CPV-2a. Il virus rapidamente mutò ed emerse un'altra variante: la CPV-2b (Parrish et al., 1988). Recentemente, cani che erano stati vaccinati sono risultati vittime della malattia, suggerendo che il vaccino abbia solo una copertura parziale (Desario et al., 2007).

Nel 2000 in Italia, Buonavoglia e collaboratori, hanno isolato in un cane domestico un'altra variante denominata CPV-2c (Buonavoglia et al., 2001), che qualche anno dopo è stata identificata anche nel gatto (Battilani et al., 2006). Questa nuova variante 2c, a differenza della CPV-2 originaria che colpisce fondamentalmente i cuccioli, è stata ritrovata in tanti cani adulti (di età superiore all'anno) (Buonavoglia et al., 2001; Cavalli et al., 2001). Sembra che il CPV-2c stia progressivamente sostituendo la variante 2b nelle popolazioni canine italiane (Cavalli et al., 2008). Le differenze antigeniche che distinguono le tre varianti sono dovute ad un cambio di una sola sequenza aminoacidica (Cavalli et al., 2008).

Dal punto di vista clinico, sono state osservate delle differenze tra CPV-2 e le varianti 2-a e 2-b. Queste ultime due presentano una maggiore patogenicità, causando malattia dopo un periodo di incubazione più breve, con una carica infettiva minore, con una sintomatologia più grave e una più elevata mortalità. Al contrario, la malattia causata dalla variante CPV-2c sembra che abbia un decorso con una sintomatologia molto più blanda e che i cuccioli colpiti si riprendano più rapidamente (Decaro et al., 2005).

Le malattie trasmesse da parvovirus negli animali dipendono strettamente dalle caratteristiche replicative del virus: i tessuti che vengono colpiti sono quelli in attiva replicazione. Nei feti e neonati infetti si ha pantropia, mentre, negli adulti, i tessuti prevalentemente colpiti sono quelli ematopoietici ed epiteliali, soprattutto il midollo osseo e la mucosa intestinale. Pertanto, i sintomi principali saranno immunodepressione da panleucopenia e gastroenterici (vomito e diarrea emorragica) (Ponti, 2005).

La mortalità in cani affetti sperimentalmente da parvovirus e lasciati senza alcuna

terapia può arrivare al 91% (Kariudi et al., 1990).

4.2 EZIOLOGIA DELLA PARVOVIROSI

Il virus responsabile dell'enterite virale canina più importante è il CPV, appartenente alla famiglia Parvoviridae. È un virione non capsulato a simmetria icosaedrica, del diametro di soli 18-25 nm. Il suo piccolo genoma, consistente in circa 5000 basi integranti una singola catena di DNA, non è in grado di produrre tutti gli enzimi necessari per la sintesi del loro DNA, infatti, replica solo in cellule in cui il processo di mitosi sia già in atto (Ponti, 2005).

Come tutti i virus non capsulati, il parvovirus è estremamente resistente alla inattivazione chimica ed ambientale (Lamm e Rezabek, 2008), persistendo per lunghi periodi di tempo nell'ambiente (da mesi a anni) (Prittie, 2004). I virioni sono sensibili alla luce ultravioletta e vengono inattivati dagli aldeidi (formaldeide e gluteraldeide), dal β -propionolattone e da agenti ossidanti, quali l'ipoclorito di sodio (1:30) (Timoney et al., 1995; Poli, 1998).

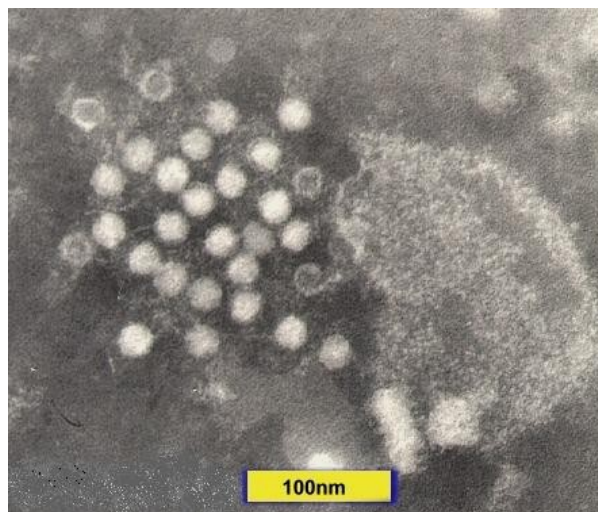


Fig 4.1: Immagine del CPV-2 al microscopico elettronico a contrasto negativo.

A quasi 30 anni della sua prima apparizione, il CPV-2 ha dimostrato una enorme capacità di mutazione, una caratteristica che gli ha permesso di ampliare lo spettro

d'ospite dal cane ad altre specie domestiche e selvatiche e quindi, di perpetuarsi (Cavalli et al., 2008).

4.3 EPIDEMIOLOGIA

Attualmente, la parvovirosi canina è una malattia cosmopolita ed endemica nella maggior parte dei canidi selvatici e domestici di tutto il mondo, le nuove varianti possono replicare anche nel gatto (Dudley et al., 2006).

Quando il CPV comparve, 30 anni fa, scatenò una grave epidemia nella popolazione canina, con tassi di mortalità elevatissimi (Truyen, 2006). L'elevata morbilità era dovuta alla mancanza di anticorpi contro il CPV. La semplice modalità di trasmissione oro-fecale unita alla grande stabilità del virus furono gli altri responsabili (Nakamura et al., 2003).

Un altro merito della profilassi vaccinale, è stato la scomparsa della forma miocardica di questa malattia. L'acquisizione di un'immunità passiva mediante il colostro, è in grado di proteggere i neonati durante le prime settimane di vita (Pollock e Coyne, 1993; Carr-Smith et al., 1997).

4.4 FATTORI PREDISPONENTI

Il parvovirus non colpisce tutti i cani nello stesso modo; le diverse varianti hanno effetti diversi in base all'età, l'immunità, la razza, la via di esposizione, la carica virale e la virulenza della variante (Sherding, 1989).

L'età:

L'infezione da parvovirus evidenzia un picco nei cuccioli dopo lo svezzamento dalle 4 alle 12 settimane di età, quando gli anticorpi materni calano. Tuttavia, l'infezione può riscontrarsi anche in cuccioli maggiori di 6 mesi (Pollock e Coyne, 1993).

Stagione:

Secondo alcuni Autori la manifestazione di questa infezione non dipende dalle stagioni. In uno studio effettuato in Canada, su 283 cani, si è evidenziato che tra luglio e settembre il rischio d'infezione era 3 volte superiore alla norma; mentre novembre, dicembre e gennaio erano i mesi in cui si verificavano meno casi (Houston et al., 1996).

Fattori stressanti:

Lo stress è un importante fattore di rischio che facilita la contrazione di malattie in generale, per l'indebolimento delle difese immunitarie che esso comporta in tutte le specie animali. Motivi di stress negli animali sono: la malnutrizione, scarse condizioni igieniche, temperatura ed umidità inadeguate, ambienti sovraffollati, infezioni intercorrenti, interventi chirurgici (Brunner e Swango, 1995).

Le parassitosi e infezioni intestinali:

La grande maggioranza dei cani affetti da parvovirus presentano dei parassiti intestinali all'esame coprologico delle feci, quali *Ancylostoma caninum*, *Giardia spp.*, *Eimeria spp.*, *Isospora spp.*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter spp.*, *Salmonella spp.*, etc (Ettinger et al., 2001).

I parassiti hanno un ruolo importantissimo nella patogenesi della parvovirus poiché svolgono una azione depauperante e traumatico-irritativa sulla mucosa intestinale. Questa azione favorisce, sia la penetrazione del virus nella mucosa, sia la stimolazione dell'attività mitotica degli enterociti danneggiati indispensabile per la replicazione del virus stesso (Brunner e Swango, 1985).

Razza e genetica:

Sebbene tutte le razze canine sono sensibili al parvovirus, si è visto una particolare suscettibilità nel Rottweiler, e nel Dobermann Pinscher (Brunner e Swango, 1985; Houston et al., 1996; Nemzek et al., 2007). La seguono: il Labrador Retriever soprattutto a mantello nero, American Staffordshire Terrier, Pastore Tedesco, Greyhound, Siberian Husky e Alaskan Malamute (Hall e German, 2005; Glickman et al., 1985; Houston et al., 1996).

Al contrario, le razze che si dimostrano più resistenti sono il Barboncino toy e il Cocker Spaniel (Brunner e Swango, 1985).

4.5 TRASMISSIONE E PATOGENESI DELLA PARVOVIROSI

La fonte principale di infezione del parvovirus sono le feci degli animali infetti, essendo la via orofecale il modo di trasmissione più frequente (Carr-Smith et al., 1997). L'eliminazione del virus attraverso le deiezioni va dal terzo giorno dell'avvenuta infezione fino a 2 o 3 settimane o più dalla scomparsa dei sintomi (Swango, 1989).

Nei primi 2 giorni dell'ingestione, la replicazione virale accade nella orofaringe e nel tessuto linfoide locale (tonsile e linfonodi retrofaringei). Dopo un periodo di incubazione di circa 2 giorni, anche se può essere di più, avviene la diffusione del virus per via linfatica con il coinvolgimento dei centri germinativi, dei linfonodi e della milza. Contemporaneamente compaiono i primi sintomi che sono: anoressia, febbre e leucopenia (Macintire et al., 1997).

La viremia che ne consegue avrà un picco tra il terzo o il quarto giorno, affettando determinando il coinvolgimento di tutte le cellule in mitosi dell'organismo, con particolare tropismo per gli enterociti e le cellule del sistema linfatico, in cui avviene, la replicazione secondaria (Timoney et al., 1995; Marcato, 2002).

Nelle prime settimane di vita dei cuccioli, i miocardiociti, hanno dimostrato un'importante attività proliferativa, pertanto, se l'infezione avviene nel periodo perinatale, la parvovirosi può determinare una grave miocardite che spesso porta a morte improvvisa (Appel e Parrish, 1987, Timoney et al, 1995). La **forma miocardica** della parvovirosi colpisce i cuccioli che vengono a contatto con il virus e non sono stati adeguatamente immunizzati dal colostro della madre. L'incidenza di questa forma è notevolmente diminuita e ormai, di raro rinvenimento, dovuto alla generale immunità della popolazione canina e alla protezione anticorpale materna (Pollock e Coyne, 1993).

La forma enterica colpisce invece, generalmente, i cuccioli di età superiore alle 6

settimane (Pollock e Coyne, 1993). In seguito alla viremia primaria, che accade tra il primo e il terzo giorno post-infezione, il virus si diffonde per via ematica arrivando ai tessuti linfopoietici, come le Placche di Peyer, quindi inizia a colonizzare l'intestino. Il picco massimo della colonizzazione avviene nel digiuno e nell'ileo, fondamentalmente, e in minor misura nel duodeno, tra il quinto e il sesto giorno. Le cellule con più elevata capacità mitotica sono albergate nelle cripte, per cui saranno queste a subire le alterazioni più gravi, provocando la completa distruzione dei villi. Stomaco e colon rimangono esclusi dalla azione del virus (Marcato, 2002).

La regressione delle lesioni intestinali e degli organi linfoidi comincia verso il settimo o il nono giorno dall'esordio della sintomatologia. Dovuto all'elevato *turn-over* delle cellule del epitelio intestinale, la forma enterica evolve rapidamente. Nell'arco di 2 o 3 giorni, l'effetto del virus diminuisce e cominciano i processi rigenerativi, anche nei casi più gravi e letali. Una intensa infiltrazione di cellule infiammatorie avviene nella lamina propria della mucosa intestinale (Pollock e Coyne, 1993).

Gli effetti del CPV-2 sul *midollo osseo*, sebbene transitori sono eclatanti. Determinano una grave necrosi e lisi delle cellule staminali. Nelle forme acute, si rileva una linfocitopenia e neutropenia a partire dal terzo o sesto giorno post-infezione. La conta leucocitaria (con una media che va dai 500 ai 2000 leucociti/ μ l di sangue) riflette, in modo chiaro, la distruzione mieloide e la linfocitolisi (Pollock e Coyne, 1993).

Può rinvenirsi, anche se è molto meno frequente, una deplezione della linea eritroide e megacariocitica (Nelson et al., 2007).

4.6 SINTOMATOLOGIA CLINICA

Il virus CPV-2 si caratterizza per essere in grado di determinare una gastroenterite segmentaria emorragica ed una grave immunodepressione, oppure, più raramente, nei soggetti minori di due settimane possono essere rinvenute le forme miocardiche.

4.6.1 FORMA ENTERICA

Questa forma è decisamente la più frequentemente riscontrata nella pratica clinica. I segni clinici iniziali associati all'enterite da CPV-2 sono aspecifici e includono anoressia, depressione e febbre (Macintire et al., 1997).

Il rialzo termico può arrivare fino a 40-41°C, tuttavia, non è un reperto costante e può non presentarsi nei soggetti adulti (Timoney et al., 1995).

La maggior parte dei cuccioli iniziano a vomitare e sviluppano una diarrea del piccolo intestino entro 24-48 ore dall'inizio della sintomatologia (Macintire et al., 1997). La diarrea è conseguente alla perdita dell'integrità della mucosa intestinale dovuta alla infiammazione acuta che si instaura successivamente alla replicazione del virus. Questa alterazione determina un grave malassorbimento che esita in una diarrea che va da mucoide, a fluida, grigiastra o con striature di sangue a completamente emorragica (Timoney et al., 1995; Lamm e Rezabek, 2008).

L'enorme quantità di liquidi e di proteine che vengono perse attraverso il tratto gastrointestinale può risultare in una grave disidratazione o shock ipovolemico. I segni classici associati alla ipoperfusione tissutale sono: alterazione del sensorio, aumento del tempo di riempimento capillare, tachicardia, polso flebile, ipotensione, estremità fredde e abbassamento della temperatura rettale (Prittie, 2004).

La manifestazione clinica della malattia è più grave in cuccioli con una immunità umorale compromessa secondariamente a:

- un'infezione concomitante (es. Parassitosi intestinali)
- un basso titolo anticorpale nel colostro materno
- un ambiente stressante (Prittie, 2004).

Il dolore addominale secondario alla gastroenterite acuta o all'eventuale intussuscezione dovuta alla alterata motilità può essere evidente già all'esame clinico. Spesso, siamo di fronte a tratti di intestino in cui la motilità è molto accentuata, in altri diminuita fino a condizioni estreme caratterizzate da ileo paralitico. L'invaginamento intestinale è una

complicazione frequente soprattutto nei soggetti non adeguatamente idratati. L'intususcezione può essere rinvenuta grazie ad una accurata palpazione delle anse, oppure, mediante l'utilizzo di esami di diagnostica per immagini, come l'ecografia, e richiede un'immediato intervento chirurgico.

Da un punto di vista laboratoristico, oltre alla grave linfopenia (Pollock e Coyne, 1993), alterazioni biochimiche che si potranno evidenziare in corso di parvovirosi includono: una iperazotemia prerenale ed un aumento delle transaminasi dovuto alla grave disidratazione e all'ipoperfusione tissutale; un'ipoalbuminemia accompagnata o meno da panipoprotidemia, secondaria alla stessa flogosi e all'enterite proteino-disperdente; ipopotassiemia e squilibri acido-base per le perdite gastrointestinali e per l'inadeguato apporto e condizioni di ipoglicemia associate ad una grave malnutrizione e/o ad un fenomeno settico sottostante (Prittie, 2004).

Quando la leucopenia è molto grave, il tasso di mortalità dei pazienti colpiti aumenta considerabilmente. Questa condizione si attribuisce alla conseguente maggiore suscettibilità alle sovrainfezioni secondarie batteriche, che possono determinare un quadro di setticemia (Goddard et al., 2008).

In queste forme che decorrono con sintomi di vomito e diarrea gravi, solo un intervento terapeutico rapido ed aggressivo insieme ad un monitoraggio intensivo, possono salvare il paziente. L'istituzione di un supporto terapeutico aggressivo può portare a tassi di sopravvivenza che vanno dal 65 al 95% (Otto et al., 1997).

4.7 MANIFESTAZIONI SISTEMICHE DELLA PARVOVIROSI

Frequentemente i segni clinici della parvovirosi, rappresentati, prevalentemente dalla grave gastroenterite e dall'immunosoppressione, si accompagnano ad una manifestazione clinica, legata ad una risposta infiammatoria sistemica.

La sindrome di risposta infiammatoria sistemica viene scatenata dalla traslocazione batterica che si verifica a livello intestinale, in seguito alla perdita dell'integrità

dell'epitelio della mucosa dovuta all'azione del virus.

Gli effetti diretti del virus, cioè la distruzione della barriera intestinale ed indiretti, la traslocazione batterica secondaria e l'immunodepressione, possono provocare una setticemia da coliformi, come la *Escherichia coli* β -emolitica, lo sviluppo di una SIRS e la morte. Sovrainfezioni batteriche secondarie da *Salmonella*, *Clostridium* e *Campylobacter spp.*, sono state riportate in corso di parvovirus come direttamente responsabili di una setticemia e/o endotossiemia (Sandstedt et al., 1981; Turk et al., 1992; Lamm e Rezabeck, 2008).

Escherichia coli è stato isolato da polmoni e fegato della maggior parte di cuccioli morti in seguito a grave infezione da parvovirus CPV-2 e reperti anatomopatologici compatibili con la sindrome da stress respiratorio acuto (*Acute Respiratory Distress Syndrome*, ARDS) sono stati rinvenuti negli stessi soggetti (Turk et al, 1990).

In corso di parvovirosi, sarà la traslocazione intestinale di endotossine di batteri Gram negativi a determinare il possibile sviluppo di una ARDS, di una SIRS o di una sepsi; piuttosto che la batteriemia (Otto et al., 1997; Weiss et al., 1998; Gando et al., 1998).

Uno studio ha evidenziato la presenza di endotossina in circolo in più dell'80% dei cani affetta da parvovirosi. Si è riscontrata, inoltre, attività riferita al TNF durante il ricovero nel 33% dei questi soggetti e, in aggiunta, è stata rinvenuta una significativa associazione tra l'aumento dell'attività del TNF e il tasso di mortalità di questa popolazione (Otto et al., 1997).

Uno stato di ipercoagulabilità è stato dimostrato in cani affetti da CPV-2 (Otto et al., 2000). Questi soggetti possono sviluppare trombosi o flebiti catetere-associate. I fattori che contribuiscono a questo stato sono:

- l'effetto procoagulante indiretto dell'endotossine attraverso la stimolazione delle citochine pro-infiammatorie sulle cellule endoteliali,
- la perdita di anticoagulanti naturali come la antitrombina (AT) legata all'albumina attraverso il tratto gastroenterico,

- il consumo dell'AT come risultato dell'attivazione della coagulazione mediante l'azione dell'endotossine
- l'iperfibrinogenemia (Otto et al., 2001).

4.8 DIAGNOSI

Se alla visita clinica arriva un cane giovane con sintomi riferiti ad una gastroenterite acuta, ipertermico e con un eventuale protocollo vaccinale incompleto o dubbio, dobbiamo subito considerare la parvovirosi tra le possibili diagnosi differenziali.

Se mediante un esame emocromocitometrico rileviamo, inoltre, una immunodepressione, saremo ulteriormente indirizzati verso questa patologia, nonostante la leucopenia al momento della visita sia presente circa nella metà dei cani infetti (Kramer et al., 1980).

La diagnosi definitiva richiede l'isolamento del virus o, eventualmente degli antigeni virali nelle feci del paziente. Esistono diversi metodi diagnostici, usati routinariamente sulle feci di animali con diarrea quali l'*enzyme-linked immunoassorbent assay* o ELISA, l'immunocromatografia (IC), il test dell'emagglutinazione (HA), sebbene queste tecniche hanno una sensibilità relativamente bassa (Mochizuki et al., 1993; Uwatoko et al., 1995; Esfandiari e Klingeborn, 2000). Risultati falsi-positivi possono riscontrarsi dal 3° al 10° giorno dopo aver eseguito la vaccinazione con il virus vivo attenuato (Pollock e Carmichael, 1983). Falsi-negativi possono rilevarsi secondariamente alla sieroneutralizzazione tra antigene-anticorpo nelle feci o all'arresto dell'eliminazione del virus 10 o 12 giorni dopo l'infezione (Pollock e Coyne, 1993; Macintire e Smith-Carr, 1997).

Comunque, il test IC è il più comunemente utilizzato nella pratica clinica per la sua metodica semplice e rapida e la sua facile acquisizione (Esfandiari e Klingeborn, 2000). L'isolamento del virus (VI) è più sensibile ma richiede molto tempo (circa 10 giorni) ed è ed una tecnica molto laboriosa (Mochizuki et al., 1993). D'altra parte, metodi basati

sul rilevamento dell'acido desossiribonucleico (DNA) del virus con *Polymerase Chain Reaction* (PCR) si sono dimostrati altamente sensibili (Mochizuki et al., 1993; Hirasawa et al., 1994; Truyen et al., 1994; Schunck et al., 1995; Senda et al., 1995; Uwatoko et al., 1995; Tempesta et al., 1998; Pereira et al., 2000; Buonavoglia et al., 2001). Recentemente, una *Real-Time PCR* è stata sviluppata per il rilevamento e la quantificazione del DNA CPV-2 in feci di cani con diarrea. Questo innovativo metodo basato sulla TaqMan *technology*, si è dimostrato ancora più specifico, sensibile e facilmente riproducibile; inoltre, impiegando molto meno tempo rispetto alla convenzionale PCR *gel-based* (Decaro et al., 2005a).

Sono anche disponibili test sierologici per documentare l'infezione da parvovirus. Tipicamente, gli anticorpi per il CPV cominciano ad essere rilevabili quando compaiono i segni clinici, il titolo aumenta velocemente e rimane alto per diversi anni. Tuttavia, il 25-90% dei cani sani non vaccinati possono essere sieropositivi in seguito ad un'infezione precedente, spesso subclinica (Kramer et al., 1980; Helfer et al., 1980), motivo per cui la sola positività al questo test non è indice d'infezione in atto.

Sierodiagnosi di parvovirosi in corso, richiede il rilevamento di anticorpi anti-CPV di origine recente, dunque le classiche immunoglobuline M (IgM), alla luce di una sintomatologia clinica tipica. La mancanza di anti-anticorpi per CPV in un cucciolo affetto da una gastroenterite acuta è, spesso, sufficiente per scartare il parvovirus come possibile causa (Prittie, 2004). Un'altro metodo diagnostico di più ampio utilizzo è il rilevamento degli antigeni fecali, poiché, richiede meno strumenti e risulta molto più economico della serologia (Prittie, 2004).

4.9 TRATTAMENTO

Il trattamento in soggetti affetti da parvovirosi consiste in una terapia di supporto più o meno aggressiva a seconda della sintomatologia (Kariuki et al., 1990; Prittie, 2004). La sopravvivenza nei cani sottoposti a terapia va dal 67% (Otto et al, 2001) al 75% (Mann et al., 1998) dipendendo degli Autori. Invece, la mortalità in codesto tipo di popolazione

lasciata senza alcuna terapia può arrivare fino al 91% (Kariuki et al., 1990).

4.9.1 FLUIDOTERAPIA: RIANIMAZIONE E MANTENIMENTO

Abitualmente, i soggetti che presentano vomito e diarrea vanno incontro ad una grave disidratazione fino arrivare, delle volte, allo shock ipovolemico. Una fluidoterapia endovenosa aggressiva, mirata a ripristinare i deficit idrici ed elettrolitici, diventa assolutamente necessaria. Nel caso di pazienti in shock ipovolemico, i deficit verranno rimpiazzati velocemente per ristabilire un'adeguata perfusione tissutale (McCaw e Hoskins, 2006, Prittie, 2004).

Una volta ristabilita la perfusione, la fluidoterapia di rimpiazzo e mantenimento si adegnerà alle ulteriori perdite continue, principalmente dal tratto gastroenterico, con delle soluzioni correttive in base allo stato acido-base e ai deficit elettrolitici del paziente. L'ipopotassiemia è un reperto costante in questi pazienti anoressici e con gravi perdite gastrointestinali. L'integrazione delle soluzioni bilanciate con potassio cloruro è fondamentale nel prevenire lo sviluppo degli effetti secondari, quali debolezza muscolare fino alla paralisi, ileo paralitico, aritmie cardiache e poliuria (Prittie, 2004).

Un'altro reperto frequente nei cuccioli è la tendenza all'ipoglicemia (secondaria ad una profonda malnutrizione, scarse riserve energetiche, metabolismo gluconeogenico e glicogenolitico immaturi, ed eventuali stati setticemici) che verrà eventualmente trattata tramite l'aggiunta alla soluzione elettrolitica bilanciata di un'integrazione di destrosio al 2,5 o 5% (Prittie, 2004).

Sarà il clinico a determinare l'eventuale necessità dell'utilizzo di colloidali, se le concentrazioni ematiche di albumine e di proteine totali sono molto basse (inferiore a 2 g/dl o a 4 g/dl rispettivamente), o se si evidenziano perdite fluide nel "terzo spazio" (sviluppo di edemi congiuntivale o periferici nelle parti declivi, ascite o versamento pleurico) dopo un esame fisico del paziente.

Durante la rianimazione dei pazienti molto ipotensi, si possono somministrare dei boli

endovenosi da 5 ml/kg di soluzioni colloidali fino ad effetto. La velocità di mantenimento dei colloide, invece, non dovrà superare i 20 ml/kg/die e la pressione colloidosmotica (COP) verrà valutata quotidianamente. La velocità d'infusione dei cristalloidi, infine, si ridurrà di un 40-60% se si utilizzano contemporaneamente dei colloidi (Prittie, 2004).

In letteratura veterinaria, non ci sono molti studi sui benefici dell'utilizzo di trasfusioni con emoderivati in pazienti affetti da parvovirosi. Una trasfusione di plasma può essere consigliata in quanto provvede al reintegro di una quota di albumine, immunoglobuline ed altri fattori che possono contribuire a neutralizzare i virus circolanti diminuendo la risposta infiammatoria sistemica (Macintire e Smith-Carr, 1997).

Nei casi più gravi d'ipoalbuminemia, un recente studio veterinario, consiglia la trasfusione di plasma per incrementare la albuminemia fino a 2-2,5 g/dl; invece, preferisce l'utilizzo di colloidi sintetici non proteici per il mantenimento della COP tra 13- 20 mmHg (Mazzaferro et al., 2002). Ad ogni modo, bisogna valutare ogni caso singolarmente, poiché per incrementare l'albumina plasmatica di 0,5g/dl è necessario un enorme volume di plasma (22,5 ml ogni kg di peso vivo) (Prittie, 2004).

4.9.2 ANTIBIOTICOTERAPIA

In soggetti affetti da parvovirosi, la distruzione della barriera intestinale e delle cellule progenitrici ematopoietiche del midollo osseo con panleucopenia secondaria, incrementano notevolmente la suscettibilità alla traslocazione batterica, all'endotossiemia e alla sepsi (Pollock e Coyne, 1993).

La grave leucopenia porta ad un stato di immunodepressione che predispone allo sviluppo di infezioni batteriche secondarie. Le sovrainfezioni hanno un importante ruolo sull'elevato tasso di mortalità nella parvovirosi e sono determinate, dalla sovracrescita della flora batterica intestinale e dall'invasione di altri microrganismi (Lamm e Rezabek, 2008). Anche se in base a questi due fattori un trattamento antibiotico risulta scontato, l'utilizzo degli antibiotici in questa patologia virale è ancora molto

controverso. Da una parte, la antibioticoterapia può favorire la sovracrescita batterica del *Clostridium perfringens*, esitando in una diarrea emorragica (Turk et al., 1992). Dall'altra, gli antibiotici possono incrementare il rilascio di endotossine aggravando l'imminente risposta infiammatoria sistemica (Otto et al., 1997). Per cercare di evitare o diminuire queste eventualità è indicato l'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro e con attività battericida (Prittie, 2004).

La scelta del tipo di antibiotico è mirata a combattere la traslocazione batterica, per cui, fondamentalmente microorganismi Gram negativi ed anaerobi (i più frequenti sono *Escherichia coli* e il *Clostridium perfringens*). In seguito alla depressione immunitaria, le forme più frequenti di infezioni respiratorie e cutanee sono date da batteri Gram positivi (Tsukada et al., 1993; Turk et al., 1992).

La somministrazione degli antibiotici per via endovenosa è fortemente consigliata, a causa del malassorbimento intestinale per il danno diretto del virus e all'alterazione secondaria della microflora (Prittie, 2004).

Antibiotici come i β -lattamici (ampicillina 22mg/kg IV TID, ampicillina/sulbactam 20mg/kg IV TID) o la cefoxitina (15mg/kg IV TID) associati ad aminoglicosidi (gentamicina 6 mg/kg IV SID, una volta che il paziente sia stato reidratato), oppure a cefalosporine di terza generazione (ceftazidime 30 mg/kg IV TID), sono ampiamente usati con ottimi risultati nei cani infetti da parvovirus (McCaw e Hoskins, 2006; Lamm e Rezabek, 2008; Otto et al, 1997; Prittie, 2004).

La maggior parte dei pazienti affetti da CPV-2 sono cuccioli o cani di giovane età, nei quali i chinoloni, pur avendo uno spettro di azione antimicrobica adeguato, non si ritengono antibiotici di prima scelta, in quanto possono essere associati ad alterazioni nello sviluppo della cartilagine articolare in soggetti in accrescimento (Prittie, 2004).

4.9.3 ANTIEMETICI

Gli antiemetici possono essere di grande utilità nei casi di vomito acuto incoercibile,

riducendo la perdita di liquidi, diminuendo il malessere del paziente e favorendo l'impiego della nutrizione enterale (McCaw e Hoskins, 2006). L'antiemetico ideale in corso di parvovirosi dovrebbe bloccare il vomito senza interferire sulla motilità intestinale già particolarmente compromessa in questi pazienti a grave rischio di invaginamento. Il disturbo della motilità in questi soggetti è dovuto alla gravissima enterite in cui coesistono zone in ileo paralitico con zone iperperistaltiche (Hall e German, 2005).

La maggior parte di questi farmaci agisce bloccando i chemorecettori della *trigger zone* e il centro del vomito a livello centrale, ma purtroppo, spesso interferiscono sulla motilità gastrointestinale, motivo per cui, devono essere usati con cautela, affinché non siano più un rischio che un beneficio. La Metoclopramide, un antagonista dopaminergico che coordina la motilità del tratto superiore del intestino (0,2-0,4 mg/kg IM o SC TID, oppure CRI a 1-2 mg/kg/die), e la Clorpromazina, un derivato delle fenotiazine (0,5 mg/kg IM o SC ogni 6 ore), sono entrambi ampiamente utilizzati in corso di parvovirosi. Gli antiemetici più efficaci sono gli antagonisti dei recettori della serotonina, come l'Ondansetron HCL e il Dolastron (McCaw e Hoskins, 2006; Prittie, 2004).

Il maropitant (Cerenia™) è un antiemetico relativamente nuovo, selettivo e ad ampio spettro. Si tratta di un antagonista altamente specifico per i recettori neurokinina-1, che agisce bloccando il vomito a livello centrale e periferico (Gardner et al., 1995; Diemunsch et al., 1999). Questo potente antiemetico, contraindicato solo in cani con ostruzione intestinale o intossicazione gastroenterica, è stato provato in diversi studi dimostrando sicurezza ed efficacia (Sedlacek et al., 2008). In uno studio eseguito su 278 cani con vomito acuto di eziologia diversa, si è somministrato il Cerenia™ ad un dosaggio di 1mg/kg di peso una volta al giorno per un massimo di 4 giorni. Si è dimostrato utile nella prevenzione e nella terapia del vomito acuto riducendo significativamente la percentuale degli episodi di emesi in questa popolazione. Dato che, tutti i segni clinici ossevati post-terapia sono stati attribuiti alla patologia in corso, si è confermato come un antiemetico efficace e sicuro (Ramsey et al., 2008). Il

maropitant sembrerebbe di ottima elezione in soggetti affetti da parvovirosi non influenzando la motilità gastrointestinale, nonostante, ancora non ci siano studi a riguardo.

4.9.4 IMMUNOTERAPIA

Gli interferoni sono potenti immunomodulatori grazie alle loro attività antivirali ed antitumorali. Non esistono ancora molti studi, tuttavia alcuni Autori sembrano aver trovato effetti positivi con l'utilizzo dell' interferon ω ricombinate felino (rFeIFN- ω) su pazienti affetti sperimentalmente da parvovirus. In due studi condotti su un modello sperimentale di parvovirosis in cui si somministra rFeIFN- ω (1-2,5 MU/kg/die, per via endovenosa) per 3 giorni consecutivi, dopo l'inoculazione del virus CPV-2; hanno avuto come risultato la riduzione della gravità dei sintomi gastroenterici, inoltre, la diminuzione della morbilità e della mortalità (Ishiwata et al., 1998; Martin et al., 2002).

Più recentemente, in un'altro studio, in cui si somministra per 3 giorni consecutivi rFeIFN- ω in cani affetti da parvovirosi spontanea, è stata dimostrata una netta riduzione della mortalità, senza nessun effetto secondario (de Mari et al., 2003).

4.9.5 NUTRIZIONE

I soggetti parvovirofici sono tendenzialmente anoressici per diversi giorni; inoltre, presentano frequenti episodi di vomito accompagnati da una enterite proteino-disperdente. L'alimentazione per bocca viene sospesa finchè l'emesi non è cessata da almeno 12 ore, questo periodo va dai 3 ai 5 giorni (Hall e German, 2005). In aggiunta, sono spesso, popolazioni di giovane età con scarse riserve energetiche e sistemi metabolici ancora immaturi (Prittie, 2004). Questi eventi possono portare a fenomeni d'ipoglicemia, gravi ipoalbuminemie o panipoprotidemie con conseguenze fatali: dallo sviluppo di intolleranze alimentare, alla disfunzione d'organo, coma ipoglicemico e morte (Mazzaferro et al., 2002).

La fluidoterapia di supporto con cristalloidi, supplementati con destrosio e soluzione colloidali non proteiche, non costituiscono un supporto nutrizionale. La nutrizione enterale contribuisce al mantenimento della integrità della mucosa intestinale e a ridurre il rischio di traslocazione batterica. Se passati diversi giorni dall'inizio della sintomatologia, l'anoressia persiste, si può procedere con una alimentazione forzata impiegando siringhe, posizionando sondini nasoesofagei o nasogastrici, o chirurgicamente, introducendo un *feeding tube* in esofago, stomaco o duodeno (Prittie, 2004).

La somministrazione di piccole quantità di soluzioni contenenti glutamina sembra avere un effetto positivo sulla mucosa intestinale e sulla riduzione della traslocazione batterica (Timoney et al., 1985).

Per i soggetti con vomito incoercibile o grave malassorbimento, la nutrizione parenterale totale o parziale (PPN) può essere una soluzione da effettuarsi attraverso un catetere centrale posizionato in condizioni completamente sterili (Macintire e Carr-Smith, 1997).

4.10 FATTORI PROGNOSTICI

Il parvovirus non colpisce tutti i cani nello stesso modo; le distinte varianti hanno effetti diversi in base all'età, l'immunità, la razza, la ruta di esposizione, la carica virale e la virulenza della variante (Sherding, 1989).

Ceppo infettante - Quando l'agente infettivo si tratta della variante CVP-2a o 2b, la sintomatologia clinica spesso è più grave e duratura, determinando un fattore prognostico negativo (Decaro et al., 2005).

Leucopenia - La gravità della leucopenia è associata ad un alto tasso di mortalità (Hall e German, 2005; Pollock e Coyne, 1993). L'elevata mortalità in cani con grave leucopenia può essere attribuita all'elevata suscettibilità a infezioni batteriche secondarie che possono portare a setticemie (Prittie, 2004). Gli Autori di un recente

studio eseguito su 62 cani affetti da parvovirosi, ritengono che si può ottenere una accurata prognosi valutando i cambiamenti della conta totale leucocitaria (dei leucociti banda, dei linfociti, monociti e eosinofili) alle 24 ore dall'ammissione (Goddard et al., 2008).

Età e condizioni nutrizionale - Più giovane è il soggetto colpito, più immaturo è il suo sistema immunitario e più percentuale di cellule in mitosi avrà nel suo organismo, condizione che favorirà la replicazione virale (Prittie, 2004, Lamm e Rezabek, 2008).

La concomitanza di altre condizioni patologiche sottostanti, come ad esempio le parassitosi, indeboliscono il soggetto fino al depauperamento (Prittie, 2004).

4.11 PREVENZIONE

Il carattere ubiquitario del virus e la sua resistenza estrema all'ambiente per lunghi periodi di tempo, rende la prevenzione l'arma più potente per combatterlo. Per una profilassi diretta sono necessarie corrette pratiche igieniche che assicurino la completa disinfezione di tutte le superfici contaminate mediante prodotti chimici in grado di inattivarlo.

Più importante ancora è la profilassi indiretta o attiva, assicurando una forte immunità individuale ai cani tramite effettivi protocolli vaccinali. La vaccinazione contro il parvovirus è fortemente raccomandata (Lamm e Rezabek, 2008).

Il titolo di anticorpi anti-CPV circolanti in un soggetto sono correlati all'immunità. Cani sieronegativi sono suscettibili alla malattia; cani con basso titolo anticorpale tipicamente, non si ammalano clinicamente, ma possono eliminare il virus con le deiezioni. Al contrario, individui con elevato titolo anticorpale, non svilupperanno l'infezione e nemmeno elimineranno il virus (Pollock e Coyne, 1993; Pollock e Carmichael, 1993) La suscettibilità all'infezione da CPV in cuccioli con una adeguata trasferimento anticorpale materno inizia 2-3 settimane dopo lo svezzamento.

Perché l'immunizzazione sia adeguata, la prima vaccinazione nei cuccioli deve

effettuarsi quando il titolo anticorpale materno circolante sia sufficientemente basso da consentire una corretta risposta immunitaria. Oggigiorno, la maggior parte dei vaccini moderni riescono a superare questo titolo, tuttavia, conviene sempre rispettare questo periodo, non vaccinando prima dalle 6-8 settimane di vita (Lamm e Rezabek, 2008).

I vaccini da CPV-2 vivo attenuato sono i più frequentemente utilizzati nella pratica clinica, vengono somministrati a partire dalle 6-8 settimane di vita. Per aumentare l'effettività del vaccino, si eseguiranno successive somministrazioni ogni 15-30 giorni fino alle 18 settimane di vita. Un richiamo vaccinale sarà somministrato un anno dopo e quindi ogni 1-3 anni (Sherding 1989; Schultz, 2006).

In comunità ad elevato rischio, come canili o allevamenti, è indicato l'utilizzo di vaccini inattivati nei cuccioli di età inferiore alle 5 settimane e nelle cagne gravide, sebbene forniscano una immunità più breve (Hall e German, 2005).

4.12 IMMUNITÀ

4.12.1 IMMUNITÀ NATURALE

4.12.1.1 Immunità passiva naturale

I neonati di madri protette dal CPV, sono anch'essi protetti durante le prime settimane di vita (Pollock e Coyne, 1993; Decaro et al., 2005). Nei cani, la trasmissione degli anticorpi materni avviene, prima con il trasferimento placentario delle IgG, poi mediante il colostro in forma di IgA, quasi il 90%, e quindi con il latte (Larson et al., 1996). Le IgA necessarie per proteggere il tratto gastrointestinale vengono fornite inizialmente con il colostro materno e successivamente con il latte (Ponti, 2005).

L'immunità passiva dei neonati, acquisita dalla madre, inibisce la risposta immunitaria attiva e può prevenire il successo delle vaccinazioni se effettuate troppo precocemente (Ponti, 2005). Questo periodo refrattario, in cui gli anticorpi materni circolanti nei

cuccioli hanno già cominciato a diminuire rendendoli recettivi all'infezioni, può durare circa 10 settimane dalla nascita e bisogna rispettarlo poiché è in grado di interferire con il vaccino (Larson et al., 1996).

L'interferenza degli anticorpi materni con l'immunizzazione attiva nei cuccioli è stata, in parte, superata mediante l'utilizzo di vaccini ad alto titolo virale (Hoare et al., 1997) o mediante l'impiego di vaccini intranasali in grado di stimolare la risposta immunitaria in soggetti con titolo anticorpale ancora alto (Martella et al., 2005).

4.12.1.2 Immunità naturale attiva

La risposta immunitaria successiva all'infezione naturale da Parvovirus canino è molto rapida ad instaurarsi, e sembra di essere duratura nel tempo, presumibilmente per tutta la vita del soggetto (Pollock e Carmichael, 1990).

Una volta che la malattia è stata superata, diversi studi hanno dimostrato che il titolo anticorpale rimane elevato per poi ridursi non prima di un periodo superiore ai due anni (Appel e Parrish, 1987).

Le IgM sono i primi anticorpi che compaiono dopo 3 o 4 giorni dal contatto con CPV-2. Raggiungono massimi livelli circolanti intorno al 6° o 10° giorno per quindi ridursi fino a scomparire dopo circa 70 giorni. Le IgG le ritroviamo pochi giorni dopo la comparsa delle IgM, la loro concentrazione aumenta man mano che passano i giorni fino a raggiungere livelli elevati dopo 40 giorni, per poi diminuire progressivamente nei 18 mesi successivi (Iovane et al., 1985). Per quanto riguarda al ruolo delle IgA intestinali in corso d'infezione da CPV-2, sembra che facilitino l'eliminazione del virus dall'organismo, ma non sembrano coinvolte nell'immunità duratura, poiché i titoli anticorpali nelle feci non sono più rilevabili 15 giorni dopo l'infezione (Pollock e Carmichael, 1990).

I cani che guariscono dall'infezione naturale, sia essa clinica o subclinica, risultano solidamente protetti nei confronti delle forme cliniche di CPV (Timoney et al., 1995).

4.12.2 IMMUNITÀ ARTIFICIALE

4.12.2.1 Immunità attiva artificiale

Il vaccino induce nell'ospite una reazione immunitaria specifica, di tipo prevalentemente umorale o cellulo-mediato (a seconda delle caratteristiche del vaccino e della via di somministrazione) che lo proteggerà in futuro, dall'aggressione del patogeno verso cui è stato vaccinato. Poiché la vaccinazione stimola attivamente il sistema immunitario è necessario un certo periodo di tempo perché la risposta effettrice, evocata dallo stimolo antigenico, raggiunga, attraverso le diverse fasi immunologiche, una concentrazione di anticorpi e/o linfociti citotossici specifici da rendere immune il soggetto, anche se sarà esposto a cariche infettanti elevate del patogeno in questione (Poli, 2005).

Attualmente, il vaccino utilizzato comunemente nella profilassi della parvoviroosi canina è un vaccino vivo attenuato, l'originario CPV-2. Secondo alcuni Autori, l'evoluzione antigenica di quest'ultimo, non ha compromesso la capacità immunogena del vaccino anche nei confronti delle varianti che ci sono adesso in circolazione. Tuttavia, è stato dimostrato che cuccioli vaccinati con il ceppo originale (CPV), sviluppano un alto grado di immunità solo nei suoi confronti e titoli anticorpali molto minori nei confronti della variante CPV-2b (Pratelli et al., 2001). Dovuto a questo reperto, si è iniziato a commercializzare un vaccino allestito con la variante CPV-2b, che ha mostrato una elevata capacità immunogena non solo per lo stipe omologo, ma anche nei confronti di CPV-2a e CPV-2c (Cavalli et al., 2006).

Un anno dopo, questi Autori hanno dimostrato come la risposta anticorpale contro CPV-2c era minore rispetto ai livelli di anticorpi rilevati in risposta a le altre varianti, ipotizzando che questa variante 2c possa contribuire, in questo modo, alla diffusione stessa del virus (Cavalli et al., 2008).

4.13 LA PARVOVIROSI COME MODELLO ANIMALE DI SEPSI

La sepsi è uno stato di alterata omeostasi infiammatoria che spesso inizia con una infezione, ed è condizionato da molteplici fattori. Lo sviluppo e la progressione della sepsi implica il coinvolgimento di diversi sistemi dell'organismo, quali il sistema cardiovascolare, il sistema immunitario ed l'endocrino. La complessità e variabilità di tale sindrome rende difficile lo studio clinico della fisiopatologia nell'uomo, così come la determinazione di possibili strategie terapeutiche efficaci (Buras et al., 2005).

Per questi motivi, sono stati sviluppati diversi modelli animali di sepsi con lo scopo di fornire un sistema riproducibile e standardizzato per lo studio della patogenesi della sepsi e delle possibili interventi terapeutici da adottare.

Il modello animale ideale per lo studio della sindrome settica deve essere in grado di mimare i meccanismi patogenetici e le risposte che accadono nell'uomo. Lo sviluppo della *sepsis* si basa in due fasi: la prima caratterizzata da uno stato iperdinamico in cui si ha una riduzione della resistenza vascolare periferica e un aumento della gittata cardiaca, accompagnati da uno stato ipermetabolico segnato da iperglicemia dovuta all'incremento della gluconeogenesi e all'iperinsulinemia. Se la sepsi progredisce, si evolve in una fase ipodinamica in cui la riduzione della resistenza vascolare è accompagnata da una riduzione dell'*output* cardiaco e da uno stato ipoglicemico (shock settico) (Brady e Otto., 2001; Buras et a., 2005).

Si sono sviluppati tre modelli animali di *sepsis* divisi in tre categorie a seconda del meccanismo induttore:

- somministrazione esogena di una tossina (LPS)
- somministrazione esogena di un patogeno (batteri)
- alterazione di barriere endogene con conseguente traslocazione batterica

La parvovirosi può servire come modello canino di *sepsi* ad insorgenza spontanea. Questa patologia anche se di eziologia virale, è caratterizzata da un meccanismo

patogenetico in cui l'azione distruttiva del virus sulla mucosa intestinale esita in una probabile traslocazione batterica con conseguenti stati setticemici ed endotossiemici, frequentemente da coliformi (Turk et al., 1990). Le alterazioni che ne derivano sono del tutto simili a quelle riscontrate nell'uomo, quali coagulopatie, disfunzione d'organo multipla, sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e infine morte (Brady e Otto., 2001; Otto, 2007).

Questa promettente premessa è basata in diversi studi clinici che hanno caratterizzato molte delle risposte fisio-patologiche che decorrono in questa patologia:

-Il ritrovamento di E.coli in fegato e polmoni del 90% dei cani morti da parvovirosi, fu la prima evidenza della batteremia associata a CPV-2 (Turk et al., 1990). Isogai e collaboratori hanno evidenziato un aumento del livello di endotossina nel sangue di cani infetti da parvovirus naturale o sperimentalmente (Isogai et al., 1989).

-Il livello di LPS risultava significativamente più elevato in 40 cani con parvovirosi rispetto a cuccioli sani o cani infettati da CPV-2, un mese dopo la guarigione (Otto et al., 2001).

Inoltre, in uno studio su cani infetti da CPV-2, il TNF risultò elevato in 7 dei 17 cani. I livelli più elevati di TNF erano associati ad un maggior tasso di mortalità (Otto et al., 1997).

La prima fase della sepsi, caratterizzata da uno stato di ipercoagulabilità, è stata confermata da uno studio condotto su 9 cani con parvovirus, dove il 100% presentavano alterazioni tromboelastografiche, iperfibrinogenemia, aumento del tempo della tromboplastina parziale attivata e riduzione dei livelli di antitrombina (Otto et al., 2000).

Un altro vantaggio di questo modello di sepsi è la semplicità del protocollo diagnostico, basato su una sintomatologia clinica molto evidente che può essere confermata con il rilevamento del virus tramite PCR (Mochizuki et al., 1993).

Possibili limiti nella scelta della parvovirosi come modello di sepsi potrebbero essere: l'elevato tasso di sopravvivenza della popolazione se sottoposta ad una terapia adeguata, l'impossibilità di eseguire tutti i prelievi ematici sufficienti date le contenute dimensioni di questi pazienti (Otto, 2007).

Sarebbe molto utile la creazione di un sistema di stadiazione validato, basato magari su questa patologia, che permetta di definire la gravità del processo in atto e di individuare popolazioni di studio omogenee.

Trial clinici sviluppati su questa popolazione di cani con parvovirus potrebbero, (a differenza di altri modelli di sepsi più difficilmente standardizzabili e riproducibili come la peritonite (Hubbard et al., 2005; Deitch, 2005) o la pneumonia) essere quindi, di ottimo aiuto per l'ulteriore conoscenza della sindrome settica conseguente all'alterazione primaria della barriera intestinale e ai successivi fenomeni ischemici e per la scoperta di nuove terapie (Otto, 2007).

4.14 IL SISTEMA PIRO NELLA PARVOVIROSI CANINA

Il primo tentativo in Medicina Veterinaria per generare un consenso sulla sepsi è stato organizzato dall'*American College of Veterinary Emergency & Critical Care* (ACVECC) insieme alla *Society of Critical Care Medicine* (SCCM) sotto forma di corso per post-laureati; ebbe luogo a San Francisco nel 2006.

L'incidenza stimata di sepsi nel gatto è del 1-5%, mentre nei cani va dal 6-10%, con una sopravvivenza del 10-25% e del 25-50% rispettivamente nei gatti e nei cani (Otto., 2007).

Il nuovo approccio già usato in Medicina Umana (Levi et al, 2001) per la stadiazione della gravità della sepsi in Veterinaria, sarebbe il sistema PIRO (Otto, 2007). Applicando il sistema PIRO alla parvovirosi otteniamo le seguenti informazioni:

Predisposizione:

È riconosciuto che certi individui possono sperimentare risposte più gravi e con peggiori *outcome* rispetto alla media della popolazione, di fronte ad un insulto simile. Nel 2007 Nemzek e collaboratori, evidenziarono una particolare predisposizione alla parvovirosi nelle razze: Rottweilers e Dobermann pinscher (Nemzek et al., 2007). Questo studio evidenzia che queste razze hanno una risposta infiammatoria molto più

imponente rispetto ad altre razze.

Infezione:

Il tipo e localizzazione dell'infezione ha un ruolo fondamentale nella determinazione della prognosi. In corso di parvovirosi, l'azione del virus sulla mucosa intestinale determina una distruzione della barriera con la conseguente traslocazione batterica. I batteri che compongono la microflora intestinale (*E.coli*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter spp.*, *Clostridium spp.*, *Yersinia spp.*) sono soprattutto anaerobi e Gram negativi; essendo i più frequenti l'*E.coli* e il *Clostridium perfringens*. Per cui, anche se potremmo essere di fronte a batteremie da batteri Gram positivi come negativi, sembra che la setticemia da coliformi sia comunque la più frequente (Turk et al., 1990).

Isogai e collaboratori hanno rilevato un percentuale dominante di *E.coli* rispetto ad altri batteri, nelle feci da cani affetti da parvovirosi. Il livello di endotossina plasmatica nei cani infetti era di 46,5 pg/ml e si manteneva elevato per lunghi periodi dai 10 ai 30 giorni, mentre nei cani sani era di 2,3 pg/ml (Isogai et al., 1989). Questo studio dimostra che la microflora intestinale gioca un ruolo importante nella patogenesi della parvovirosi e che l'endotossina è un fattore che aggrava le condizioni patologiche dopo l'infezione.

Turk e collaboratori hanno evidenziato *E.coli* in fegato e polmoni da cani deceduti in seguito a infezione da parvovirus. Inoltre, il 90% degli infetti erano stati diagnosticati da colibacillosi setticemica (Turk et al., 1990).

Risposta:

La risposta dell'ospite è uno strumento di grande utilità per il monitoraggio clinico del paziente. Le caratteristiche patogenetiche della parvovirosi predispongono ai soggetti colpiti, a stati setticemici o endotossici conseguenti alla traslocazione batterica secondaria (Otto et al., 1997).

Nel cane, la fase iperdinamica della sepsis caratterizzata da elevata gittata cardiaca e bassa resistenza vascolare sistemica, si traduce in una clinica sotto forma di febbre, tachicardia, tachipnea, mucose di color mattone, polso martellante, depressione e

inappetenza (Brady e Otto, 2001).

La maggior parte dei pazienti affetti da parvovirosi sono cuccioli, questo condiziona enormemente il tipo di monitoraggio rendendo in pratica, la valutazione clinica, lo strumento quasi esclusivo per stadiarli.

L'utilizzo dei criteri di SIRS stabiliti nel cane (Hauptman et al., 1997; Otto et al., 2001 e Okano et al., 2002) non solo sono poco accurati, in più, i 4 parametri clinici misurati sono influenzati dall'età media di questi pazienti così come dall'azione del virus sul midollo osseo.

Il monitoraggio del grado di perfusione, la pressione arteriosa, lo stato del sensorio, la valutazione dell'appetito, il conteggio degli episodi di vomito e di diarrea così come la descrizione di essi; diventano lo strumento di monitoraggio più valioso. Un sistema di punteggio basato su questi parametri sarebbe in grado di informare al clinico sulla gravità della patologia permettendo un intervento terapeutico individuale in base al tipo di situazione.

L'impiego di biomarkers per una valutazione quali-quantitativa in questa popolazione, sarà limitato poiché le ridotte dimensioni impossibilitano effettuare prelievi ematici troppo frequenti o abbondanti (Otto, 2007). Per cui, i parametri misurati saranno strettamente i necessari, con il monitoraggio dei leucociti e la conta leucocitaria e l'ematocrito da una parte, e della proteine di fase acuta dall'altra. Bisogna fare particolare attenzione all'interpretazione di questi parametri poiché questa popolazione è ancora immatura da un punto di vista metabolico ed immunologico.

Disfunzione d'organo:

La disfunzione organica risulta un fattore chiave nella definizione di una prognosi in corso di sepsi. La traslocazione batterica in corso di parvovirosi può portare a complicazioni quali coagulopatie, sindrome da distress respiratorio acuto (ARDS) e disfunzione multiorganica multipla (MODS) (Otto, 2007).

In Medicina Umana come in Medicina Veterinaria, l'ARDS e la MODS sono due riscontri clinici conseguenti a condizioni di setticemie/endotossiemie che

frequentemente portano alla morte(Brady e Otto, 2001; Otto, 2007). Il riconoscimento precoce di queste due sindromi è fondamentale da un punto di vista prognostico. Lo sviluppo di sistemi di punteggio che consentano di caratterizzare accuratamente tutti gli stadi precedenti a queste sindromi, sarebbe essenziale per la Medicina Veterinaria.

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO V

MATERIALI E METODI

5 MATERIALI E METODI

5.1 OBIETTIVO DELLO STUDIO

L'obiettivo di questo studio sperimentale eseguito su cani affetti da parvovirosi è la valutazione dell'utilità diagnostica e prognostica di uno *score* clinico (basato sull'appetito, episodi di vomito e diarrea e stato del sensorio) e delle proteine di fase acuta in cani affetti da questa patologia. La scelta questa popolazione è dovuta al fatto che la parvovirosi può rappresentare un buon modello animale di *Sepsis* ad insorgenza spontanea.

5.2 CRITERI DI INCLUSIONE E POPOLAZIONE IN STUDIO

Nel presente studio retrospettivo vengono comparati le variabili cliniche e i livelli sierici delle proteine di fase acuta come marker di gravità di malattia di una popolazione di soggetti affetti da Parvovirosi, pervenuti presso all'*Ospedale Didattico Veterinario* (ODV) del Dipartimento Clinico Veterinario dell'Alma Mater Studiorum -Università di Bologna nel periodo Gennaio 2007 - Dicembre 2009.

5.2.1.1 Animali

La popolazione iniziale è formata da un totale di 62 cani affetti da segni clinici di gastro-enterite emorragica e diagnosi di parvovirosi accertata in base alla diagnostica di laboratorio. Dall'anamnesi e dalla visita clinica, nonché dal profilo ematobiochimico, sono state escluse patologie pregresse e concomitanti.

I pazienti inclusi nello studio sono stati arruolati in base al compimento dei seguenti

criteri d'inclusione:

- ✓ cani con evidenti segni clinici da enterite da parvovirus (CPV)
- ✓ conferma diagnosi clinica e laboratoristica di parvovirosi;
- ✓ cartelle cliniche complete per quanto concerne dati anamnestici e informazioni sulle terapie e il decorso clinico
- ✓ disponibilità di matrici per la misurazione dei parametri biochimici;

5.2.1.2 Disegno sperimentale

I soggetti con diagnosi certa di Parvovirosi e con campioni di siero e di plasma citrato disponibili, sono stati inseriti nel **Gruppo 1**. In questo gruppo sono state misurate le proteine di fase acuta e correlate tra di loro. Inoltre, in base alla raccolta dei segni clinici rinvenuti nelle prime 24 ore di ospedalizzazione dei pazienti, è stata eseguita una classificazione in accordo al seguente score clinico descritto da Mohr e collaboratori (Morh et al., 2003; Savigni e Macintire, 2010):

Score Numerico				
Categorie valutate	0	1	2	3
Stato Sensorio	Normale	Lieve/moderata Depressione	Grave depressione	Shock/Coma
Appetito	Normale	Capriccioso	Anoressia	Non offerto
Vomito	Assente	Lieve: 1 episodio in 12h	Moderato: 2-5 episodi in 12h	Grave: >6 episodi in 12h
Feci	Ben formate	Soffice o pastose	Diarrea acquosa	Diarrea con sangue

Tabella 6.1 -Sistema dello score clinico utilizzato per quantificare la gravità della sintomatologia clinica nei cani affetti da parvovirus (modificato da Mohr et al., 2003).

Partendo da questa popolazione, i soggetti, sono stati inseriti in tre sottogruppi in base ai diversi criteri SIRS per il cane: **Gruppo A** costituito da 57 pazienti che soddisfano i

criteri SIRS per il cane indicati da Hauptman et al., ovvero, frequenza cardiaca (FC)>120 battiti/min, frequenza respiratoria (FR)>20 atti/min, temperatura (T^a) <38 o >39°C, conta leucocitaria <6.000 o >16.000 WBC/mm³ (Hauptman et al, 1997); **Gruppo B** formato per 46 pazienti che seguono i criteri SIRS stabiliti da Otto (FR>40 atti/min, FC>120 battiti/min, T^a<38°C o T^a>40°C) (Brady e Otto, 2001), **Gruppo C** costituito da 41 soggetti che seguono i criteri di SIRS stabiliti da Okano (FR>40 atti/min, FC>160 battiti/min, T^a<37,7 o T^a>39,7°C) (Okano et al., 2002).

Accanto a questa popolazione è stato preso in esame un altro gruppo, **Gruppo 2**; formato da 8 cuccioli di 2 mesi di età, ritenuti sani, grazie ad un accurato esame clinico e ad un profilo ematobiochimico di base. Tale popolazione di controllo risulta uniforme per età, a quella oggetto di studio.

5.3 CONFERMA DIAGNOSTICA DI PARVOVIROSI

La malattia è stata diagnosticata basandosi sul quadro clinico, sui reperti anamnestici e laboratoristici.

Un primo screening è stato effettuato col test immunocromatografico per la determinazione del Parvovirus canino in campioni di feci (PARVO-IC, Agrolabo S.p.A.) e confermata tramite PCR.

5.4 RACCOLTA DEI CAMPIONI EMATICI

5.4.1.1 Modalità di Prelievo

Ad ogni soggetto, al giorno d' ammissione, sono stati prelevati n°1 provetta di sangue in K3-EDTA , n°1 provetta di sangue senza anticoagulante, con gel separatore (Siero) e, quando possibile, n°1 provetta di sangue in Na-citrato (1:9) . Tutte le provette sono state immediatamente processate presso il Servizio di Patologia Clinica Veterinaria (Sepac Vet) del Dipartimento Clinico Veterinario dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.

5.4.1.2 Processazione e Conservazione dei Campioni

Il sangue in K3-EDTA raccolto con S-Monovette® Sarstedt è stato processato presso il Sepac. Vet, entro un'ora dal prelievo, per l'esecuzione dell'esame emocromocitometrico attraverso l'utilizzo di un contaglobuli automatico, nonché la conta differenziale previo allestimento di uno striscio ematico e successiva lettura al microscopio.

Il sangue in Na-citrato raccolto con S-Monovette® Sarstedt (provette allestite con Na-citrato in soluzione 0,11 mol/l, rapporto Na-citrato/sangue di 1 + 9) all'arrivo in laboratorio è stato immediatamente processato, al fine di rispettare il termine di 2 ore dal momento del prelievo, come riportato in Bibliografia. La separazione del plasma citrato è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a 3000xg. Il prelievo del surnattante è stato eseguito con pipetta monouso avendo la massima cura di evitare lo strato di plasma immediatamente sovrastante, la frazione eritrocitaria, al fine di ottenere un campione di plasma povero di piastrine “platelet-poor plasma”.

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

In accordo con la bibliografia ed in accordo alle indicazioni riportate dalle metodiche specifiche, riguardanti la stabilità del siero e del plasma per le diverse determinazioni analitiche, tale materiale è stato separato in aliquote e successivamente refrigerato (0 - +4 °C) o congelato alla temperatura di -20 °C. I campioni congelati sono stati poi stoccati a - 80 °C fino all'esecuzione delle determinazioni richieste.

Tutte le determinazioni sono state eseguite presso il Sepac Vet del Dipartimento Clinico Veterinario dell'Alma Mater Studiorum – Università di Bologna.

5.5 DETERMINAZIONI

Per tutti i soggetti sono stati eseguiti un esame emocromocitometrico ed un profilo biochimico “di base” comprendente: Urea, Creatinina, Glucosio Aspartato-AminoTransferasi (AST), Alanina-AminoTransferasi (ALT), Fosfatasi Alcalina (SAP), Proteine Totali (PT), Albumina (Alb), Rapporto Albumine-Globuline, Sodio (Na), Potassio (K), Cloro (Cl). Tutte le determinazioni effettuate sui campioni di siero e plasma citrato sono il risultato dell'applicazione di metodiche installate sull'analizzatore automatico *OLYMPUS AU 400*.

5.5.1 ESAME EMOCROMOCITOMETRICO

L'esame emocromocitometrico è stato ottenuto utilizzando il contaglobuli automatico *Cell Dyn* modello 3500 R . Per ogni campione è stato allestito uno striscio di sangue a fresco che è stato analizzato al microscopio per l'ottenimento della formula leucocitaria, della stima piastrinica e della morfologia eritrocitaria dopo colorazione specifica per ematologia.

5.5.2 PROTEINE DI FASE ACUTA

Per la misurazione delle proteine di fase acuta è stata valutata la possibilità di applicare un *profilo* che comprendesse proteine di fase acuta positive (maggiori e moderate) e negative. Tra le APPs positive sono state valutate Aptoglobina, CRP, Ferritina e Fibrinogeno. Tra le proteine di fase acuta negative sono state selezionate Transferrina e Albumina.

5.5.2.1 Aptoglobina

Per la determinazione dell'aptoglobina sierica, questa sperimentazione si è avvalsa di un metodo immunoturbidimetrico (HAPTOGLOBIN OSR 6165, *Olympus System Reagent*)

di derivazione umana, appositamente validato nel nostro laboratorio per il cane con procedure standard di validazione.

Reagenti, Calibrazione:

Reagente R1	Tampone Tris (PH 7,6) 78 mmol/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Anticorpo Anti-Aptoglobina umana da capra Conservante	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Multicalibratore	Siero Proteine 2 OLYMPUS Cat.No. ODR3023	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	controllo Olympus per Immunoturbidimetria ODC0014, ODC0015 e ODC0016	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tabella 8. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per la determinazione dell'Aptoglobina.

Principio del metodo

Quando il campione 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. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione dell'aptoglobina nel campione.

Linearità:

Il metodo lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 30-400 mg/dl. Il test ha una tolleranza riguardo l'effetto prozona di 800 mg/dl.

Stabilità dei reagenti:

I reagenti (R1 e R2) sono pronti all'uso e possono essere posti direttamente sullo strumento. I reagenti sono stabili, se non aperti e conservati a 2-8°C, fino alla data di scadenza. I reagenti una volta aperti e posti nello strumento, sono stabili 60 giorni.

Interferenze

- Bilirubina: nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl bilirubina aggiunta.
- Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 10%.
- Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 20%.

5.5.2.2 Proteina C Reattiva (CRP)

Per valutare la concentrazione di Proteina C Reattiva sierica, si è utilizzato un metodo immunoturbidimetrico (Olympus System Reagent C-REACTIVE PROTEIN OSR 6147) creato per la Medicina Umana ed appositamente validato nel nostro laboratorio per il cane con procedure standard di validazione e l'utilizzo di uno standard CRP canino.

Reagenti, Calibrazione:

Reagente R1	Tampone Tris (Idrossimetil) aminometano (pH 7,5) 80 mmol/l	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Reagente R2	Sodio cloruro 125 mmol/l Polietilenglicole 6000 1,5 % w/v Anticorpo Anti-CRP umana da capra Conservante (sodio azide)	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Multicalibratore	Siero Proteine 1 OLYMPUS Cat.No. ODR3021	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	Controllo Olympus per Immunoturbidimetria Cat.-No ODC0014, ODC0015 e ODC0016	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tabella 9. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per CRP.

Principio del metodo:

Quando il campione viene miscelato con la soluzione tampone R1 e la soluzione antisiero R2, la Proteina C Reattiva reagisce in modo specifico con anticorpi anti-CRP, dando origine ad aggregati insolubili. L'assorbanza di questi aggregati è proporzionale alla concentrazione di CRP nel campione.

Linearità:

Il metodo lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 1-10 mg/dl.

Interferenze:

- Bilirubina: nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl bilirubina aggiunta;
- Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 10%;
- Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 20%.

5.5.2.3 Ferritina

La Ferritina è stata determinata tramite una metodica turbidimetrica Olympus (Olympus System Reagent – FERRITIN, OSR 6150). Questo test è stato creato per la misurazione della ferritina umana. Come riportato per altre metodiche turbidimetriche in medicina umana, non è certo che questa metodica possa essere applicata al cane. Per questi motivi il test è stato validato tramite delle procedure di validazione standard in dotazione al

SEPAC VET. I dati riguardanti la validazione non sono riportati in questo studio, ma si sono rivelati simili a quelli umani. I risultati riportati in questo paragrafo fanno riferimento all'impiego in medicina umana.

Principio del test:

Le reazioni di agglutinazione del lattice si verificano quale risultato della aggregazione di substrati di lattice ricoperti/rivestiti di anticorpi qualora l'antigene sia presente in quantità sufficiente. Gli immuno-complessi che si sono formati nella soluzione diffondono la luce in proporzione alle loro dimensioni, forma e concentrazione. In condizioni di eccesso di anticorpi, un aumento della quantità di antigene risulta in una maggiore diffusione della luce. Il turbidimetro misura la riduzione dell'incidenza della luce dovuta alla riflessione, all'assorbimento o alla diffusione. La misurazione della diminuzione nella intensità della luce trasmessa (aumento di assorbanza) attraverso le particelle sospese in soluzione, risultanti dalla formazione di complessi durante la reazione antigene-anticorpo, è la base di questo tipo di metodica. Il reagente Olympus per la Ferritina è una sospensione di particelle di lattice polistirenico, di dimensioni uniformi, avvolte da anticorpi policlonali di coniglio anti-ferritina. Quando il siero, contenente ferritina, è posto in contatto con il reagente Olympus Ferritina, si forma una miscela di agglutinati. Questa viene misurata spettrofotometricamente dall'analizzatore.

Reagenti, controllo qualità e calibrazione:

Ferritina Reagente (R1 – R2)	Tris buffer (pH 8,2) 88 mmol/l Latex particles coated with rabbit anti-human ferritin Preservative	Storage and stability: 2-6°C On board: 30 days at 2-8°C R2: mixed at weekly intervals
Calibrator	Serum Protein Multi-calibrator OLYMPUS ODR 3021	Storage and stability 7 days at 2-8°C 2 days at 15-25°C
Control	Olympus ITA Control Sera ODC0014	Storage and stability : 7 days 2-8°C 2 days at 15-25°C

Table 5. Calibrator, quality control and reagents for Ferritin

Gli specifici parametri del test applicato alla Olympus AU400 sono riportati in figura 14. La curva di calibrazione e le concentrazioni della ferritina dei 5 standards sono riportati nella figura 15. Una curva di reazione della misurazione della ferritina in uno dei campioni di siero di cane appartenente a questo studio è riportata nella figura 16.

Parameter Specific

Metodiche | LIH | ISE | Range

Nome Test: 64. FERR Tipo: Siero Abilita: Si

Campione: Volume 6.0 uL Diluente 0 uL Fattore Pre-Diluizione: 1

Reagenti: Volume R1 120 uL Diluente 0 uL Limiti OD Reazione: min (B): -2.0000 max (D): 2.5000

Volume R2 60 uL Diluente 0 uL Limiti OD Reagenti: Primo min (u): -2.0000 max (y): 2.5000

Lunghezza d'onda: Pri. 660 Sec. (Nulla) Ultimo min (U): -2.0000 max (Y): 2.5000

Metodo: FIXED Linearità metodo: min (G): 0 max (F): 450

Andamento Reazione: + Correlazione: A 1.000000 B 0.000000

Punti di Lettura: Primo 12 Ultimo 22 Stabilità a Bordo (giorni): 60

Punto di Lettura BC: Primo Ultimo

Linearità Cinetica (*): %

No-Lag-Time:

Visualizza la lista con la barra spaziatrice o con il mouse.

Help Esci Stampa Imposta Test Nr.

Figure 14. Test specific parameters for ferritin applied on the Olympus AU400 analyzer

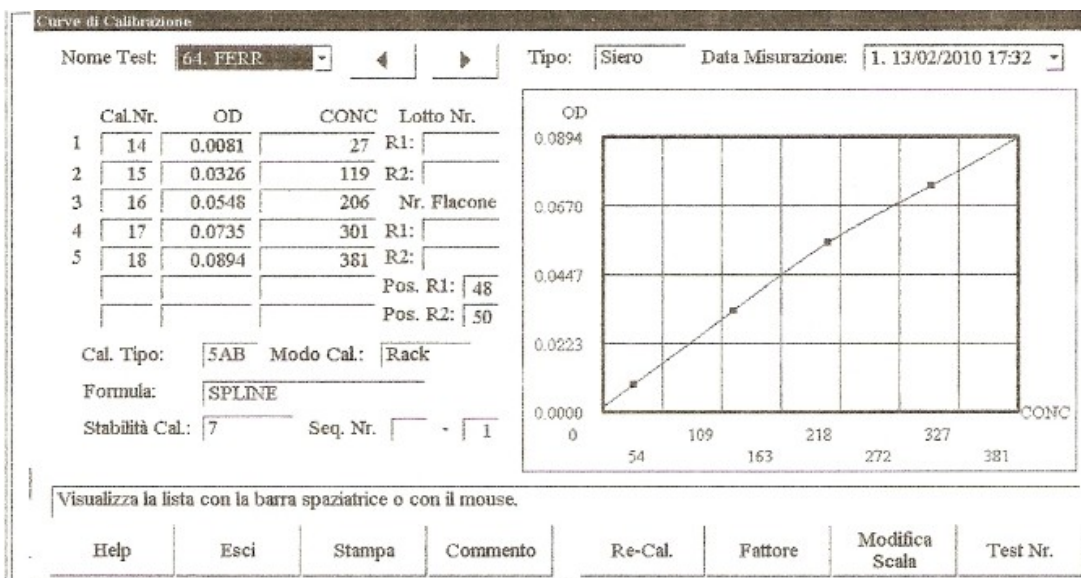


Figure 15. Calibration curve of ferritin with concentration of 5 standards

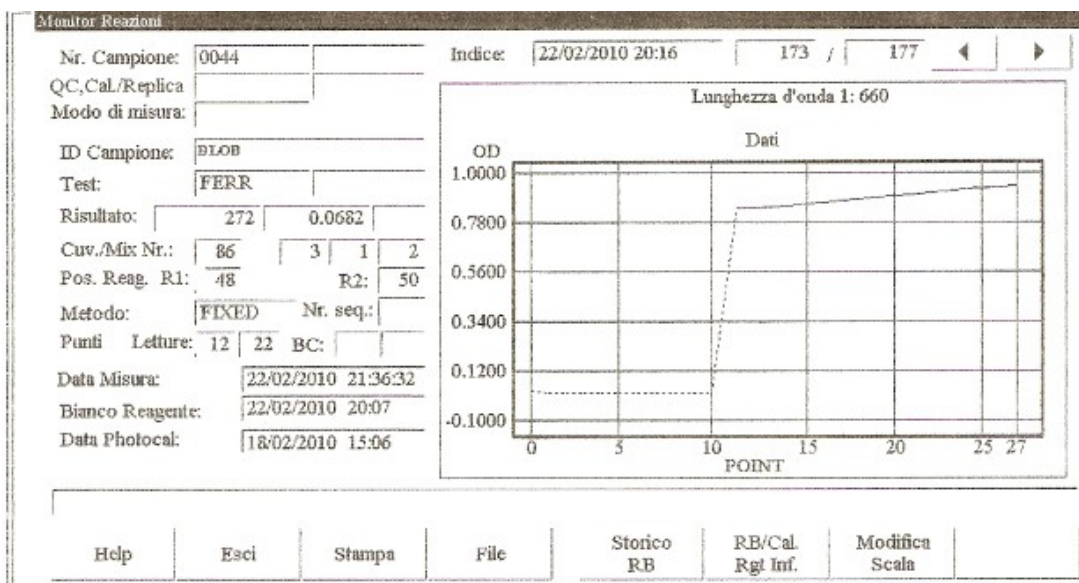


Figure 16. Reaction curve of ferritin measurement

Sensibilità e linearità:

La più bassa concentrazione di ferritina misurabile è stata stimata a 6,4 $\mu\text{g/l}$. Il test è lineare all'interno del range di concentrazioni compreso tra 8,0 – 450 $\mu\text{g/l}$. Campioni con concentrazioni di ferritina molto elevate ($>20'000$ UI/ml) possono determinare dei risultati falsamente bassi senza appropriate flags dovute ad un eccesso di antigene nel campione (prozone effect).

Precisione:

I coefficienti di variazione all'interno del run and total sono più bassi di 4,0.

Interferenze:

- Bilirubina: interferenza minore del 5% ogni 40mg/dl di bilirubina aggiunti.
- Emolisi: interferenza minore del 10% ogni 5 g/l di emoglobina aggiunta.
- Lipemia: interferenza minore del 10% ogni 1500 mg/dl di trigliceridi aggiunti.

5.5.2.4 Fibrinogeno

Per la determinazione del Fibrinogeno plasmatico questa sperimentazione si è avvalsa di una metodica di tipo turbidimetrico (*FIBRINOGENO TURBIDIMETRICO*, MeDia diagnostics) validata nel nostro laboratorio per il cane attraverso l'utilizzo di procedure standard di validazione analitica.

Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazione:

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

Tabella 10. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per la determinazione del Fibrinogeno.

Principio del test:

L'aggiunta di Ammoniosolfato, EDTA e Guanidina cloridrato determina la precipitazione del Fibrinogeno presente all'interno del campione di plasma citrato. L'analizzatore misura tale variazione turbidimetrica dopo aver valutato il cosiddetto bianco campione al fine di evitare le interferenze da bilirubina, emoglobina o chilomicroni.

Linearità:

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

Altri dati:

Temperatura: 25°C;

Lunghezza d'onda: 340nm;

5.5.2.5 Tranferrina

La Transferrina sierica è stata misurata attraverso la metodica indiretta della capacità totale di legare ferro del siero o Total Iron Binding Capacity (TIBC). Tale metodica prevede il calcolo della TIBC ottenuta dalla somma del Ferro totale e della UIBC o Unsaturated Iron Binding Capacity: $TIBC = UIBC + \text{Ferro}$.

5.5.2.5.1 Ferro totale

Il ferro totale del campione di siero è stato misurato attraverso la metodica colorimetrica di Olympus (Olympus System Reagent – IRON, OSR 6186/6286).

Il metodo quantitativo si avvale di un substrato cromogeno (TPTZ) che reagisce con ioni ferroso per formare un complesso di colore blu con massima assorbanza a 600/800 nm.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione:

Ferro Reagenti	Soluzione di glicina 215 mmol/l Acido L ascorbico 4,7 mmol/l TPTZ 0,5 mmol/l	Conservazione: 2-6°C
Calibratore	Multicalibratore OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Cat.N° .66300	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg
Controllo	controlli Olympus Multicontrollo Cat.-N° ODC003, ODC004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tabella 11. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per la determinazione del Ferro.**Principio del test:**

- Transferrina $2(\text{Fe}^{3+}) \rightarrow 2(\text{Fe}^{3+}) + \text{Apo transferrina}$
- $2(\text{Fe}^{3+}) + \text{Ac. ascorbico} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2(\text{Fe}^{2+}) + \text{Ac. Deidroascorbico} + 2\text{H}_3\text{O}^+$
- $\text{Fe}^{2+} + \text{TPTZ} \rightarrow \text{Complesso di Ferro di colore Blu}$

Linearità e sensibilità analitica:

Il metodo risulta lineare tra concentrazioni di ferro comprese tra 10 e 1000 µg/dl. La sensibilità analitica ovvero, la concentrazione minima rilevabile diversa da zero è di 0,3 µmol/l.

Interferenze:

- Bilirubina: interferenze inferiore al 3% fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.
- Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza inferiore al 10%.
- Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 100 mg/dl (Intralipid®) portano ad un'interferenza inferiore al 10%.

5.5.2.5.2 UIBC (Unbound Iron Binding Capacity)

La capacità di legare il ferro insaturata o UIBC, è stata valutata mediante un test colorimetrico di tipo quantitativo (*Olympus System Reagent- UIBC, OSR 6124*).

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione:

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

Tabella 12. Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazioni per la determinazione della UIBC.

Principio del test:

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

Linearità e sensibilità analitica:

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

Interferenze.

- Bilirubina: interferenza inferiore al 10% fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.
- Emolisi: concentrazioni di emolisato aggiunto di 5 g/l portano ad un'interferenza inferiore al 10%.
- Lipidi: concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl (Intralipid®) portano ad un'interferenza inferiore al 10%.

5.5.2.6 Albumina

L'albumina è stata misurata con metodica Olympus (*Olympus System Reagent – Albumin*, OSR 6102/6202). Tale metodica è di utilizzo in routine da diversi anni in Medicina Umana e Veterinaria ed è nota come metodo al verde di bromo-cresolo.

5.6 ANALISI STATISTICA

Per l'analisi statistica questa sperimentazione si avvalsa del software per statistica medica MedCalc® 9.5.2.0. I dati dei diversi gruppi sono stati confrontati attraverso il test U di Mann-Whitney per dati non parametrici. I risultati sono statisticamente significativi con una $P > 0,05$. Sono state correlati tra di loro le diverse proteine, i valori dell'esame emocromocitometrico e lo score clinico.

CAPITOLO VI

RISULTATI

6 RISULTATI

La popolazione di partenza è costituita da 62 pazienti affetti da parvovirosi, patologia che è stata diagnosticata basandosi sulla clinica e sui reperti anamnestici e laboratoristici. Nella tabella sottostante, si espongono tutti i soggetti parvovirofici arrivati all'Ospedale Didattico Veterinario del Dipartimento Clinico Veterinario dell'Università di Bologna-Alma Mater Studiorum, nel periodo compreso tra Gennaio 2007-Dicembre 2009. Inoltre, sono elencate le variabile cliniche raccolte il primo giorno di ricovero di questi soggetti e uno score clinico stabilito già da diversi Autori per questa malattia (Mohr et al., 2003; Savigni et al., 2010).

N.	Segnalamento	T ^a (°C)	FC (batt/min)	FR (atti/min)	WBC (cell/μ)	Score Clinico
1	Clio: meticcio ♀, 2m, 4Kg, NV	40,1-39,2	210-84		2800	8
2	Emma: meticcio, ♀, 2m, 3Kg, NV	39-37,8	140-136	20	7200	7
3	Beba: meticcio ♀, 2m, 2Kg, NV	39-38,3	160-140	20	1900	8
4	Jock: meticcio ♂, 2m, 3Kg, NV	39,9-38,2	160-120	-	2900	7
5	Corà: meticcio ♀, 2m, 3Kg, NV	39,9-38,1	160-124	24-40	1900	7
6	Jhoan: Rottweiler ♂, 3a, 40Kg, V	40,9-37,8	146	35-20	1100	8
7	Anita: meticcio ♀, 2m, 3 Kg, NV	39-37,3	160-94	40-16	900	7
6	Jhoan: Rottweiler ♂, 3a, 40Kg, V	40,9-37,8	146	35-20	1100	8
7	Anita: meticcio ♀, 2m, 3Kg, NV	39-37,3	160-94	40-16	900	7
8	Lady: meticcio ♀, 2m, 2Kg, NV	39-38,7	160-112	40-24	10200	5
9	Mina 2: meticcio ♀, 2m, 1,2Kg, NV	37,8	180	44	3300	8
10	Bria: meticcio ♀, 2m, 3,5Kg, NV	36,5-39	140	36	300	6
11	Cino: meticcio ♂, 2m, 1,6 Kg, NV	38-37,2	130-120	16-24	5600	9
12	Riva: meticcio ♀, 2m, 3Kg, NV	38,3-39,1	140-120	20-32	3300	9
13	Gianna: meticcio ♀, 2m, 3Kg, V	38,5-38,1	128-100	24-28	4500	5
14	Robby: meticcio ♂, 4m, 1,6Kg, NV	38,4-38,7	140	24-18	1590	6

N.	Segnalamento	T ^a (°C)	FC (batt/min)	FR (atti/min)	WBC (cell/μ)	Score Clinico
15	Margot: Rottweiler ♀, 3m, 9,2Kg, NV	39,7-38,3	160-120	12	1000	6
16	Regina: Spitz ♀, 2m, 0,5Kg, NV	38,4-37,1	138-88	-	4240	-
17	Tombolo: Cocker S. ♂, 2m, 9,5Kg, NV	39-38,5	150-96	60-36	5500	7
18	Primo: meticcio ♂, 2m, 1,5 Kg, NV	38,6-37,6	88-140	16-24	525	7
19	Verde 2: meticcio ♂, 2m, 2,5 Kg, NV	38,4	104-68	40	11200	1
20	Giallo: meticcio ♂, 2m, 2,6 Kg, NV	38-37,5	120-92	24-56	9700	7
21	Verde 4: meticcio ♀, 2m, 2,6 Kg, NV	39,1-38	132-100	60-40	8300	7
22	Cinque: meticcio ♀, 2m, 2 Kg, NV	39,3-38,5	132-160	60-44	900	8
23	Saretta: meticcio ♀, 7m, 15 Kg, NV	41,5-39,1	200-152	-	532	8
24	Puppy: meticcio ♂, 4a, 22 Kg, NV	39,4-36	120-90	15-20	-	7
25	Castore: Rottweiler ♂, 4m, 20 Kg, NV	39,1-38,1	180-84	-	1730	11
26	Polluce: Rottweiler ♂, 4m, 20 Kg, NV	39,5-39,2	140-70	-	11900	6
27	Emma: Cocker S. ♀, 4m, 9 Kg, NV	38,5	100	-	13800	8
28	Manolo: meticcio ♂, 2m, 2 Kg, NV	37,6	140	32-20	1300	4
29	Asia: Border Collie ♀, 6m, 12 Kg, V	38,6-39	90-68	18-20	4200	7
30	Diana: meticcio ♀, 45gg, 2 Kg, NV	39-38,2	180-104	-	8400	6
31	Gringo: meticcio ♂, 11m, 23 Kg, NV	39,9-38,5	124-100	-	1300	8
32	Rocky: meticcio ♂, 11m, 15 Kg, NV	38,8-38	140-80	-	7300	3
33	Thor: meticcio ♂, 2m, 1 Kg NV	40,1-39,6	180-140	28-40	375	6
34	Susy: Bassotto Ted ♀, 2a, 8,5 Kg, V	35,4-37,3	160-140	25	5380	10
35	Black: Labrador ♂, 45gg, 4,2 Kg, NV	40,4-39,9	180-168	-	1150	8
36	Moro: Labrador ♂, 45gg, 4,2 Kg, NV	39,9-39,2	160-120	44	2670	8
37	Nero: Labrador ♂, 45gg, 4,2 Kg, NV	38,9-38,5	180-100	100	877	6
38	Clyde: Lupo Cecosl. ♂, 2m, 5,3Kg, NV	38,5-38,9	100-120	-	1700	5
39	Virgola: Pinscher ♀, 45gg, 2Kg, NV	39,4-38,2	200-160	36-40	-	6
40	Rex: Setter Inglese ♂, 10m, 15Kg, NV	37,8	150	50	2600	7
41	Camilla: meticcio ♀, 2m, 2Kg, NV	38,5-38,8	160-156	28	4800	7
42	Bali: meticcio ♀, 2m, 3kg, NV	38,8-38,2	180		2800	6
43	Sashimi: meticcio ♂, 2m, 1,7Kg, NV	38,4-39	180-192	24	23600	5
44	Tempura: meticcio ♂, 2m, 3Kg, NV	37,5-38,8	180	28	15100	6
45	Satai: meticcio ♀, 2m, 3Kg, NV	38,4	160		38600	6

N.	Segnalamento	T ^a (°C)	FC (batt/min)	FR (atti/min)	WBC (cell/μ)	Score Clinico
46	Lombok: meticcio ♂, 2m, 3Kg, NV	39	160	20	12000	4
47	Madou: meticcio ♂, 2m, 4,4Kg, NV	38,5	140	20	80600	5
48	Macao: Rottweiler ♂, 2m, 5Kg, NV	38,4-38,1	135-148	-	3300	7
49	Blob: Rottweiler ♂, 2m, 5Kg, NV	38,6-38,2	132-124	-	1200	8
50	Quark: Rottweiler ♂, 2m, 5Kg, NV	34-38,5	100-148		400	4
51	Orlando: Rottweiler ♂, 2m, 5Kg, NV	38-38,6	104-102	-	2700	5
52	Kira: meticcio ♀, 1a, 6,40 Kg, V	39,2-37,9	120-64	-	7200	4
53	Jack: Pinscher ♂, 7m, 2,2 Kg, V	37,2-37,6	152-88	-	2700	9
54	Sasha: Jack Russel ♀, 1a, 4,7Kg, V	37,5-38,2	108-76	-	1600	8
55	Matisse: Labrador R. ♂, 7m, 25Kg, V	40,6	140	-	433	9
56	Dolly: meticcio ♀, 45gg, 1,3Kg, NV	40,5-39,4	104-182	-	284	2
57	Dora: meticcio ♀ 45gg, 1,2Kg, NV	38,6-38,7	90	-	8500	9
58	Colore: meticcio ♂, 45gg, 1,3Kg, NV	38,3	120	-	10400	5
59	Evita: meticcio ♀, 45gg, 1,1Kg, NV	38,8	192	-	17600	4
60	Bernie: meticcio ♂, 2m, 1,7Kg, NV	37,6	124	-	368	8
61	Naruto: meticcio ♂, 2m, 1,9Kg, NV	37,8	132	-	1680	6
62	Demonio: meticcio ♂, 4m, 6Kg, NV	38,3-39	128-100	28-24	15700	0

Tab. 6.1- Popolazione totale di soggetti parovirofici con i rispettivi valori di Temperatura (T^a), Frequenza cardiaca (FC), Frequenza respiratoria (FR), Leucociti (WBC) e lo Score Clinico (0-12).

Su questa popolazione è stata valutata la distribuzione del sesso, della razza, dello stato vaccinale e del periodo del anno in cui i soggetti sono stati colpiti dalla malattia.

Come si evidenzia nel diagramma sottostante, in questa popolazione, non è stata riscontrata una prevalenza significativa del sesso. D'accordo con la Bibliografia, il sesso non è un fattore predisponente.

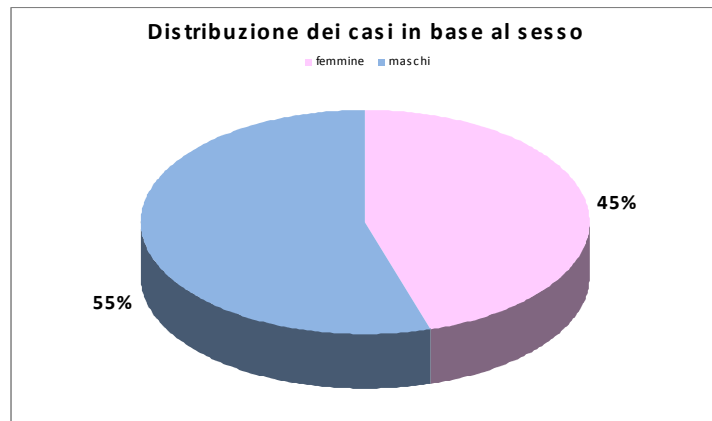


Fig 6.1 – Distribuzione dei soggetti parvovirofici in base al sesso.

Come dimostra la figura a seguire, i soggetti non vaccinati, quelli con un protocollo vaccinale incompleto o con una anamnesi muta al rispetto, rappresentano la popolazione fondamentale colpita dal virus, per cui, le pratiche vaccinale contro il parvovirus canino sono fortemente consigliate.

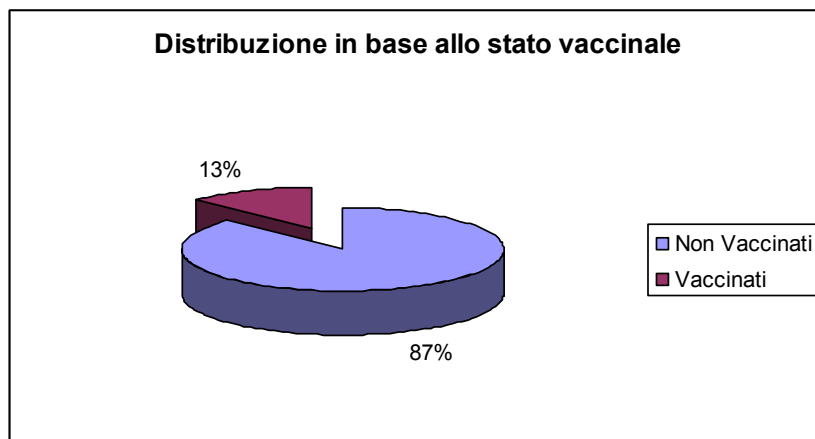


Fig 6.2- Distribuzione della popolazione in base allo stato vaccinale.

In quest'altra figura, si evidenzia che oltre al 70% della nostra popolazione ha 2 mesi di età. D'accordo con la letteratura, un soggetto è molto più suscettibile a contrarre la malattia dopo lo svezzamento, momento in cui si abbassano gli anticorpi trasmessi dalla madre (Houston et al., 1996).

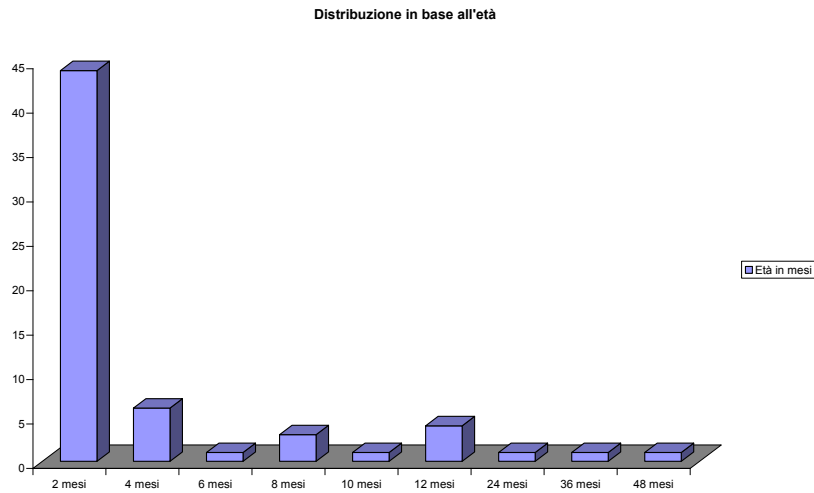


Fig. 6.3- Distribuzione della popolazione di parvovirofici in base all'età.

Nell'immagine sottostante, si mostra la distribuzione della popolazione di parvovirofici in base alla razza. Si evidenzia che più della metà dei soggetti colpiti, bensì il 64,5%, sono meticci; mentre, come la letteratura sostiene come una delle più colpite, i Rottweiler, ha una rappresentazione del 13% seguita del Labrador Retriever con un 6,5%. (Glickman et al., 1985; Brunner e Swango, 1985).

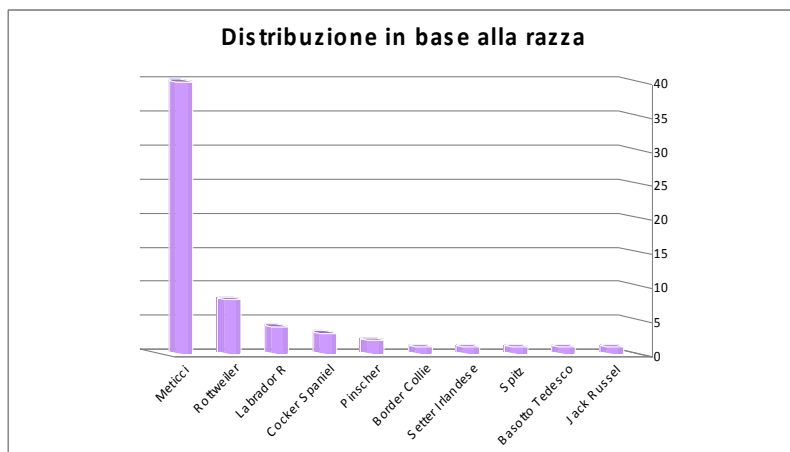


Fig. 6.2- Distribuzione dei parvovirofici in base alla razza.

Per quanto riguarda alla distribuzione stagionale della patologia durante i tre anni che è durato lo studio, abbiamo trovato una maggior prevalenza di parvovirofici nei mesi invernali (Dicembre-Gennaio) rispetto a quelli estivi, discordando con i dati che ci sono in Bibliografia (Houston et al., 1996).

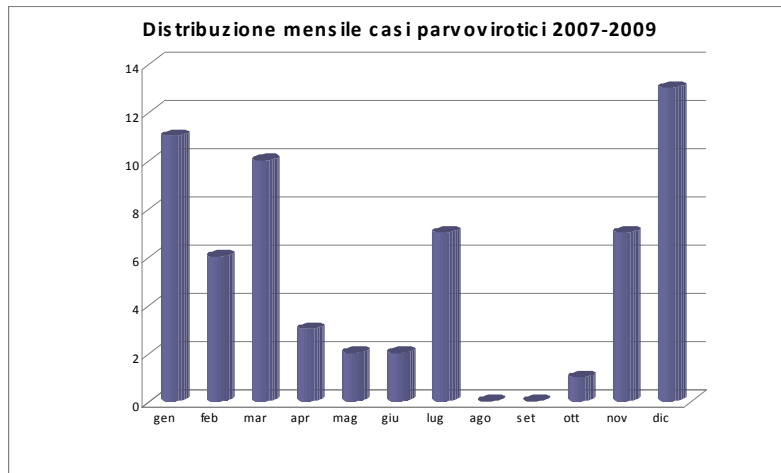


Fig. 6. 3- Distribuzione della popolazione in base ai mesi dell'anno.

Dalla popolazione iniziale di 62 pazienti parvovirofici si è stabilito come **Gruppo 1** la popolazione di soggetti che avevano a disposizione una provetta di siero e una di plasma citrato e che erano forniti dall'esame emocromocitometrico già eseguito. Su questo gruppo, costituito da 58 pazienti, sono stati effettuati, oltre all'esame emocromocitometrico, un profilo biochimico di base, dove sono state misurate le APPs (Proteine totali, Albumina, TIBC, Ferro, Ferritina, Saturazione della TIBC, CRP, Hp) e un'esame coagulativo in cui si sono stati analizzati il Fibrinogeno, l'Antitrombina e i D-dimeri. Nelle tre tabelle che seguono sono evidenziati i rispettivi risultati. I pazienti che sono morti sono evidenziati in rosso. Nella prima tabella si mostrano parametri dell'esame emocromocitometrico. Le caselle lasciate vuote sono e misurazioni che non è stato possibile misurare.

Soggetto	Hct	Hb	RBC	MCV	MCHC	WBC	PLT
Clio	29,4	10,3	4800000	61,3	34,9	313	507000
Emma	25,6	9,4	4230000	60,6	37,0	7200	1213000
Beba	43,6	16,0	6520000	66,9	36,7	6900	175000
Jock	33,6	11,7	5410000	62,1	34,7	290	600000
Cora	28,6	10,2	4720000	60,5	35,7	1900	631000
Mina2	29,4	9,8	4840000	60,8	33,3	3300	398000
Bria	33,9	12,4	5760000	58,8	36,5	300	439000
Cino	29,2	10,1	4970000	58,7	34,5	5600	495000
Riva	32,6	11,5	5550000	58,7	35,4	3300	436000
Gianna							
Robby	47,7	16,7	7360000	64,9	34,9	1590	264000
Margot	36,1	12,4	5360000	67,4	34,3	2190	184000
Tombolo	43,3	15,0	6730000	64,4	34,7	5500	323000
Primo	34,6	12,0	5570000	62,2	34,6	525	767000
Verde	32,6	11,5	5050000	64,5	35,4	11200	974000
Giallo	33,5	11,7	5470000	61,2	35,0	9700	964000
Quattro	31,6	11,0	5070000	62,3	34,9	8300	840000
Cinque	38,6	13,4	6100000	63,2	34,6	900	486000
Saretta	49,6	18,0	7920000	62,7	36,2	532	268000
Puppy	51,5	18,8	7690000	67,0	36,6	4000	278000
Castore	45,7	15,8	7190000	63,6	34,6	1730	90300
Polluce	31,4	11,3	5160000	60,8	36,0	11900	181000
Emma cocker	42,1	15,2	6050000	69,5	36,2	13800	226000
Manolo	38,8	13,7	5830000	66,7	35,3	1300	515000
Asia	42,8	15,4	6430000	66,5	36,0	11500	229000
Diana	29,7	10,4	4630000	64,2	35,0	8400	255000
Gringo	48,9	18,0	8020000	61,0	36,9	1300	329000
Rocky 2	48,6	17,8	7230000	67,2	36,6	7300	262000
Thor	37,3	12,7	6000000	62,2	34,1	355	87200
Susy	73,3	26,9	11800000	62,4	36,6	5380	221000
Black	35,2	12,1	5710000	61,7	34,3	1150	451000
Moro	30,6	10,8	5300000	57,7	35,3	877	442000
Nero	34,0	11,4	5830000	58,4	33,6	2670	323000
Clyde	27,9	10,0	4700000	59,4	36,0	1700	643000
Virgola	29,7	9,8	4460000	66,6	33,1	11900	36700
Rex	50,1	18,1	7300000	68,6	36,0	2600	286000
Camilla	31,0	10,3	5030000	61,7	33,0	4800	288000
Bali	28,9	9,1	4110000	70,4	31,5	2790	298000
Sashimi	33,0	10,7	4940000	68,3	32,5	23600	494000
Tempura	26,4	8,4	3750000	70,3	32,1	15100	431000
Satai	28,5	9,3	4320000	66,0	32,8	38600	489000
Lombok	26,2	8,3	4390000	59,6	31,7	12000	400000
Madou	31,5	10,0	4750000	66,3	31,9	80600	369000

Soggetto	Hct	Hb	RBC	MCV	MCHC	WBC	PLT
Macao	29,6	10,2	5270000	56,1	34,6	3300	264000
Blob	30,8	10,7	5520000	55,8	34,9	1200	441000
Quark	29,1	10,2	5210000	55,8	35,1	400	534000
Orlando	26,6	9,6	4770000	55,7	36,2	2700	281000
Kira	49,6	18,6	7340000	67,6	37,5	7200	223000
Jack	50,4	18,7	8050000	62,6	37,2	2700	442000
Sasha	42,4	16,0	6730000	62,9	37,9	1600	207000
Matisse	50,6	18,8	7910000	63,9	37,2	433	147000
Dolly	23,6	7,9	3750000	62,9	33,9	284	146000
Dora	20,2	6,8	3210000	63,0	34,0	8500	94900
Colore	23,2	8,1	3780000	61,4	35,0	10400	214000
Evita	25,9	8,9	4110000	62,8	34,6	17600	207000
Bernie	25,0	8,7	4100000	61,2	34,4	368	154000
Naruto	22,7	8,1	3810000	59,6	35,6	1680	448000
Demonio	34,2	12,6	5510000	62,1	36,9	15700	248000

Tab.6.2. Soggetti del Gruppo 1 con i rispettivi valori di: Ematocrito (HTC%, I.R.=37-55), Emoglobina (Hb gr%, I.R.=8-15), Eritrociti (RBC/mm³, I.R.=5000.000-10.000.000), MCV (fl, I.R.=60-77), MCHC (gr%, I.R.=32-38), Leucociti (WBC/mm³, I.R.=6000-17000), Piatrine (PTL/mm³, I.R.=160000-500000).

Nella tabella successiva si evidenziano i risultati delle proteine di fase acuta misurate.

Soggetto	Prot	Alb	TIBC	CRP	Hp	Fe	Ferritina	Saturaz.
Clio	4,74	2,24	293	8,08	310	60	380	20
Emma	3,18	1,35	150	1,85	356	128	104	85
Beba	3,99	1,78	172	8,41	365	37	75	22
Jock	3,50	1,21	146	6,76	344	40	193	28
Cora	2,92	1,29	198	0,69	215	58	61	29
Mina2	3,47	1,46	193	7,22	226	82	309	43
Bria	4,81	2,12	150	25,25	397	20	167	13
Cino	4,86	1,87	259	9,00	266	125	250	48
Riva	4,50	2,07	241	9,86	290	43	95	48
Gianna	4,45	2,43	263	8,72	360	50	88	18
Robby	5,85	2,90	210	4,00	366	151	112	72
Margot	5,09	2,36	312	8,02	328	25	237	8
Tombolo	5,98	2,89	285	7,65	393	73	142	26
Primo	3,95	1,81	144	6,32	351	73	723	51
Verde	4,89	2,48	271	1,81	311	128	28	47
Giallo	4,32	2,28	213	3,24	265	115	56	54
Quattro	4,67	2,24	216	6,20	380	60	122	28
Cinque	4,94	2,23	204	6,68	467	103	171	50
Saretta	6,09	2,68	348	21,32	348	31	144	9
Puppy	5,82	2,48	179	7,30	575	83	81	46
Castore	5,35	2,25	257	21,94	374	32	99	6
Polluce	5,46	2,79	345	23,65	117	22	91	6
Emma cocker	5,45	2,88	382	4,92	166	29	75	8
Manolo	5,36	1,81	217	5,23	346	158	62	73
Asia	4,25	1,70	178	7,16	292	59	73	33
Diana	5,15	2,47	416	4,52	323	98	187	24
Gringo	5,76	2,11	199	29,34	547	36	119	18
Rocky 2	5,98	3,14	255	9,21	400	56	58	22
Thor	5,63	2,32	243	17,95	543	33	162	14
Susy	4,52	2,14	197	9,36	136	44	66	22
Black	5,39	2,46	216	23,54	367	14	98	6
Moro	3,99	1,72	147	8,23	317	6	140	4
Nero	4,44	2,14	226	7,43	222	23	118	10
Clyde	3,51	1,64	146	6,57	342	27	69	18
Virgola	4,63	2,37	350	17,32	172	21	38	6
Rex	6,16	2,99	237	8,29	514	81	224	34
Camilla	4,58	1,61	23	7,59	337	49	493	21
Bali	3,80	1,61	167	5,29	325	70	174	42
Sashimi	3,32	1,38	140	3,73	235	48	274	34
Tempura	3,32	1,43	200	6,57	117	36	72	18
Satai	3,91	1,41	211	2,03	167	62	35	29

Soggetto	Prot	Alb	TIBC	CRP	Hp	Fe	Ferritina	Saturaz.
Lombok	4,33	1,59	299	3,18	198	82	59	27
Madou	4,72	1,88	156	9,92	393	61	133	39
Macao	4,85	1,84	251	23,03	516	59	325	24
Blob	4,29	1,71	203	20,65	367	72	272	35
Quark	4,00	1,52	224	19,30	279	36	286	16
Orlando	3,98	1,71	153	6,82	332	72	71	47
Kira	6,55	3,74	302	0,31	11	114	83	38
Jack	4,73	2,15	153	5,12	497	124	138	81
Sasha	4,94	2,13	196	8,94	528	38	96	19
Matisse	5,47	2,18	142	9,84	338	74	102	52
Dolly	3,87	1,65	216	6,36	280	63	59	29
Dora	3,84	1,75	263	5,85	149	218	76	83
Colore	4,08	1,77	305	1,72	43	157	44	51
Evita	4,18	1,91	314	4,65	19	16	51	5
Bernie	4,54	1,82	216	4,77	550	53	286	25
Naruto	4,63	1,90	240	3,83	388	109	133	45
Demonio	5,03	2,63	319	8,14	172	29	51	9
Interv. Rifer.	5,6-7,9	2,8-3,7	306-469	0-0,5	20-140	99-309	41-136	24-71
Mediana	4,63	2,09	216	7,00	335	59	103	27

Tab 6.3. Soggetti del Gruppo 1 con i valori rispettivi delle APPs: Proteine Totali (g/dl), Albumine (g/dl), TIBC (µ/dl), CRP (mg/dl), Ferro (µ/dl), Ferritina (ng/dl), Saturazione (%).

Nella terza tabella sono stati elencati i risultati dell'esame coagulativo, in cui è stato misurato il fibrinogeno, i D-Dimeri e la Antirombina.

Soggetto	Fibrinogeno	D-Dimeri	AT
Clio			
"Emma"	5,64	0,04	69
"Beba"	8,88	0,04	77
"Jock"	3,72	0,08	39
"Cora"	1,95	0,06	74
Mina2	2,65	0,12	54
Bria		0,20	53
"Cino"	6,19	0,16	71
"Riva"	6,07	0,07	74
"Gianna"	6,00	0,22	79
"Robby"	10,04	0,07	70
"Margot"	3,81	0,34	76
"Tombolo"	9,16	0,11	75
"Primo"			
"Verde"	5,52	0,08	76
"Giallo"	3,20	0,04	87
"Quattro"	6,32	0,08	67

Soggetto	Fibrinogeno	D-Dimeri	AT
"Cinque"	9,36	0,09	64
"Saretta"	4,85	0,21	93
"Puppy"	6,53	0,21	72
"Castore"	4,03	0,24	68
"Polluce"	5,64	0,08	77
"Emma cocker"	3,96	0,24	80
"Manolo"	3,84	0,09	73
"Asia"	5,05	0,24	65
"Diana"	5,40	0,06	72
"Gringo"	7,68	0,41	65
"Rocky 2"	8,88	0,13	76
"Thor"	5,64	0,34	63
"Susy"	3,05	0,21	62
"Black"	6,47	0,19	73
"Moro"	4,66	0,13	59
"Nero"	4,85	0,14	64
"Clyde"	4,56	0,05	65
"Virgola"	5,80	0,20	63
"Rex"	8,40	0,17	87
"Camilla"	7,68	0,10	76
Bali	2,60	0,02	55
Sashimi	2,28	0,17	46
"Tempura"	2,63	0,47	57
"Satai"	2,76	0,07	82
"Lombok"	2,96	0,03	87
Madou"	5,04	0,11	71
"Macao"	5,52	0,08	65
"Blob"	5,60	1,51	64
"Quark"	2,60	0,48	56
"Orlando"	5,76	0,01	73
"Kira"	5,16	0,14	101
"Jack "	5,16	2,35	57
"Sasha"	5,52	0,14	68
"Matisse"	5,04	0,14	47
"Dolly"	6,08	0,08	69
"Dora"	5,16	0,19	54
"Colore"	2,38	0,08	69
"Evita"	3,16	0,06	70
"Bernie"	9,12	0,09	72
"Naruto"	6,16	0,05	71
"Demonio"	3,96	0,15	64
I.R.	1,45-3,85	0-0,26	105-166
Mediana	5,16	0,13	70

Tab. 6.4. Soggetti del Gruppo 1 con i rispettivi valori dei parametri misurati all'esame coagulativo.

I risultati ottenuti dagli esami ematobiochimici e coagulativo sono stati studiati con il programma di statistica medica MedCalc® 9.5.2.0. e confrontati attraverso il test U di Mann-Whitney per dati non parametrici. I risultati sotto elencati sono statisticamente significativi quando $p < 0,05$ e altamente significativi quando $p < 0,0001$. I diagrammi che seguono mostrano la distribuzione delle diverse variabili misurate e dello score clinico stabilito per ogni paziente.

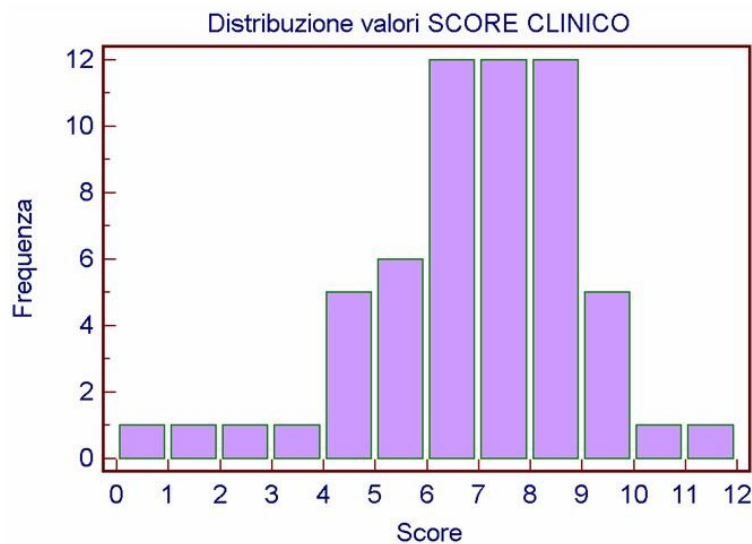


Fig. 6.1. Distribuzione dello score clinico nella popolazione parvo. Mediana=7 (0-12).

Nella Fig. 6.1. è rappresentata la distribuzione dello score clinico della popolazione totale, e nella Fig. 6.2., la distribuzione dei leucociti.

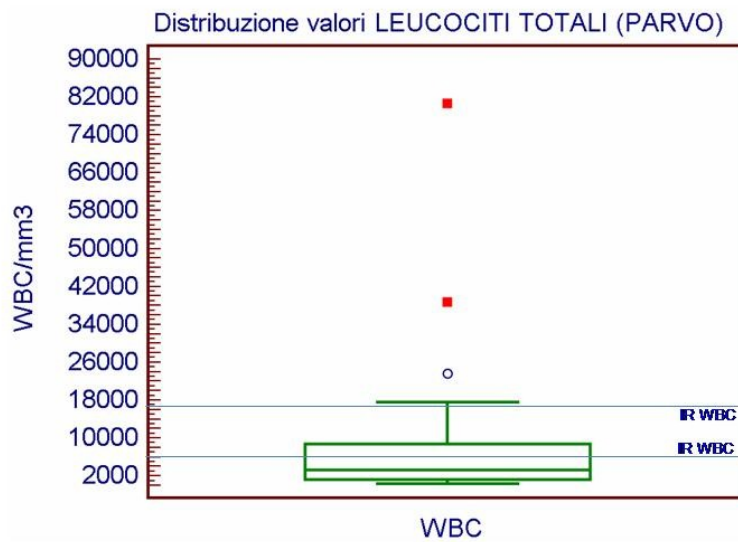


Fig. 6. 2. Distribuzione dei leucociti (WBC) nella popolazione parvo (Mediana=3300).

La distribuzione dell'ematocrito, MCV, e MCHC di questa popolazione sono rappresentate nei diagrammi a seguire.

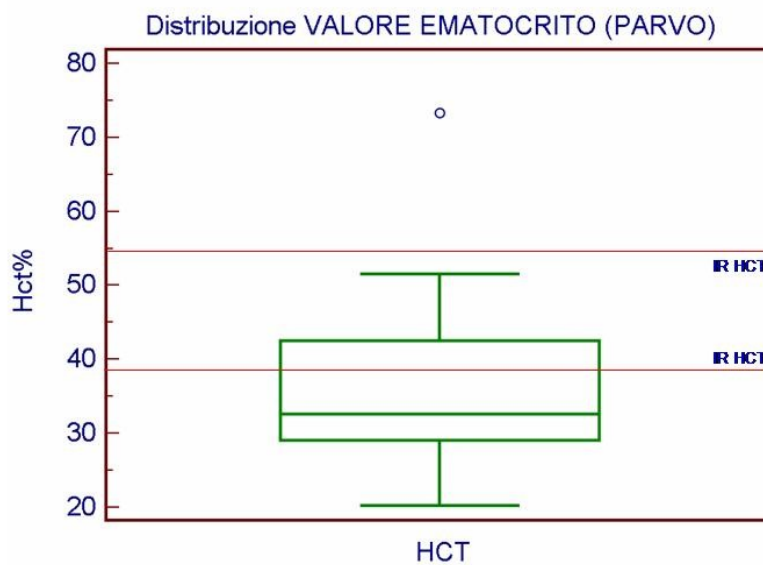


Fig. 6.3. Distribuzione del valore dell'ematocrito della popolazione parvo (Mediana=32,6).

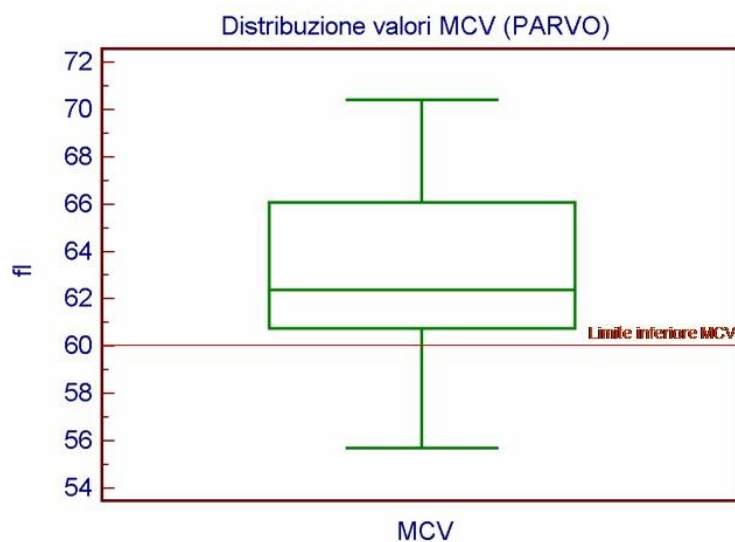


Fig. 6.4. Distribuzione dei valori del MCV (Volume corpuscolare medio) (Mediana=62,4).

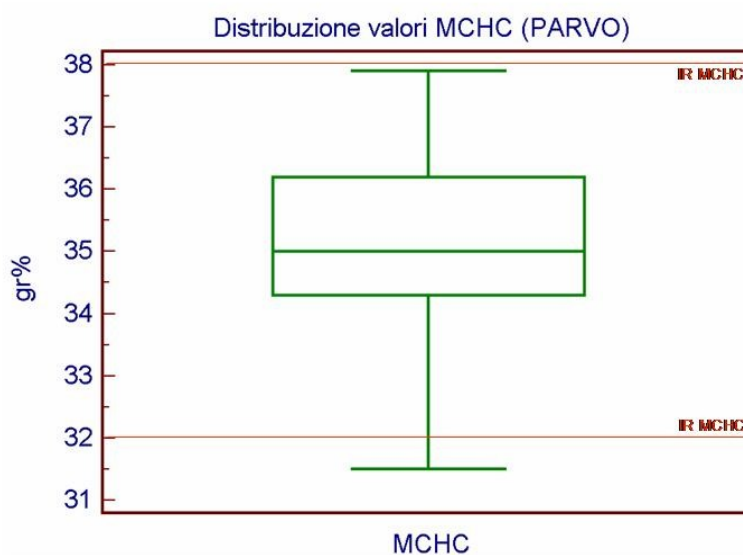


Fig. 6.5. Distribuzione dei valori del MCHC (Concentrazione corpuscolare media dell'emoglobina) (Mediana=35).

Nella figura sottostante si evidenzia la distribuzione dei valori delle Piastrine totali della popolazione.

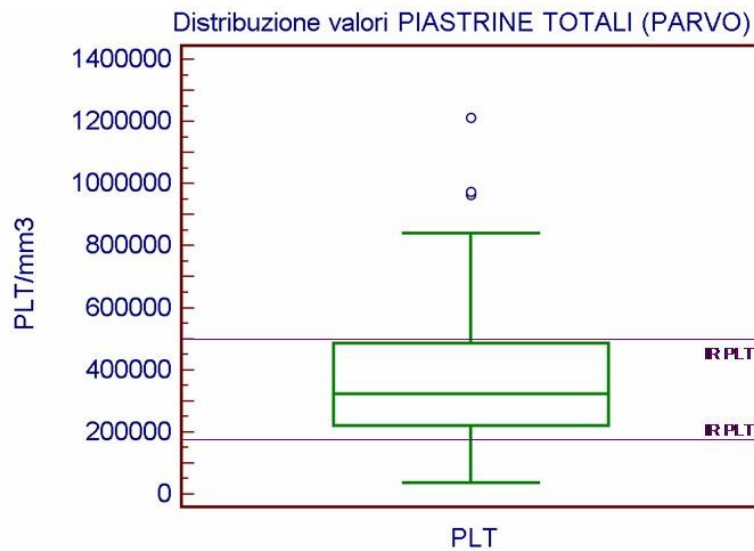


Fig. 6.6. Distribuzione dei valori delle piastine (PLT) (Mediana=323.000).

Nei diagrammi successivi vengono rappresentate i risultati dell'esame biochimico.

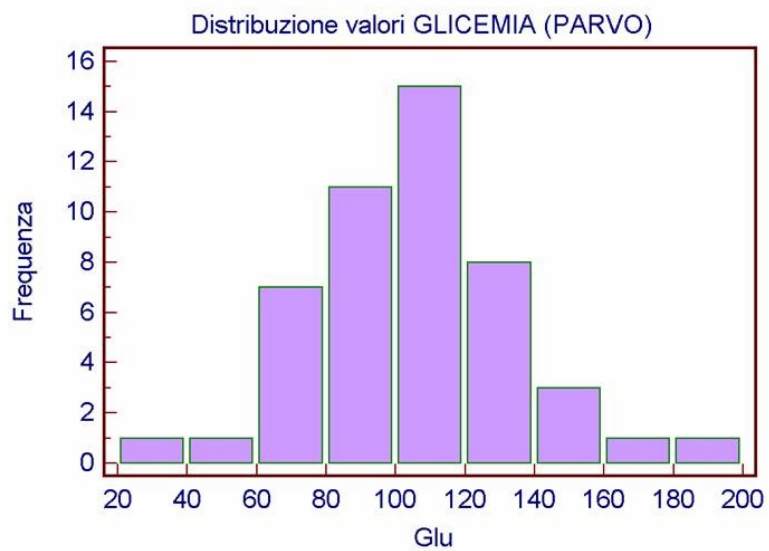


Fig. 6.7. Distribuzione dei valori della Glicemia (Mediana=105).

Le distribuzioni dei valori delle Proteine Totali e dell'Albumina sono evidenziate nella figura 6.8.

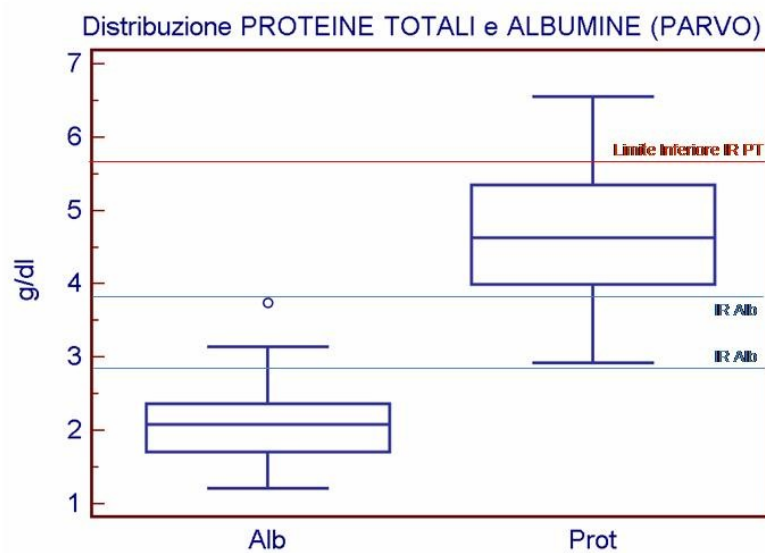


Fig. 6.8. Distribuzione dei valori delle Proteine Totali (Mediana=4,63) e dell'Albumina (Mediana=2,09).

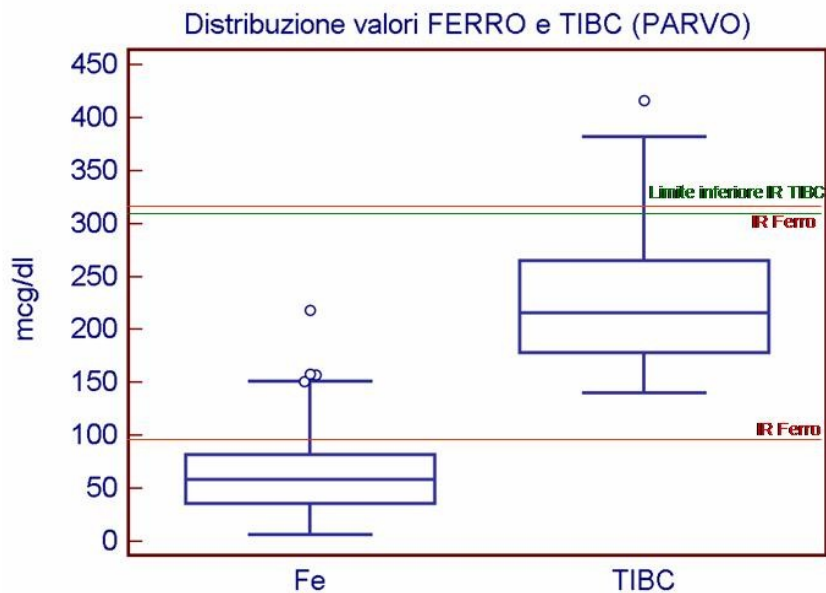


Fig. 6.9. Distribuzione dei valori del Ferro Totale (Mediana=59) e della TIBC (309-469; Mediana=216).

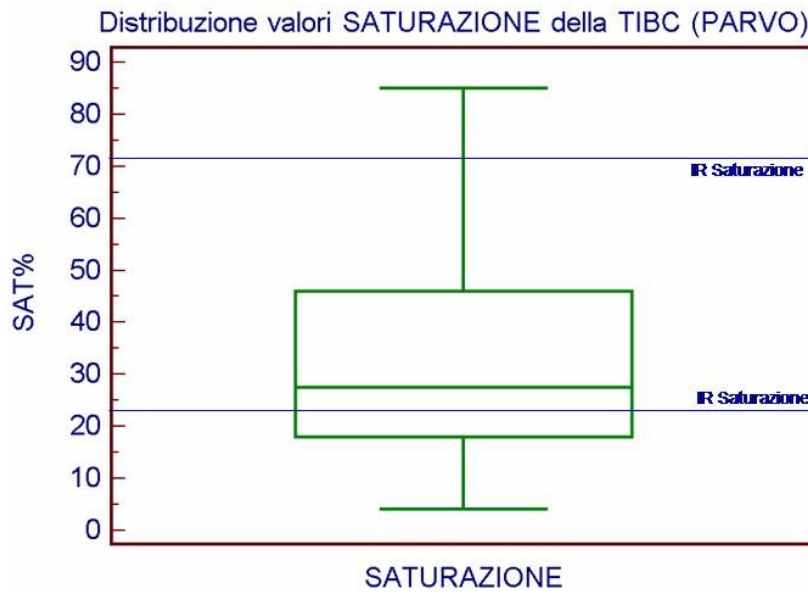


Fig. 6.10. Distribuzione dei valori della Saturazione della TIBC (Mediana=27).

A continuazione si mostrano le distribuzioni di 3 delle APPs positive più importanti.

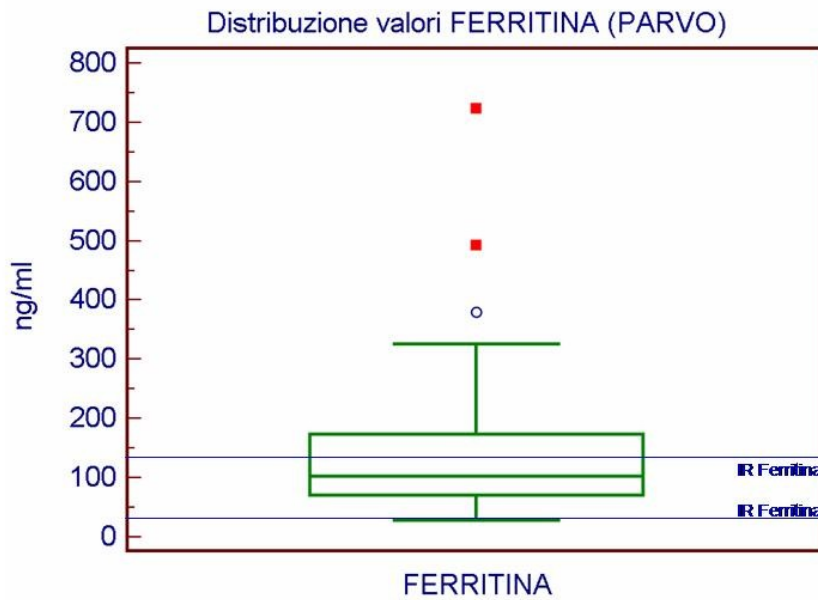


Fig. 6.11. Distribuzione dei valori della Ferritina (Mediana=103).

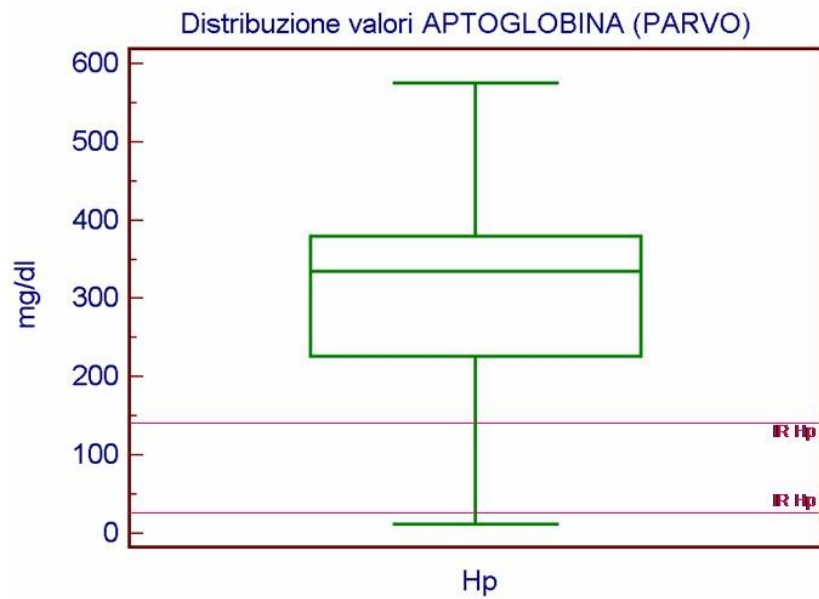


Fig.6.12. Distribuzione dei valori dell'Aptoglobina (Mediana=335).

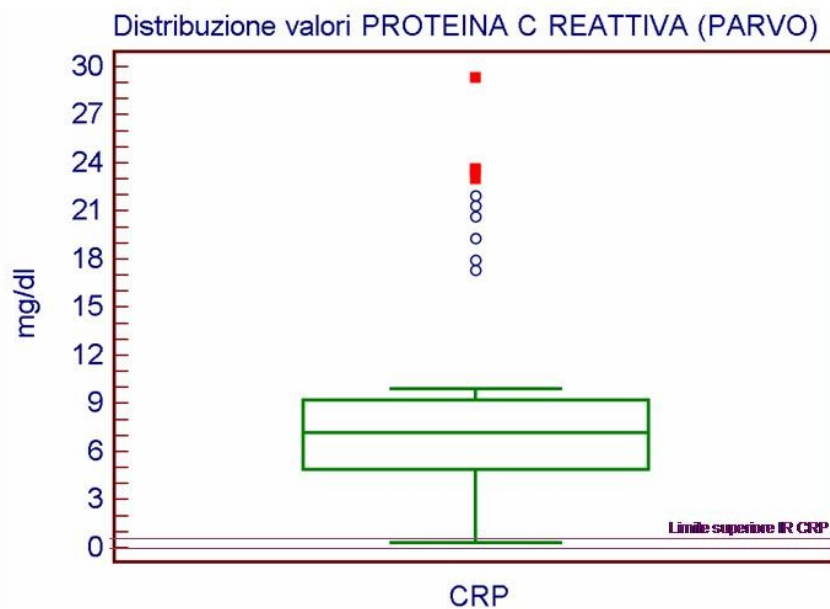


Fig. 6.13. Distribuzione dei valori della CRP (0-0,5; Mediana=7).

Dall'esame coagulativo sono emersi i seguenti risultati:

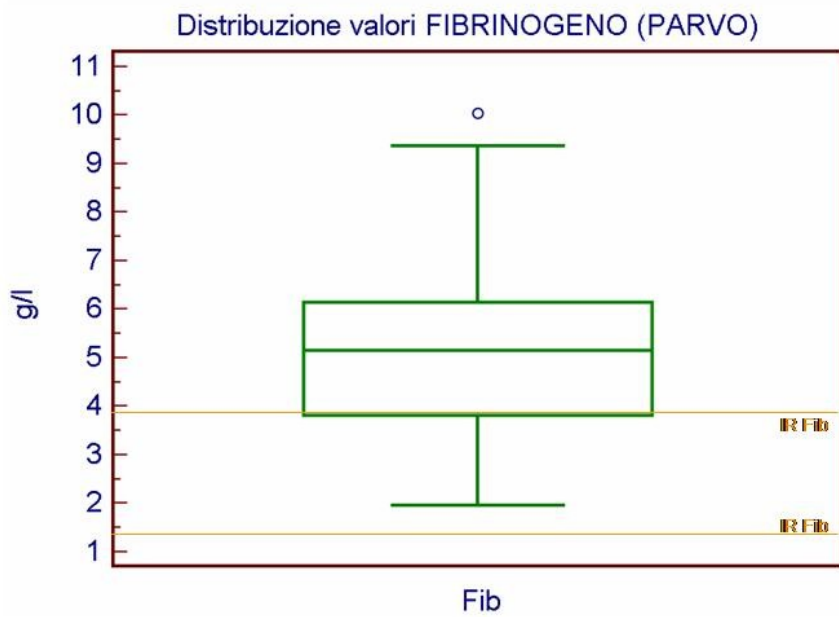


Fig. 6.14. Distribuzione del Fibrinogeno (Mediana=5,16).

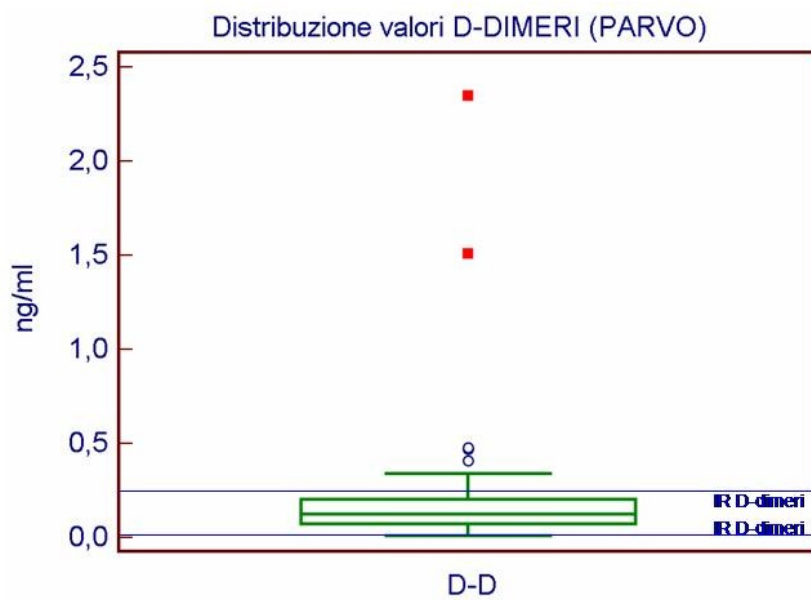


Fig. 6.15. Distribuzione dei valori dei D-Dimeri (Mediana=0,13).

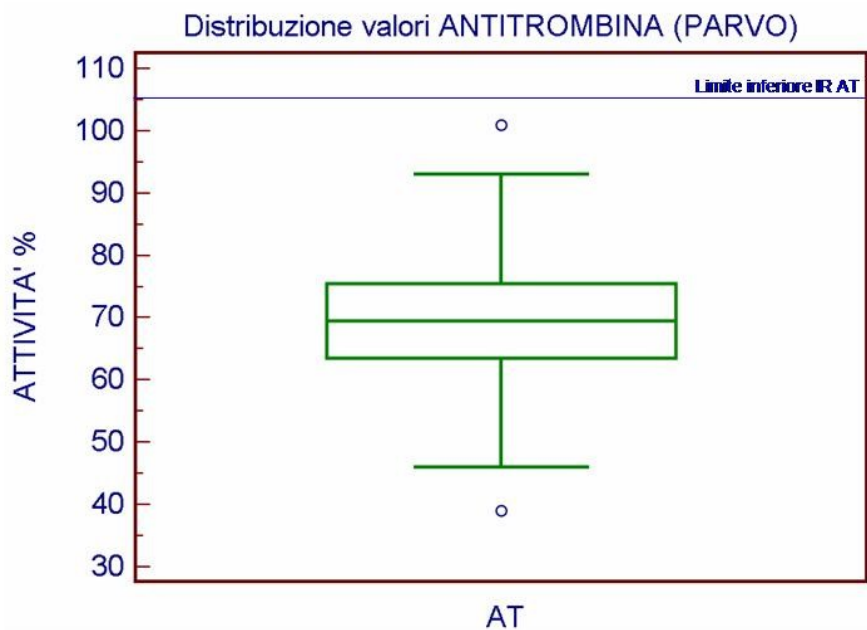


Fig. 6.16. Distribuzione dei valori dell'Antitrombina (105-166; Mediana=70).

Analizzando le diverse variabili tra di loro abbiamo ottenuto che quelli con una correlazione statisticamente significativa, quindi $p < 0,05$, erano le seguenti:

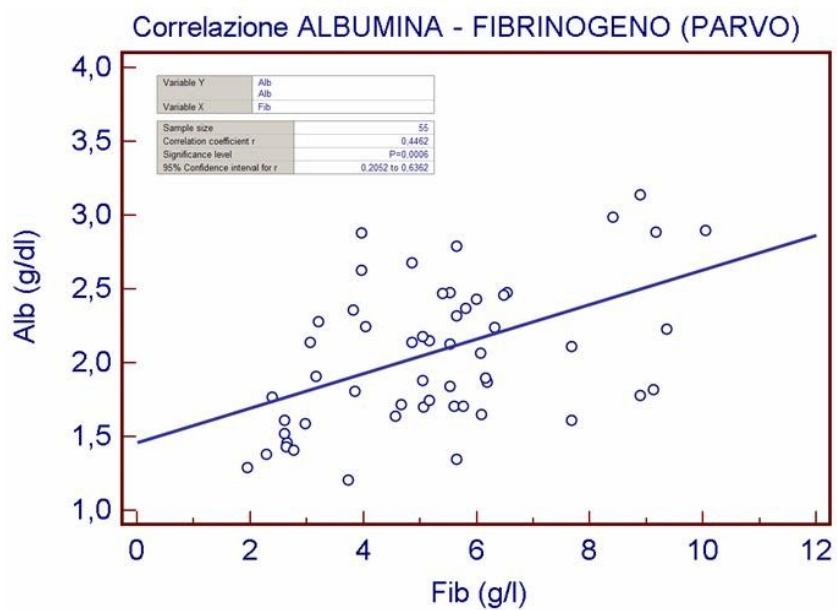


Fig. 6.17. Correlazione tra l'Albumina e il Fibrinogeno.

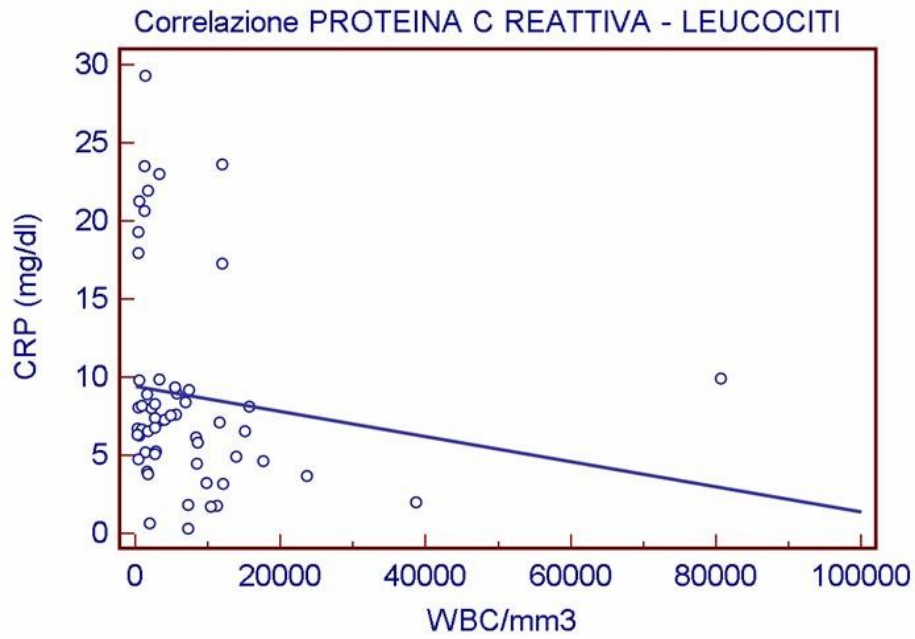


Fig. 6.18. Correlazione tra la CRP e i Leucociti.

Come si evidenzia nella figura 6.18 non esiste correlazione tra questi due parametri.

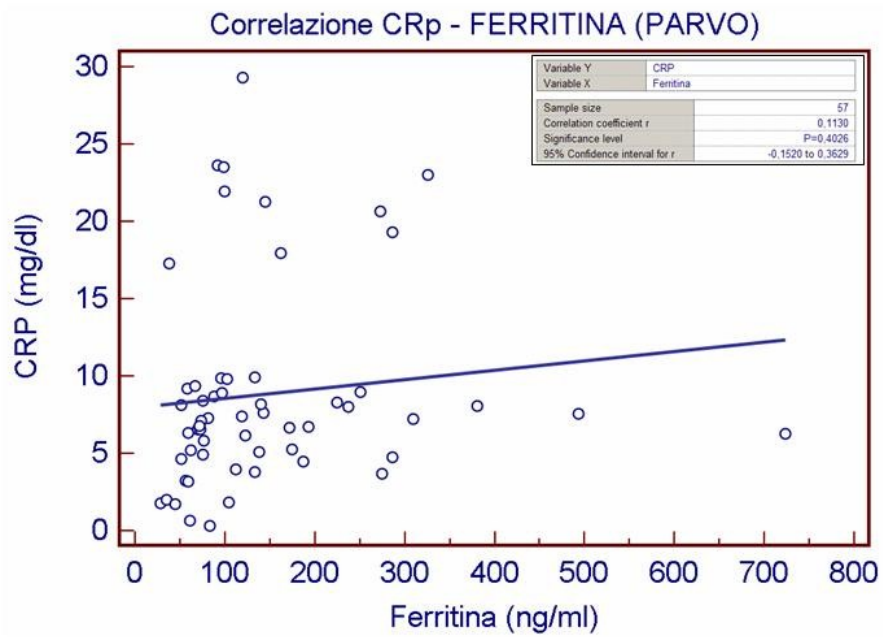


Fig. 6.19. Correlazione della CRP e la Ferritina.

6.1 STUDIO DELLA POPOLAZIONE IN BASE AI CRITERI SIRS

Il Gruppo 1 si è, quindi, suddiviso in tre sottogruppi secondo i tre criteri SIRS stabiliti per il cane; che elencati in ordine di minore a maggiore restrizione sono: **Gruppo Hauptman**, **Gruppo Otto/Brady** e **Gruppo Okano**. Abbiamo analizzato le variabili cliniche di questi gruppi e quelle statisticamente significative, $p < 0,05$, sono state graficate successivamente.

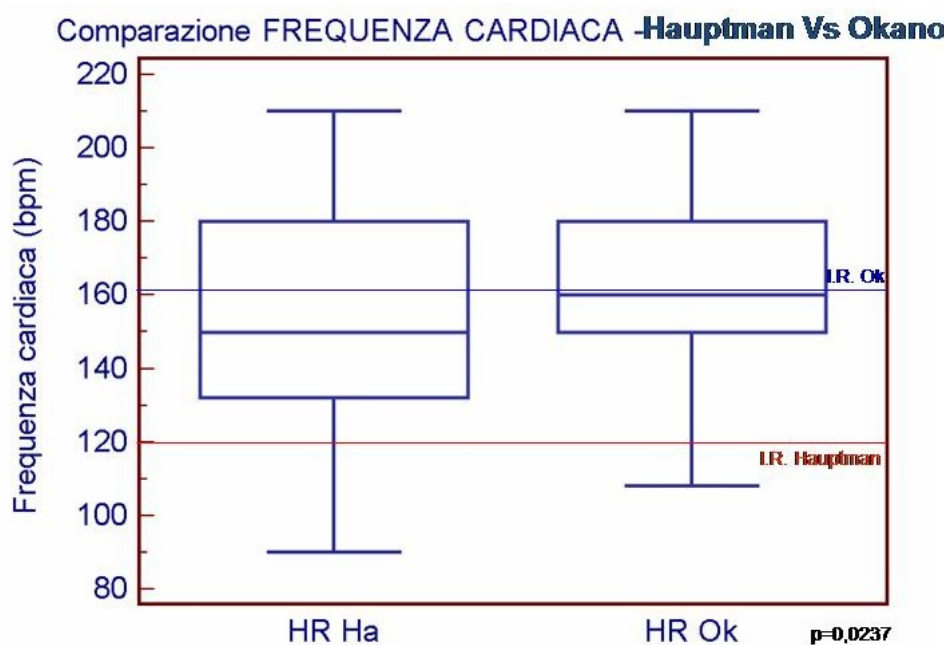


Fig. 6.20. Comparazione della Frequenza Cardiaca tra Gruppo Hauptman e Gruppo Okano.

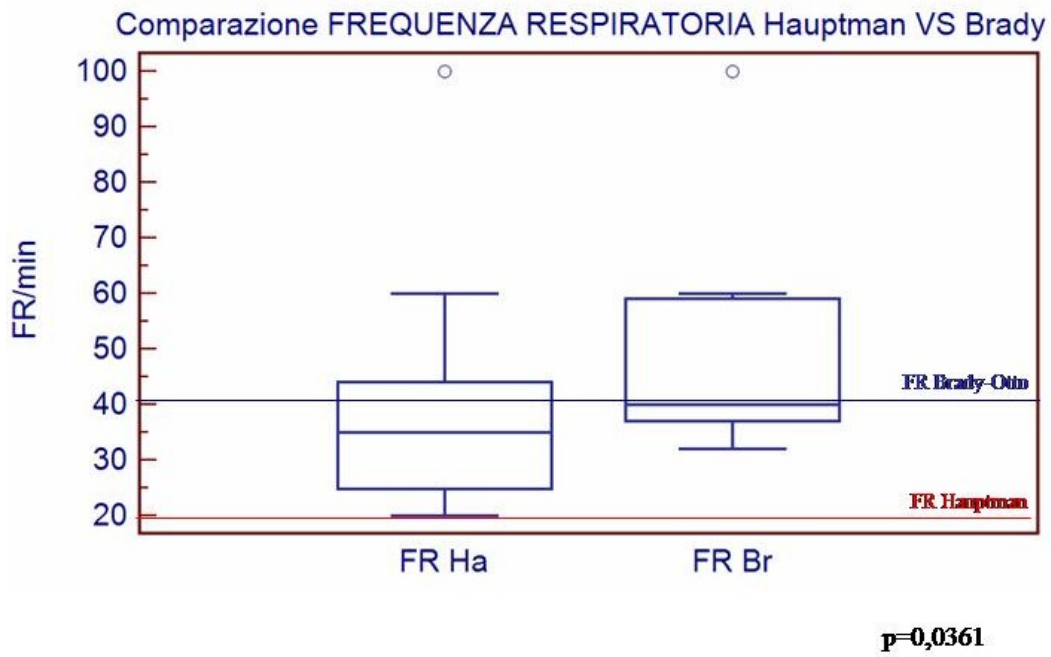


Fig. 6.21. Comparazione Frequenza Respiratoria Hauptman VS Brady-Otto.

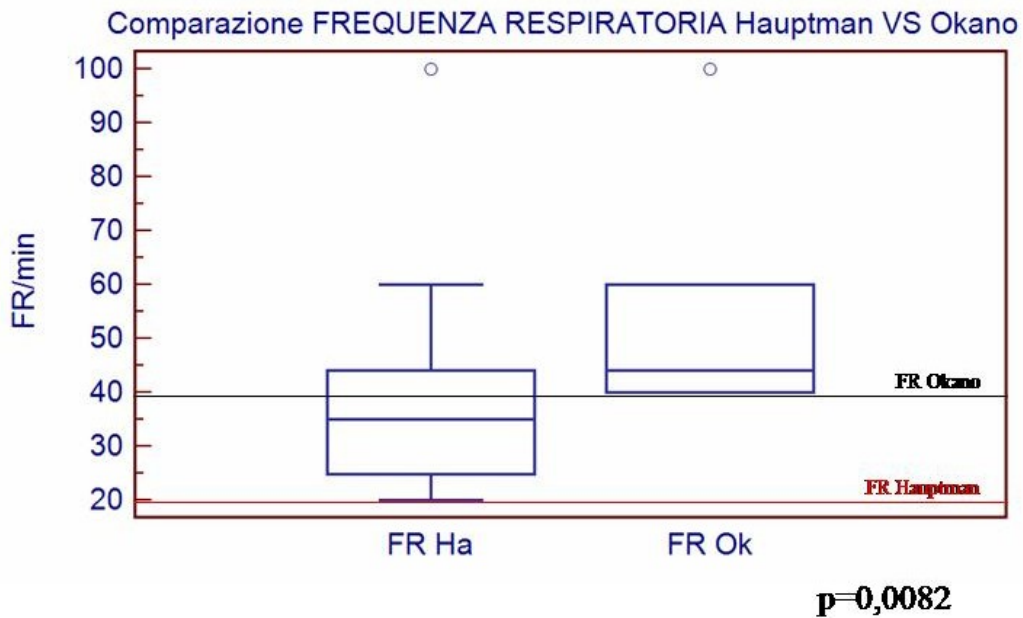


Fig. 6.22. Comparazione Frequenza Respiratoria Hauptman VS Okano.

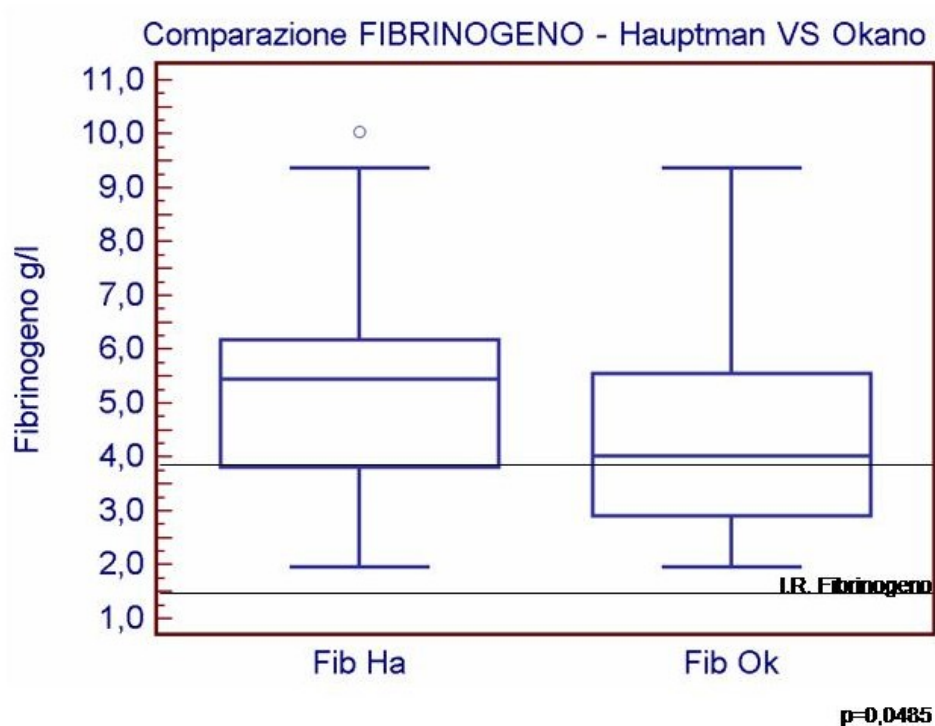


Fig. 6.23. Comparazione del Fibrinogeno tra il Gruppo Hauptman e il Gruppo Okano.

6.2 STUDIO DELLA POPOLAZIONE IN BASE AI *CUT OFF*

La seconda parte dello studio si realizzava stabilendo diversi *cut off* (in base al valore della mediana) per ogni variabile. Ad esempio, si è stabilito come *cut off* della CRP il valore di 7mg/dl, formandosi due gruppi: il **gruppo A** contenente i soggetti con una CRP<7mg/dl e il **gruppo B** quelli con una CRP>7mg/dl. I risultati statisticamente significativi, con una $p<0,05$, sono rappresentati nelle figure successive.

6.2.1 *CUT OFF* PROTEINA C REATTIVA

Iniziando dall'esame emocromocitometrico e per un *cut off* della CRP di 7, è emerso: che la comparazione tra i valori dell'ematocrito del Gruppo A con il Gruppo B è statisticamente significativa con una $p= 0,017$; la comparazione tra i valori

dell'emoglobina così come degli eritrociti di entrambi i gruppi sono anche loro statisticamente significativi, con una $p=0,0027$ per l'Hb e una $p=0,0005$ per il RBC.

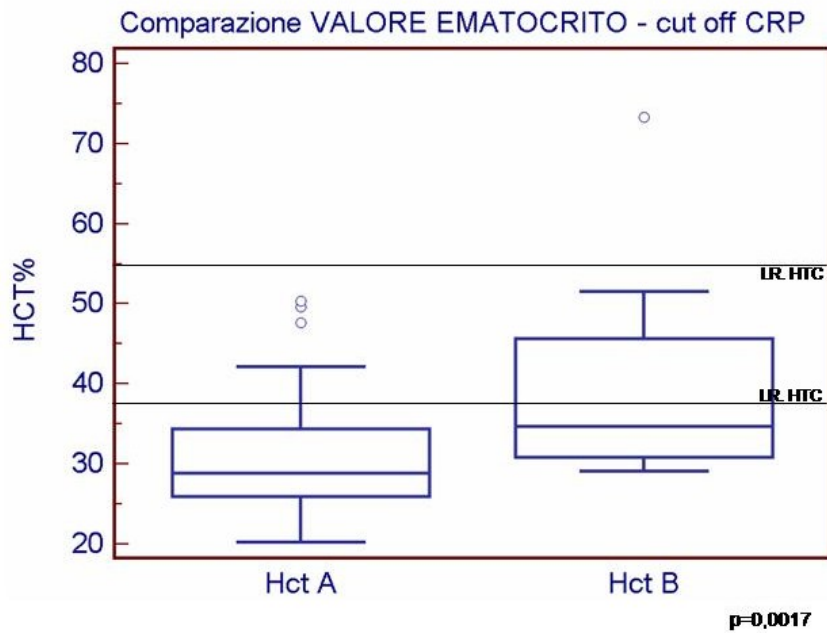


Fig.6.24. Comparazione del valore dell'ematocrito tra il Gruppo A e il B.

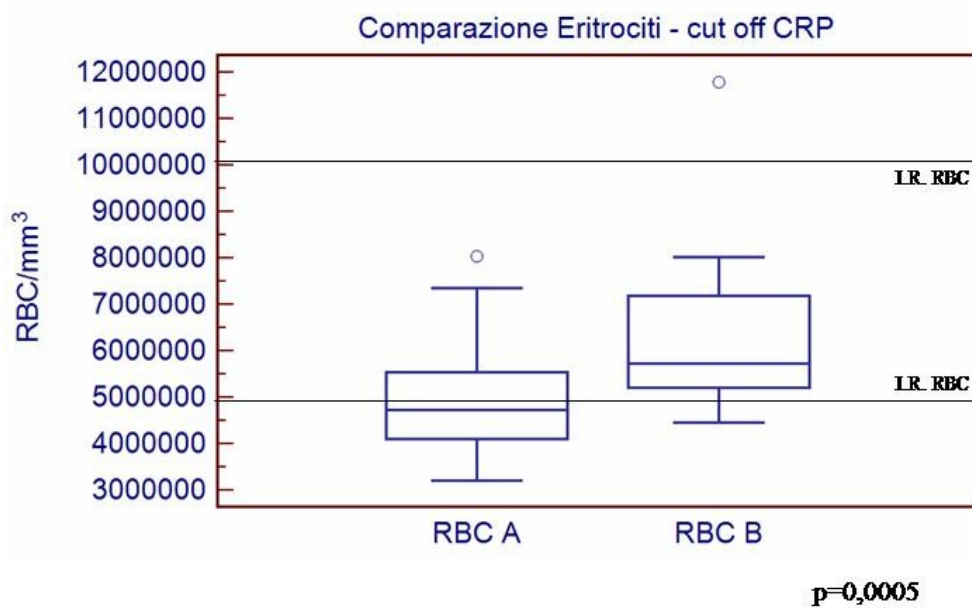


Fig 6.25. Comparazione del valore del RBC tra il Gruppo A e B.

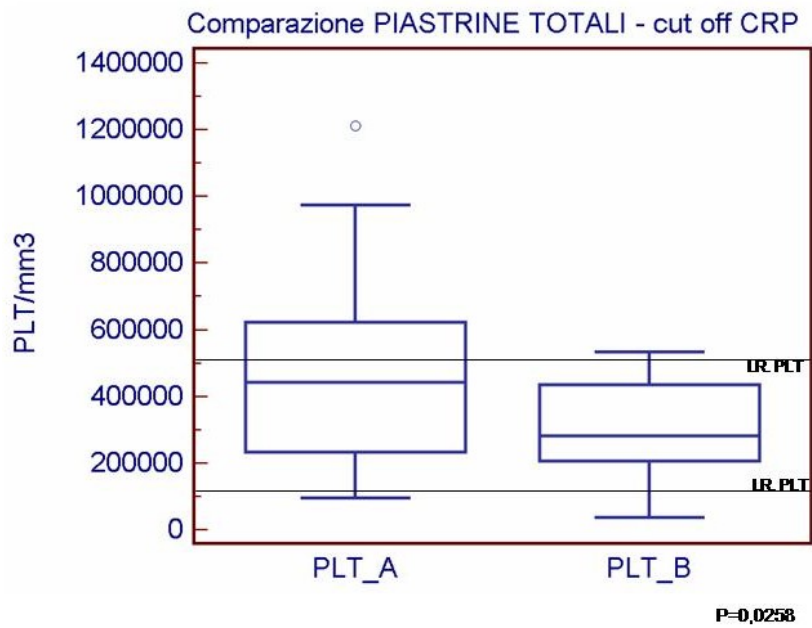


Fig.6.26. Comparazione delle piastrine totali tra il Gruppo A e il B.

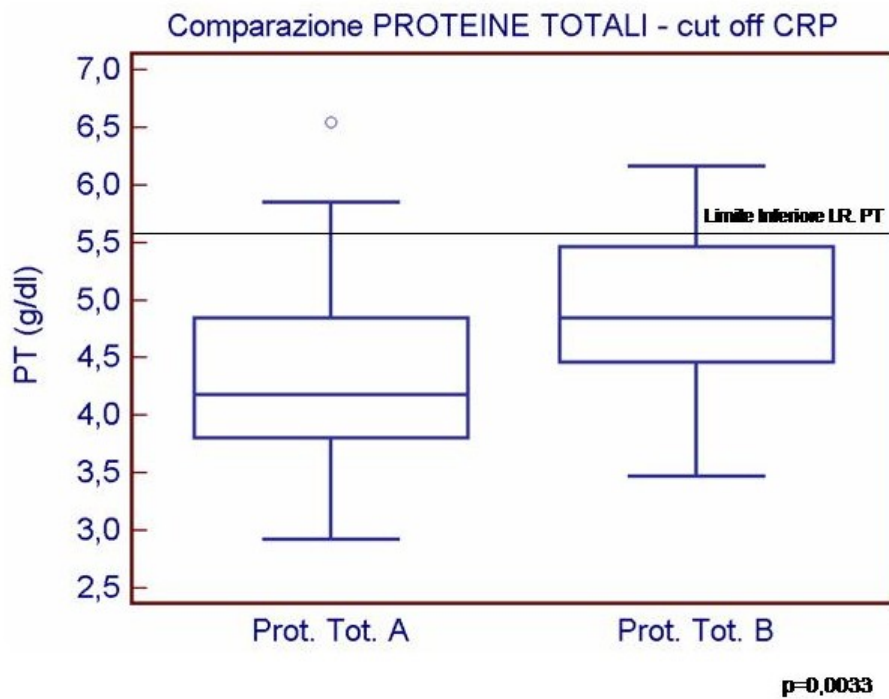


Fig 6.27. Comparazione del valore delle Proteine Totali tra i due gruppi.

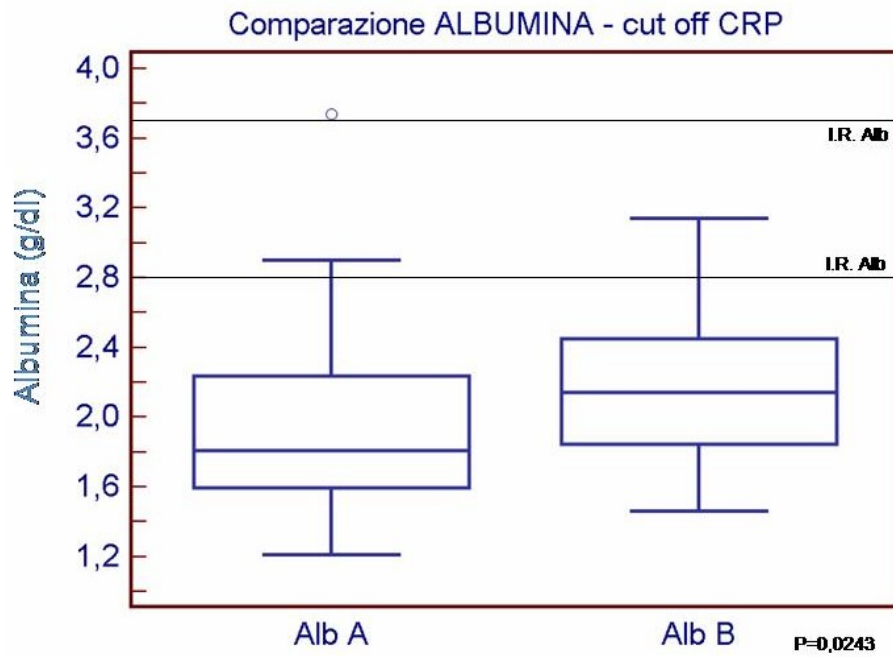


Fig. 6.28. Comparazione del valore dell'Albumina tra il Gruppo A e il B.

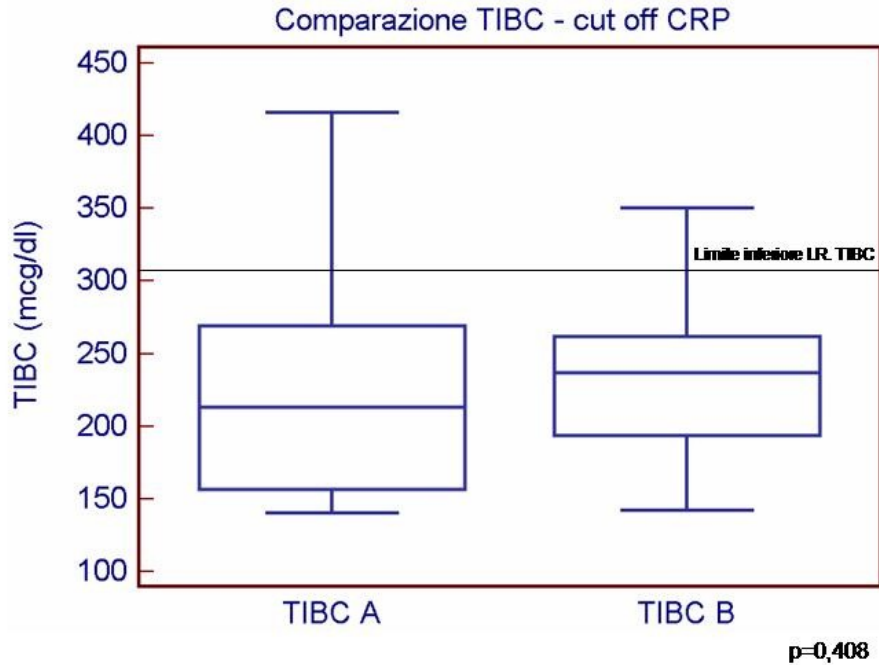


Fig.6.29. Comparazione del valore della TIBC fra i due gruppi.

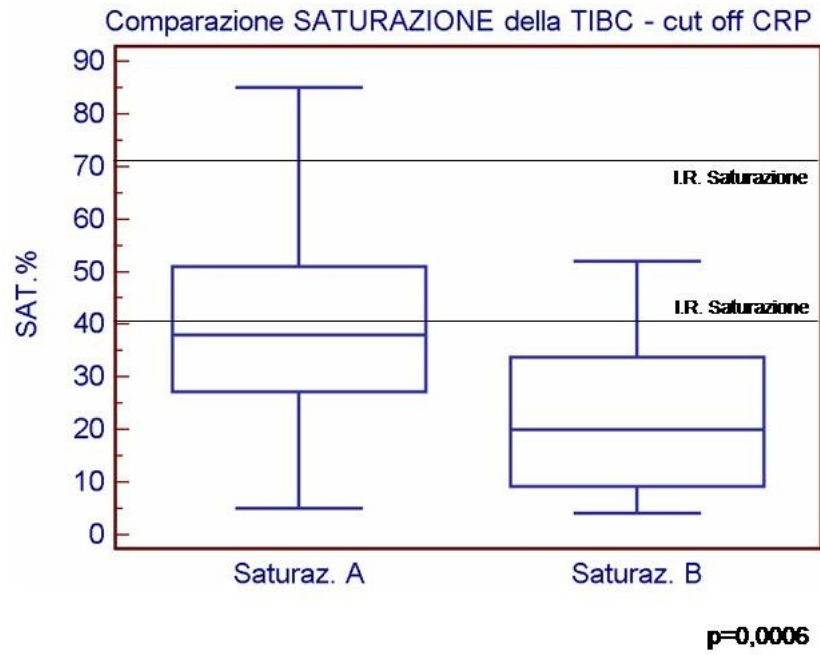


Fig. 6.30. Comparazione del valore della Saturazione della TIBC tra i due gruppi.

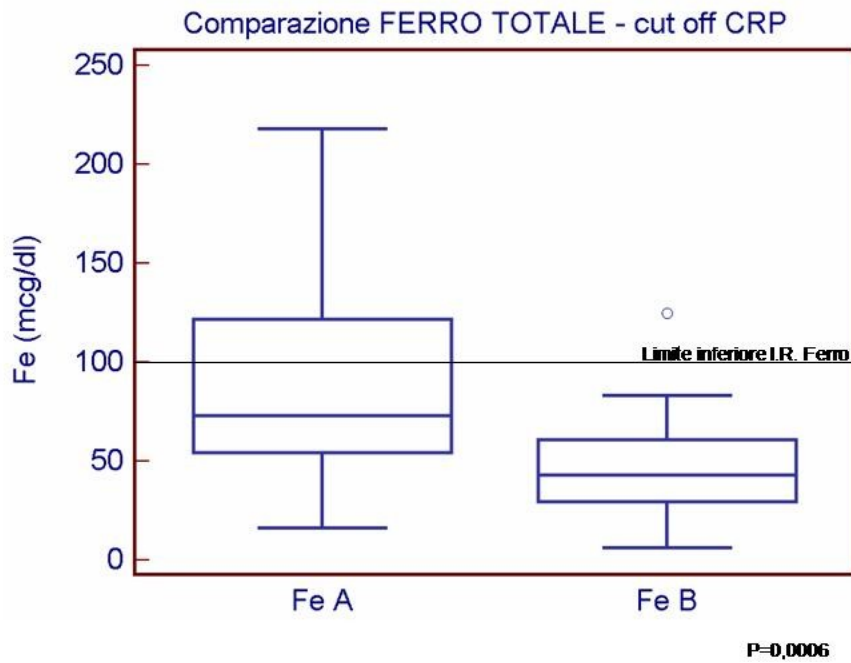


Fig. 6.31. Comparazione el valore del Ferro Totale tra il Gruppo A e il B.

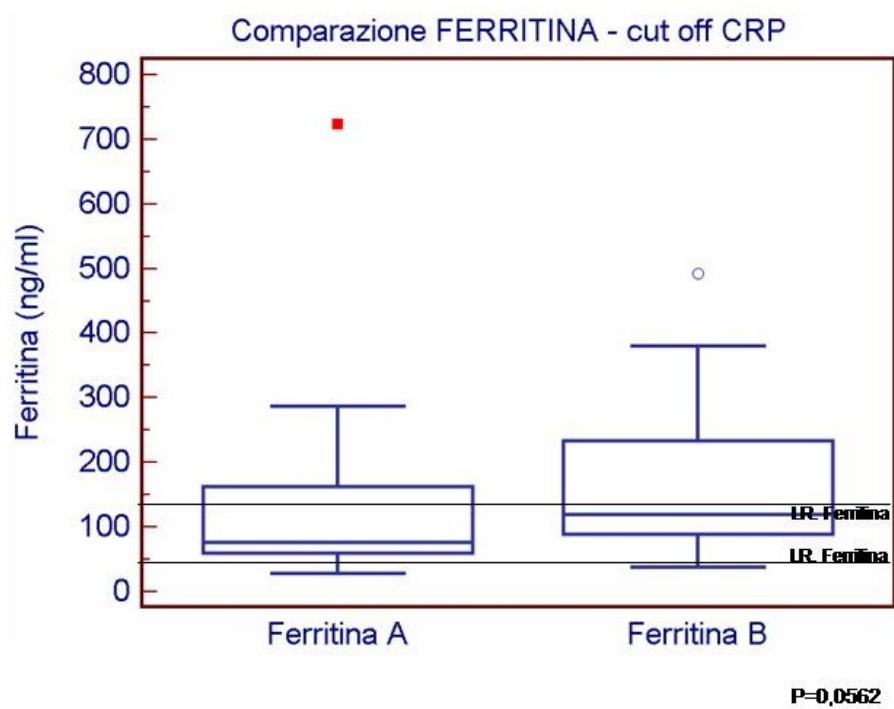


Fig. 6.32. Comparazione tra il valore della Ferritina del Gruppo A e del B.

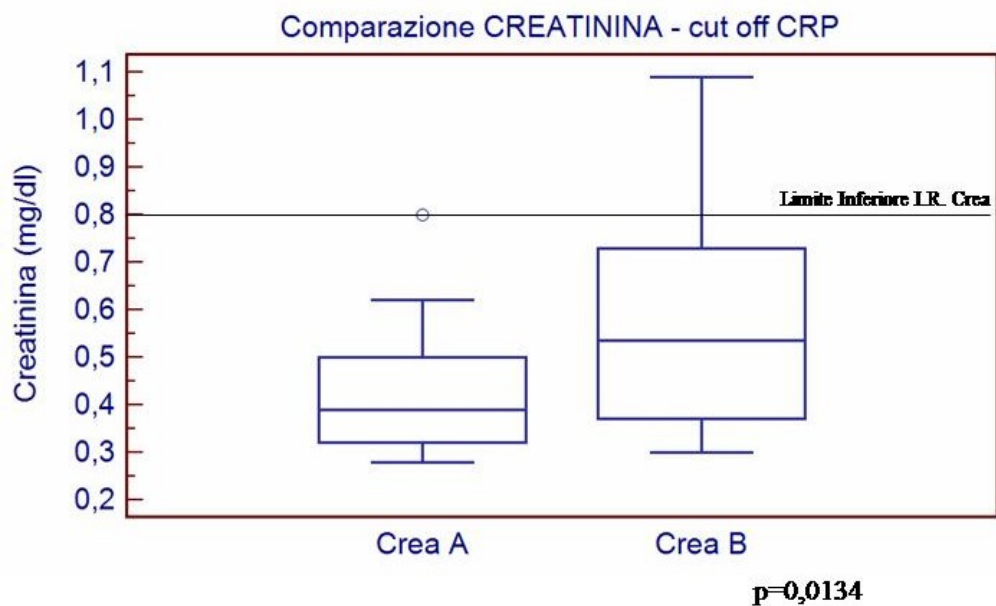


Fig. 6.33. Comparazione tra la Creatinina (0,8-1,9) tra il Gruppo A e il gruppo B.

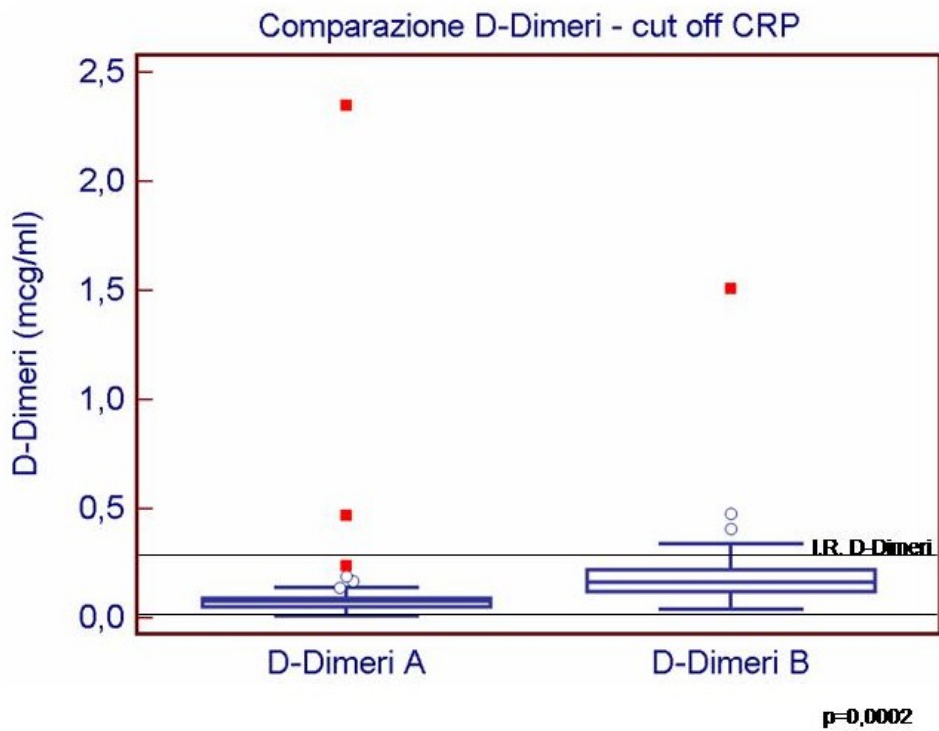


Fig. 6.34. Comparazione dei D-Dimeri del Gruppo A con il B.

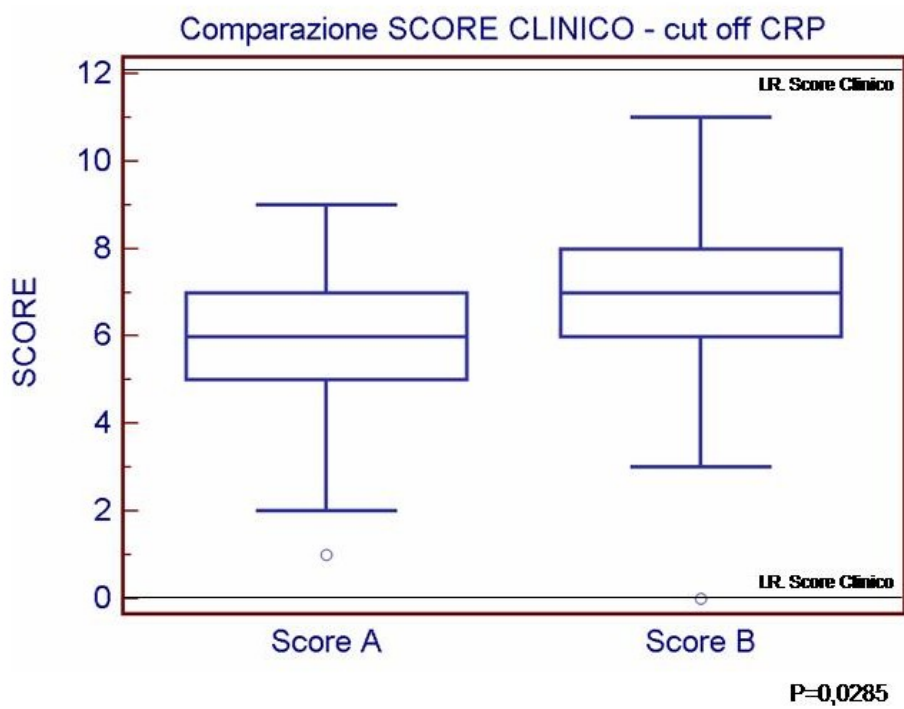


Fig. 6.35. Comparazione dello Score Clinico tra i due gruppi (Mediana Score=7).

6.2.2 CUT OFF ALBUMINA

Nello stesso modo, e ritenendo come *cut off* dell'Albumina il valore della mediana, si sono stabiliti due gruppi : **Gruppo A** integrato per i soggetti con un valore dell'ALB inferiore a 2 g/dl e **Gruppo B** costituito per i soggetti con un'ALB maggiore o uguale a 2 g/dl. Le valutazioni effettuate tra le diverse variabili si sono considerate significative quelle con una $p < 0,05$, al limite (*border line*) quelle con una $p = 0,05$ e, altamente significative, quelle con un $p < 0,0001$.

I risultati emersi riferiti all'ematocrito sono altamente significati, come si evidenzia nei grafici a seguire.

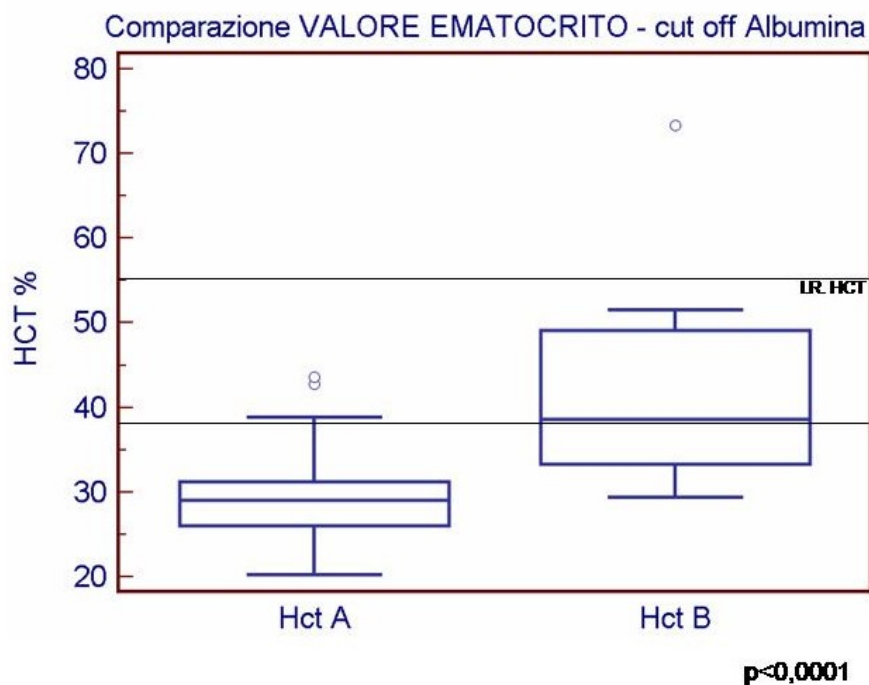


Fig. 6.36. Comparazione del valore dell'ematocrito tra il Gruppo A e il B.

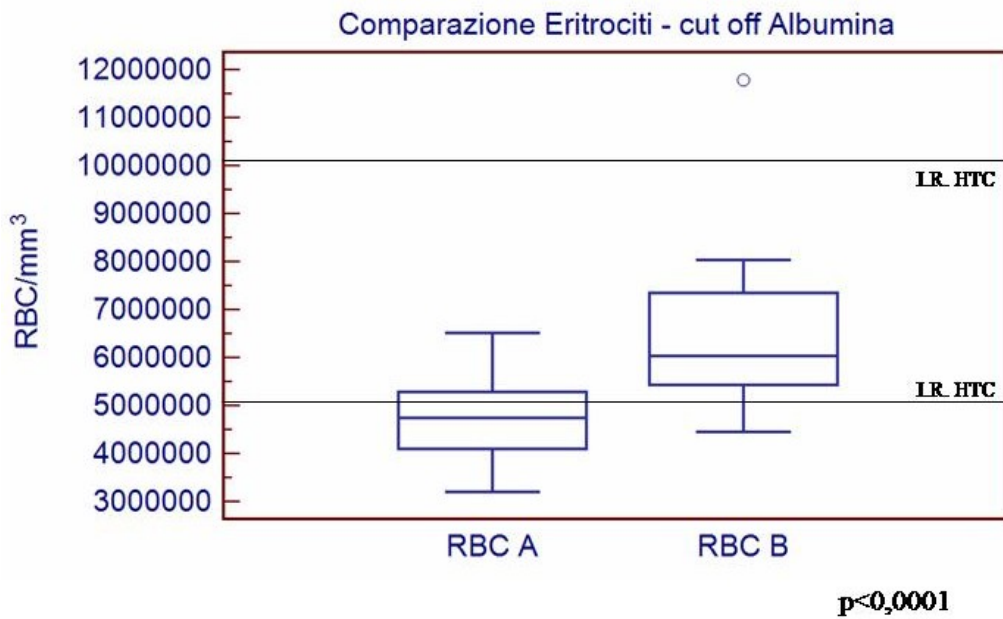


Fig.6.37. Comparazione del valore degli eritrociti (RBC) tra i due gruppi.

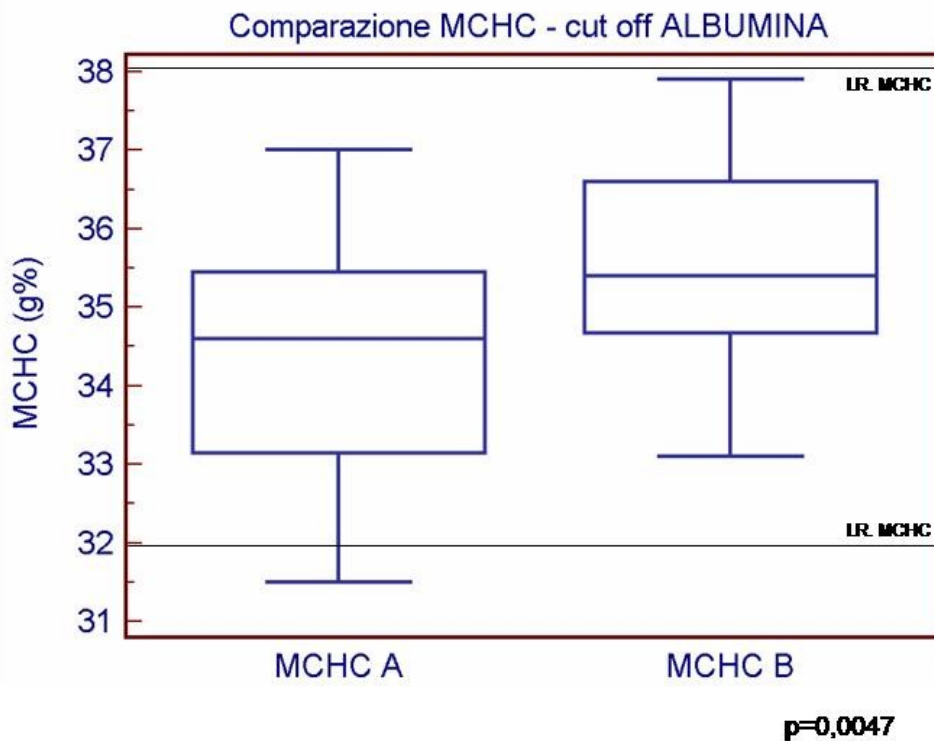


Fig. 6.38. Comparazione tra il valore del MCHC (Concentrazione corpuscolare media dell'emoglobina) tra il Gruppo A e il B.

Per quanto riguarda l'esame biochimico, i risultati statisticamente significativi sono rappresentati nelle figure successive.

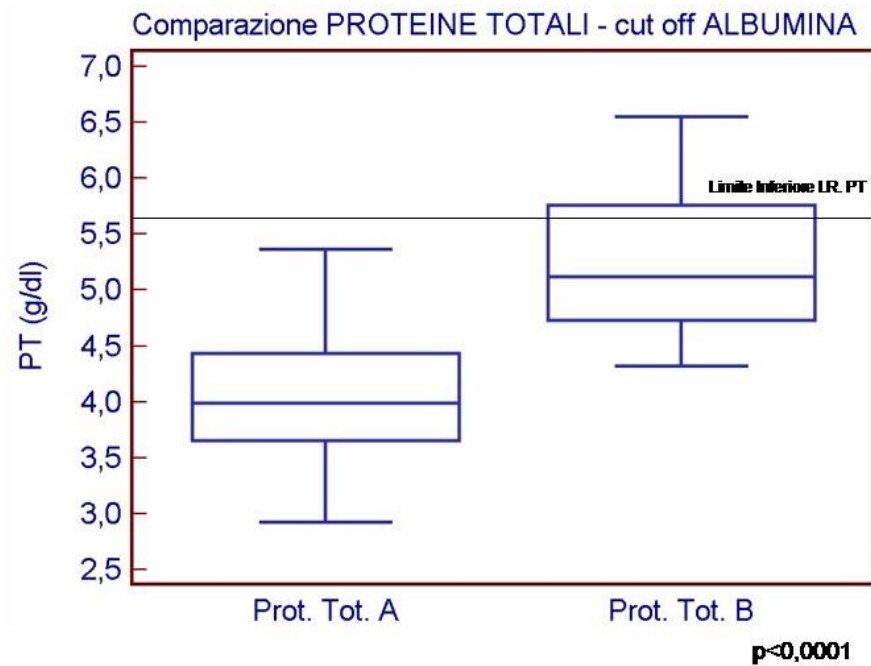


Fig. 6.39. Comparazione tra i valori delle Proteine Totali (PT) dei Gruppo A e B.

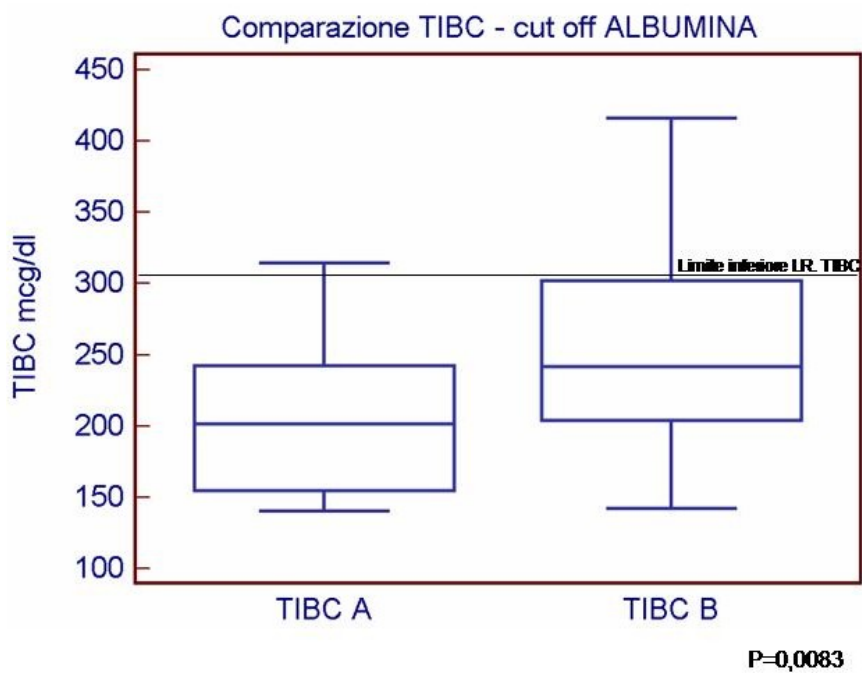


Fig. 6.40. Comparazione tra i valori della TIBC dei due gruppi.

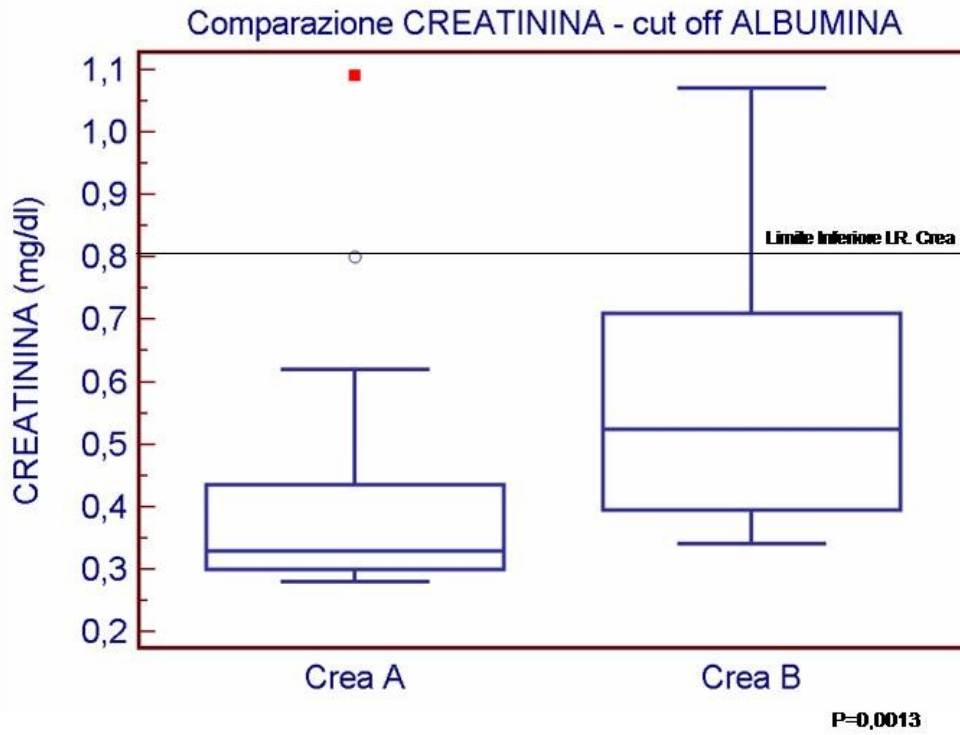


Fig.6.41. Comparazione del valore della Creatinina fra i due Gruppi.

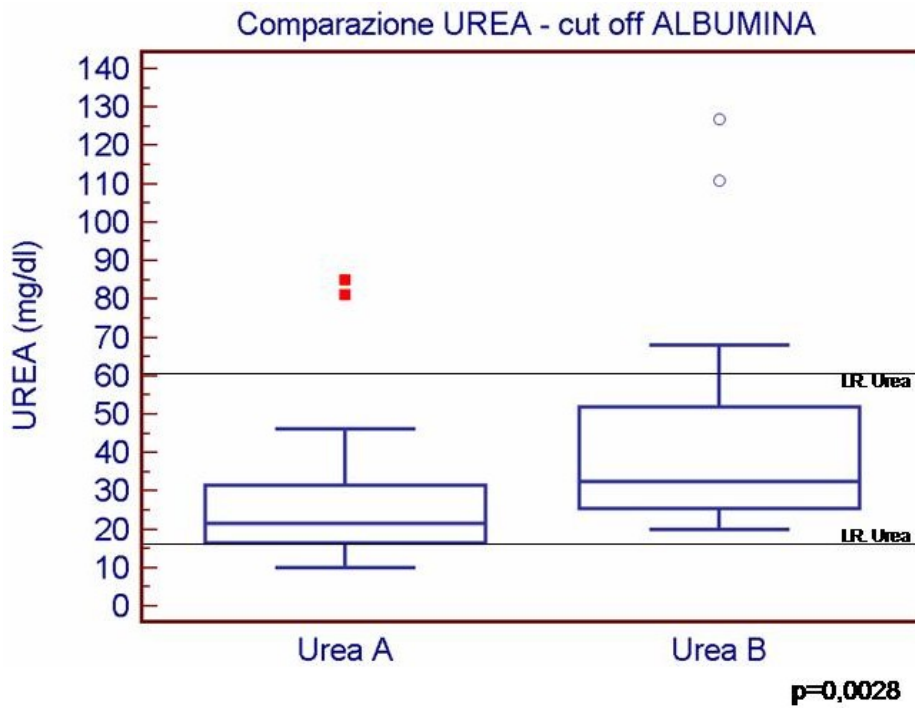


Fig 6.42. Comparazione del valore dell'Urea tra il Gruppo A e il B.

I risultati, statisticamente significativi, ottenuti dal profilo coagulativo sono mostrati nei diagrammi che seguono:

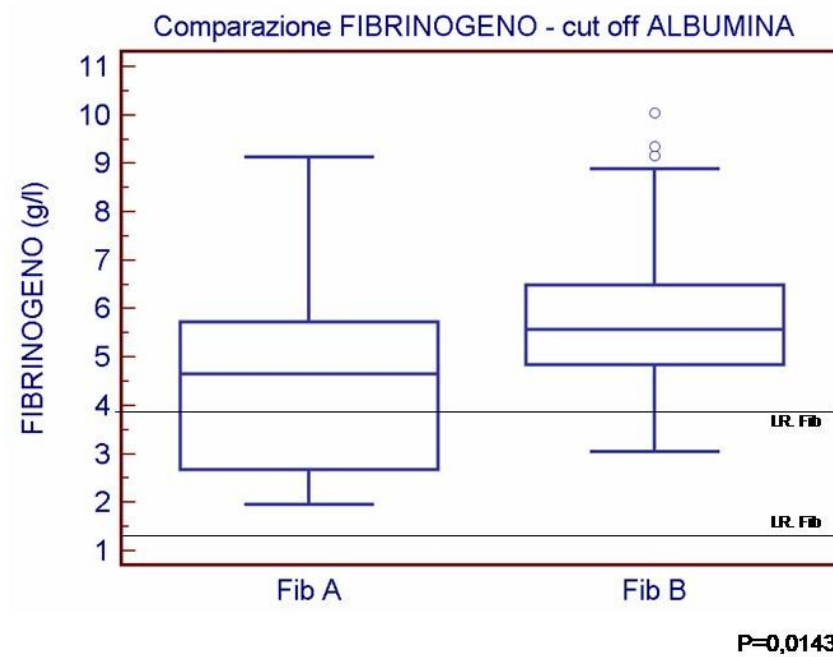


Fig.6.43. Comparazione del valore del Fibrinogeno tra il Gruppo A e B.

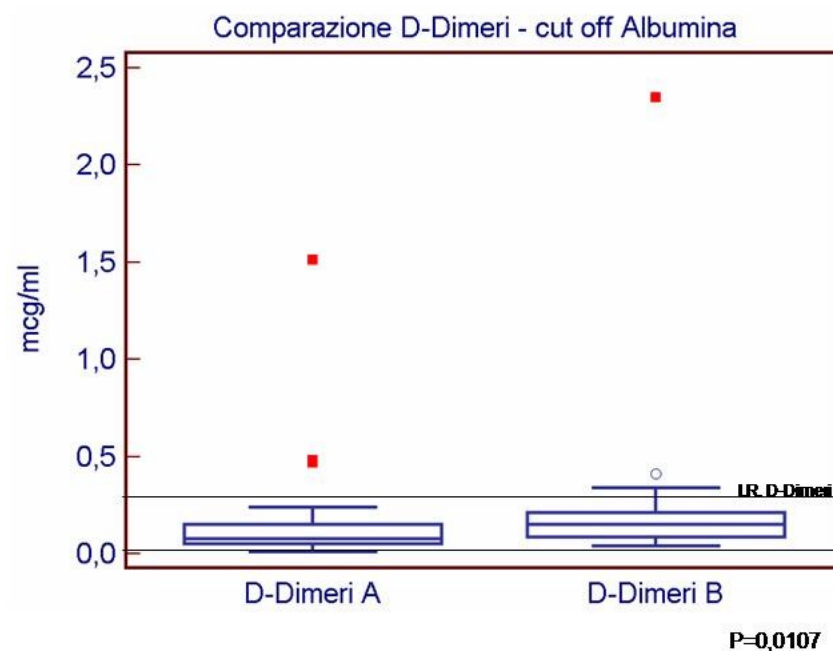


Fig.6.44. Comparazione del valore dei D-Dimeri fra i due gruppi.

6.2.3 CUT OFF SCORE CLINICO

I pazienti si sono suddivisi in due gruppi: il **Gruppo A** formato da tutti i soggetti con uno score clinico inferiore a 7 e il **Gruppo B** integrato per quelli con un punteggio clinico uguale o superiore a 7 (0-12; Mediana Score Clinico=7).

Nei diagrammi successivi si evidenziano i risultati statisticamente significati:

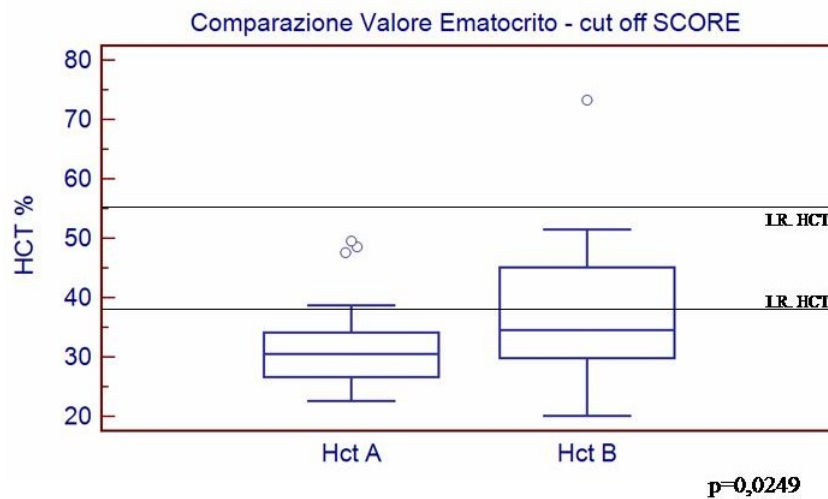


Fig. 6.45. Comparazione tra il valore dell'Ematocrito (HCT) fra il Gruppo A e il Gruppo B

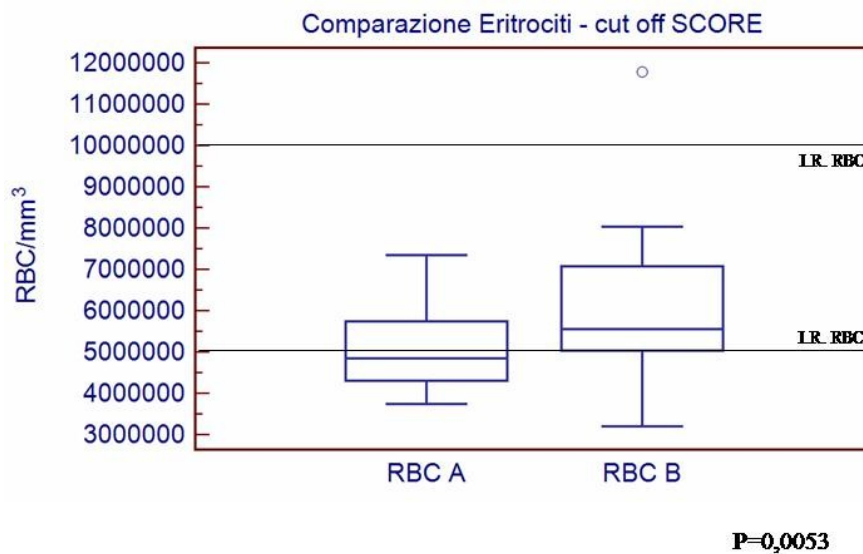


Fig. 6.46. Comparazione tra il valore degli Eritrociti (RBC) dei due gruppi.

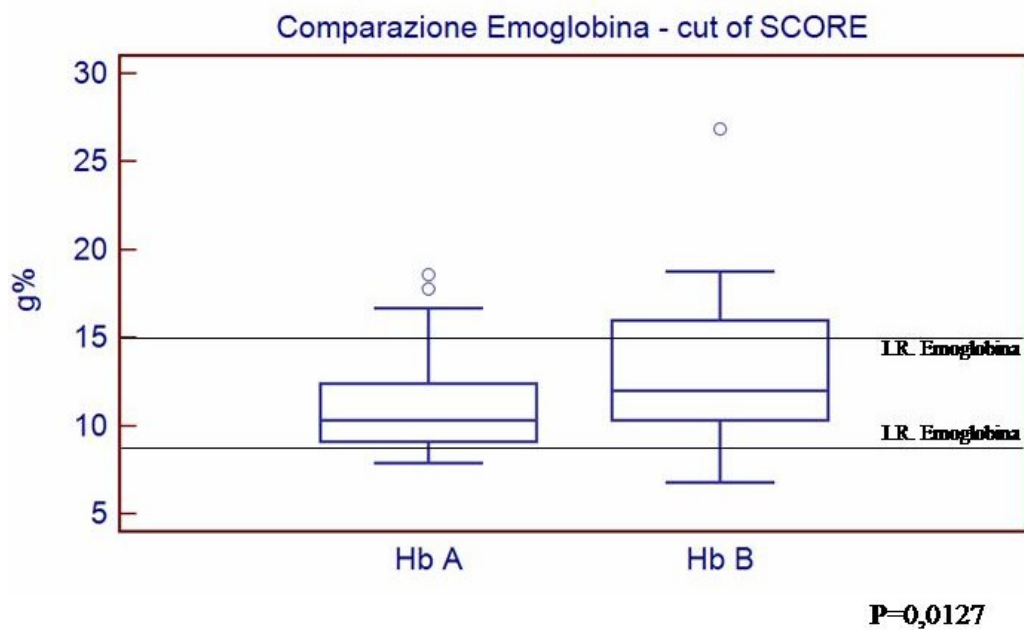


Fig. 6.47. Comparazione del valore dell'Emoglobina (Hb) fra i due gruppi.

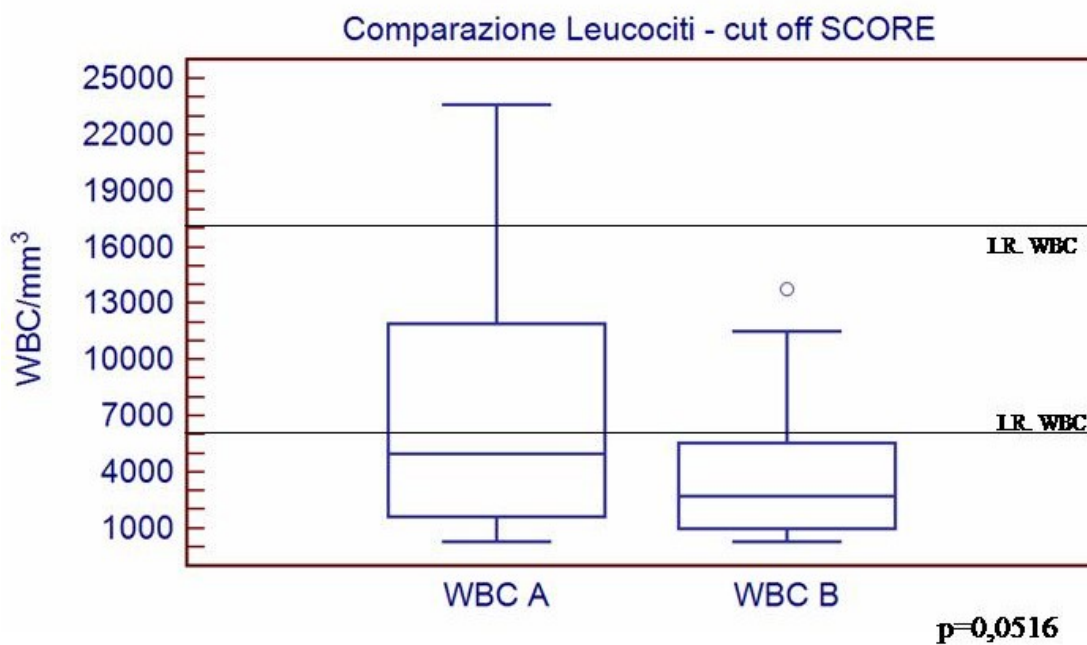


Fig. 6.48. Comparazione del valore del WBC (leucociti) in entrambi gruppi. Questa comparazione è al limite della significatività.

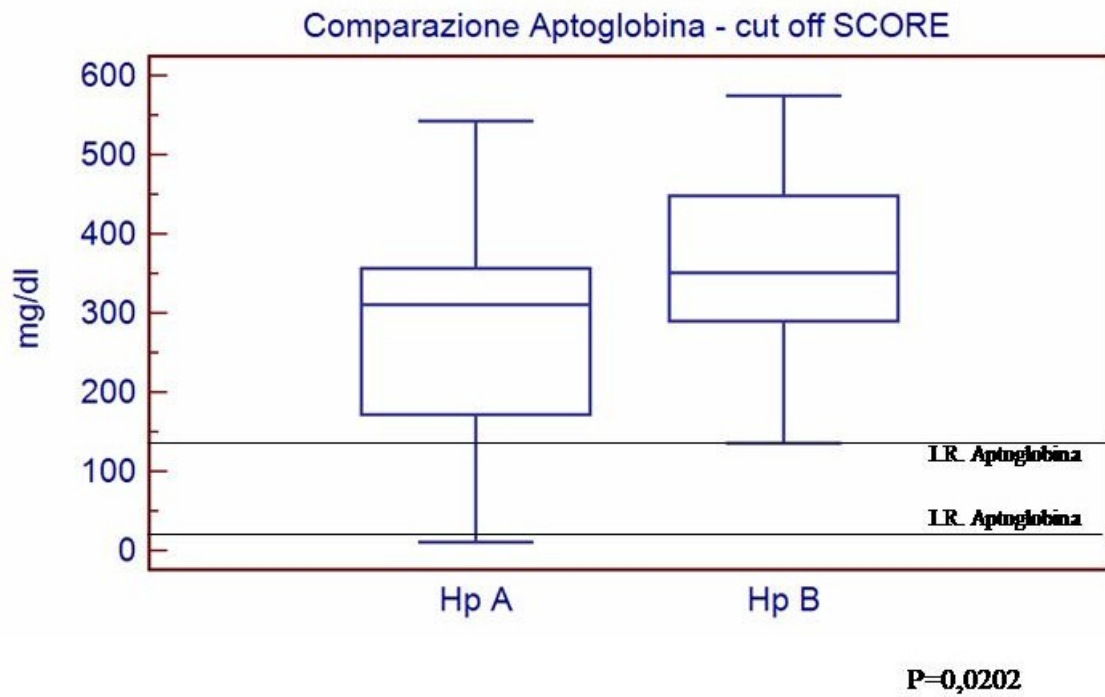


Fig. 6.49. Comparazione del valore dell'Aptoglobina tra il Gruppo A e il Gruppo B.

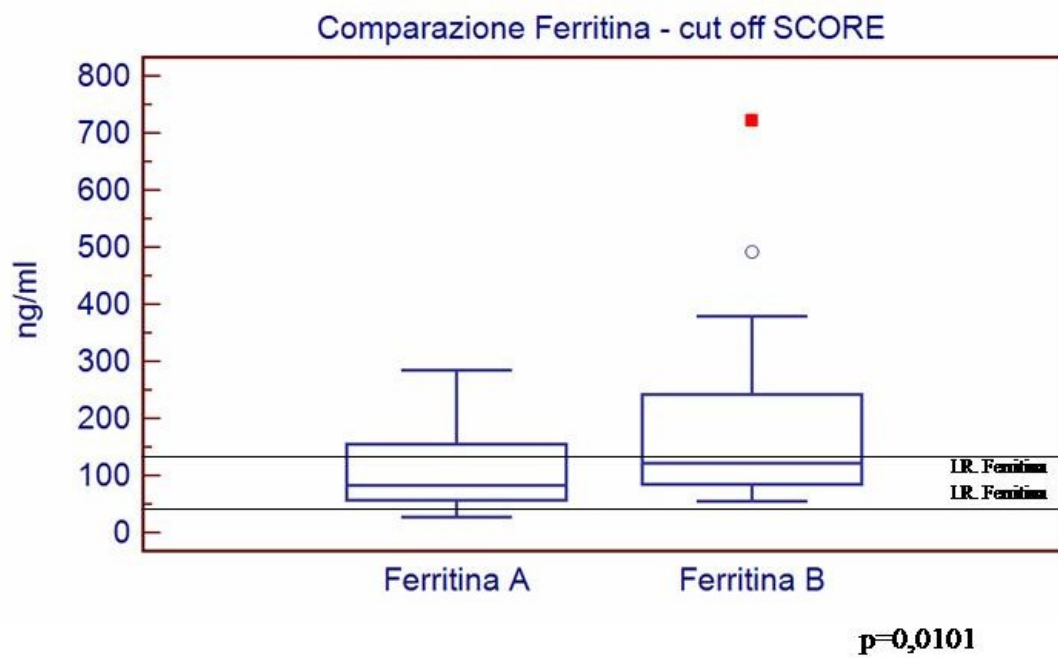


Fig. 6.50. Comparazione del valore della Ferritina del Gruppo A e del Gruppo B.

I risultati degli analisi delle APPs nel gruppo dei pazienti che sono morti si mostra nella tabella sottostante:

	CRP	APTO	TIBC	Ferro	ALB	Fib	Ferritina	
PARVO MORTI	Bali	5,29	325	167	70	1,61	2,6	174
	Sashimi	3,73	235	140	48	1,38	2,28	274
	Tempura	6,57	117	200	36	1,43	2,63	72
	Cino	9	266	259	125	1,87	4,1	380
	Primo	6,32	351	144	73	1,81	NO PC	723
	Jock	6,76	344	146	40	1,21	3,72	193
	Cora	0,69	215	198	58	1,29	1,95	61
	Mina2	7,22	226	193	82	1,46	2,65	309
	Clio	8,08	310	293	60	0,9	NO PC	380
	I.R.	0-0,5	20-140	306-469	99-309	2,8-3,7	1,45-3,85	41-136
Mediana	6,57	266	193	60	1,43	2,65	274	

Tab. 6.4. Valori delle APPs dei pazienti che sono morti: CRP (Proteina C Reattiva in mg/dl, APTO (Aptoglobina in mg/dl), TIBC (Total Iron Bounding Concentration in μ /dl), ALB (Albumina in g/dl), Fib (Fibrinogeno in g/dl) e la Ferritina (in ng/dl).

	CRP	APTO	TIBC	FERRO	ALB	FIB.	FERRITINA
Mediana PARVO	7	335	216	59	2,09	5,16	103

Tab. 6.5. Valori mediani delle APPs misurate nella popolazione totale di parovoviroici

CAPITOLO VII

DISCUSSIONE

7 DISCUSSIONE

L'inflammation è un meccanismo di difesa innato che avviene in seguito ad un danno cellulare o tissutale. Quando la causa scatenante non riesce ad essere eliminata, si può andare incontro ad una reazione infiammatoria esuberante, responsabile di una sindrome clinica definita come Sindrome di Risposta Infiammatoria Sistemica o SIRS. La progressione di tale sindrome può portare alla compromissione funzionale di diversi organi esitando nella sindrome di disfunzione multiorganica (MODS), in cui l'omeostasi non può essere ristabilita senza intervento. Quando la SIRS si verifica in seguito ad un'infezione viene definita come Sepsis. (Bone et al., 1992). La sepsi rappresenta una delle principali cause di morte nelle unità di terapia intensiva non coronariche moderne (Niederman e Fein, 1990), sia in Medicina Umana che in Medicina Veterinaria. Attualmente, l'unico strumento efficace per migliorare la prognosi di questi pazienti è l'impostazione di un intervento terapeutico tempestivo ed aggressivo. Tuttavia, la parziale conoscenza dei meccanismi patogenetici di tale sindrome, unita alla mancanza di un gold standard diagnostico, rende molto complessa un'identificazione precoce della stessa. In occasione della International Sepsis Definitions Conference, venne raccomandato l'utilizzo di biomarker come strumento diagnostico ausiliare nel riconoscimento e nel monitoraggio della sindrome settica (Levy et al., 2003).

In Medicina Veterinaria sono stati proposti alcuni criteri per la caratterizzazione della SIRS nel cane e nel gatto, basati su variabili cliniche come la temperatura corporea, la frequenza cardiaca e respiratoria e la conta leucocitaria. Tuttavia, un limite di questi criteri, come evidenziato anche in Medicina Umana, è rappresentato dalla scarsa sensibilità ed specificità. (Hauptman et al., 1997, Brady e Otto, 2001; Okano et al., 2002). D'altro canto, la misurazione delle concentrazioni sieriche delle proteine di fase acuta (APPs) come marker di flogosi, si sta sempre più diffondendo nelle specie

d'interesse veterinario ed un loro utilizzo nella stadiazione della SIRS è supportato da questi rilievi (Eckersall, 2000).

La Parvovirosi canina è una gastroenterite virale molto grave che colpisce generalmente i cuccioli tra le 6 settimane ed i 6 mesi d'età e, in assenza di trattamento, può raggiungere un tasso di mortalità del 91% (Otto et al., 1997; Prittie, 2004). La marcata leucopenia e la traslocazione batterica a livello intestinale che caratterizzano questa malattia, la rendono un modello di studio ideale di sepsi ad insorgenza spontanea.

In questo lavoro sperimentale, è stata presa in esame una popolazione di 62 soggetti affetti da Parvovirosi canina. Per quanto riguarda il sesso, non è stata riscontrata una differenza significativa tra la percentuale di maschi e di femmine colpite. In relazione allo stato vaccinale della nostra popolazione, l'87% dei soggetti presentava una copertura vaccinale nei confronti del parvovirus assente, incompleta o dubbia. In aggiunta, il 75% della popolazione proveniva da un canile municipale, concordando con la letteratura, che ritiene come fattore di rischio i luoghi affollati (Prittie, 2004). Per quanto concerne la razza, il 64,5% dei soggetti erano meticci; la razza più colpita è risultata il Rottweiler con una rappresentazione del 13%. Questo dato conferma ciò che viene riportato in Bibliografia, che la considera come una delle razze a maggior rischio (Glickman et al., 1985; Brunner e Swango, 1985). L'elevato tasso di cani meticci in questa popolazione potrebbe essere condizionato dalla prevalenza di soggetti provenienti da canili. In un lavoro eseguito da Houston e colleghi (1996), i mesi di luglio e settembre erano riportati come quelli con maggiore incidenza di casi di Parvovirosi (Houston et al., 1996). Nella popolazione oggetto di questo studio, inclusa nel periodo gennaio 2007-dicembre 2009, abbiamo trovato contrariamente, una maggiore incidenza nei mesi invernali di dicembre e gennaio.

Per definire un indice di gravità della patologia in atto è stato utilizzato uno Score Clinico, già riportato in Letteratura da diversi Autori per questa malattia (Mohr et al., 2003; Savigni e Macintire, 2010). Valutando la sua distribuzione, si è visto che la maggioranza della popolazione è compresa tra un punteggio di 6-9, con un valore della mediana di 7.

Nel Gruppo 1 o PARVO, (costituito per 58 soggetti parvovirofici che avevano a disposizione: campioni di siero e di plasma citrato stoccati, ed un esame emocromocitometrico) è stata studiata la distribuzione di tutte le variabili emato-biochimiche analizzate. Iniziando dall'esame emocromocitometrico abbiamo riscontrato che:

- La distribuzione del valore del WBC della popolazione è significativamente al di sotto dell'intervallo di riferimento (I.R.), dovuto a una azione diretta del virus sul midollo osseo;
- Per quanto riguarda l'Ematocrito (Hct), ha un valore mediano di concentrazione di 32,6 che è inferiore al valore inferiore dell'I.R.; mentre i valori della mediana del'MCV e dell'MCHC sono risultati normali. Dobbiamo tenere in conto che la nostra popolazione, è integrata fundamentalmente da cuccioli che, in condizioni fisiologiche, hanno un valore dell'Hct inferiore agli adulti. D'altra parte, bisogna considerare una componente di emoconcentrazione in molti di questi soggetti, che presentavano una sintomatologia gastroenterica da moderata a grave. La presenza di un Hct basso e di valori di MCV e MCHC nella norma, evidenzia uno stato di anemia normocromica, normocitica, potenzialmente compatibile con una condizione di anemia infiammatoria.

In relazione al profilo biochimico, la distribuzione dei valori delle concentrazioni plasmatiche delle Proteine totali e dell'Albumina è risultata al di sotto dell'I.R. Questo risultato è spiegabile, in parte, perché nei cuccioli sani questi valori sono, di per sè, inferiori ai valori riscontrati negli adulti, ma in più, bisogna considerare la grave perdita proteica dal tratto gastroenterico, tipica di questa forma virale. Dunque, i valori delle concentrazioni di Ematocrito, Proteine Totali e Albumine all'ammissione, vanno sempre interpretati alla luce di una possibile emoconcentrazione, che potrebbe quindi mascherare uno stato di anemia ed ipoprotidemia. In aggiunta, va inoltre considerato che la concentrazione sierica di albumina potrebbe essere influenzata dalle sue caratteristiche di proteina di fase acuta negativa. In linea con il comportamento di quest'ultima, la Transferrina, come APP negativa, ha mostrato una distribuzione della

concentrazione sierica al di sotto dell'I.R. Per quanto riguarda i livelli plasmatici dell'Antitrombina, i bassi valori riscontrati sono sicuramente riferibili alla perdita gastrointestinale, ma non si può escludere un consumo della stessa per la presenza di uno stato di ipercoagulabilità, già riscontrato nei cani colpiti da parvovirus (Otto et al., 2000).

Per quanto riguarda le APPs positive, abbiamo riscontrato che la distribuzione della concentrazione sierica della Ferritina è poco più al di sopra della mediana, mentre la distribuzione dei valori dell'Aptoglobina, della Proteina C-Reattiva e del Fibrinogeno si trovano al di sopra dei valori rispettivi delle loro mediane, dati che confermano ed avvalorano la presenza di una risposta infiammatoria sistemica in corso di Parvovirosi.

Correlando le diverse variabili biochimiche tra di loro abbiamo riscontrato statisticamente significativi i seguenti risultati:

- Correlazione positiva tra l'Albumina e il Fibrinogeno: Nei soggetti deceduti si è riscontrata una concentrazione sierica di Albumina inferiore rispetto a quella riscontrata nei sopravvissuti, per cui, un basso livello sierico di Albumina è un indicatore prognostico negativo. Il significato dei valori di Albumina riscontrati possono essere imputati, in primo luogo, alla perdita intestinale, in linea anche con la prevalente panipoprotidemia presente in questi soggetti. Non si può escludere, tuttavia, una componente infiammatoria che abbia contribuito ad una diminuzione dei livelli sierici di Albumina, in quanto APP negativa. Risulta interessante il riscontro di una correlazione positiva di quest'ultima con i valori di Fibrinogeno, che è una APP positiva. Una riduzione dei livelli plasmatici di esso, risultata significativa nei soggetti deceduti, potrebbe essere indice di consumo conseguente ad uno stato di ipercoagulabilità, che è già stato riportato in cani affetti da parvovirosi (Otto et al., 2000).
- Assenza di correlazione tra i leucociti (WBC) e la CRP: la conta leucocitaria nella fase iniziale di parvovirosi non può essere utilizzata come indice di flogosi, a causa dell'azione che il virus esercita sul midollo osseo; il dato riscontrato di

una mancanza di correlazione tra WBC e CRP conferma la scarsa utilità dei primi nel monitoraggio della risposta infiammatoria in corso di parvoviroosi.

- Correlazione tendenzialmente positiva tra la CRP e la Ferritina: il fatto che la Ferritina (APP positiva) segua un andamento simile alla CRP in corso di SIRS, supporta l'esecuzione di ulteriori studi per valutare il suo ruolo come potenziale marker di flogosi nel cane.

In un secondo momento, il Gruppo 1 si è suddiviso in 3 sottogruppi in base ai criteri SIRS stabiliti per il cane: **Gruppo Ha** o **Hauptman**, **Gruppo Br** o **Brady-Otto** e **Gruppo Ok** o **Okano**. La suddivisione della popolazione in base ai suddetti gruppi aveva l'obiettivo di verificare se l'utilizzo di criteri di inclusione più restrittivi consentisse di selezionare soggetti con una risposta di fase acuta più evidente, tramite la valutazione degli indicatori clinici e biochimici utilizzati nello studio in oggetto. Tuttavia, una limitazione di questa analisi risiede nel fatto che, riguardo i criteri d'inclusione nei 3 gruppi, sono risultati statisticamente significativi ($p < 0,05$) solamente la frequenza cardiaca del Gruppo Ha con il Gruppo Ok e la frequenza respiratoria (FR) tra Gruppo Ha e Br, e tra Gruppo Ha e O. Questo dato emerge, di conseguenza, nell'analisi dei risultati, in cui tra le variabili infiammatorie considerate, solo il Fibrinogeno ha mostrato una differenza significativa tra il Gruppo Ha e il Gruppo Ok. Come APP positiva, esso è risultato più elevato nei pazienti del Gruppo Ok, che presentano i criteri d'inclusione più restrittivi e potrebbero testimoniare una risposta infiammatoria più grave.

Un'altra analisi dei risultati ottenuti dalla popolazione di studio è stata effettuata stabilendo dei cut off per le diverse variabili misurate. Per lo Score Clinico è stato definito un cut off di 7, pari al valore mediano della popolazione, da cui: Gruppo A comprendente i pazienti con uno score clinico inferiore a 7 e Gruppo B con score clinico maggiore o uguale a 7. Dalla comparazione delle variabili cliniche e biochimiche all'interno dei due gruppi sono risultati significativi:

- I valori di ematocrito, eritrociti ed emoglobina si sono rilevati più elevati nei pazienti del gruppo B: questo porterebbe a considerare la presenza di una

maggior emoconcentrazione in questo gruppo, che in linea con lo *score* clinico sarebbe indice di una sintomatologia più grave, in termini di perdita di volume plasmatico.

- Altri dati che avvalorano l'utilizzo di questo *score* clinico come indice di gravità della sintomatologia sono rappresentati dal riscontro del valore dei leucociti totali, che è risultato significativamente più basso nel gruppo B e, per quanto riguarda le APPs, dalle concentrazioni di Aptoglobina e Ferritina significativamente più elevate nel gruppo B.

Anche per il ***cut off della CRP*** è stato definito un *cut off* di 7, pari al valore mediano della popolazione, formando, di conseguenza, un Gruppo A comprendente soggetti con valori della concentrazione di CRP minore di 7 mg/dl, e il Gruppo B con valori della concentrazione di CRP maggiore o uguale a 7 mg/dl. I risultati statisticamente significativi sono stati:

- Il valore dell'Ematocrito degli Eritrociti e dell'Emoglobina, così come la concentrazione di Proteine totali, Albumina e creatinina sono risultati più elevati nei soggetti del Gruppo B. Questo reperto conferma la presenza di uno stato di emoconcentrazione, che sembrerebbe essere indice di maggiore gravità della sintomatologia di questi soggetti all'ammissione. Questo risultato è compatibile quindi con uno stato di shock ipovolemico, che fa parte normalmente del quadro clinico presentato dai pazienti parvovirofici con sintomatologia più grave. Il dato della concentrazione di CRP va sicuramente interpretato alla luce di una condizione di emoconcentrazione, tuttavia, i valori riscontrati in questa popolazione possono confermare la presenza concomitante di una flogosi in questi soggetti. Certamente, il valore prognostico della CRP, come della maggior parte dei marker infiammatori, acquisisce senz'altro maggior rilievo nell'ambito di un monitoraggio seriale, più che in una valutazione puntiforme.
- Premesso che i cuccioli sono più sensibili alla carenza di ferro, i valori significativamente più bassi della Saturazione della TIBC e del Ferro totale,

accompagnati da valori di TIBC tendenzialmente più elevati nel gruppo B, potrebbero essere compatibili con una carenza di ferro nel gruppo con sintomatologia più grave. Questa carenza relativa o assoluta di ferro potrebbe essere legata al sequestro all'interno dei macrofagi, come avviene in condizione di flogosi, e/o alla perdita tramite il tratto gastroenterico.

- I valori di concentrazione sierica di Ferritina, significativamente più elevati nel gruppo B, sembrano invece riflettere più un comportamento di questa proteina come APP positiva, e data la mancanza di studi specifici in Medicina Veterinaria, ne supportano ulteriormente l'utilizzo per tale finalità.
- Il valore dei D-dimeri più elevato nel gruppo con la CRP maggiore o uguale a 7, potrebbe indicare la presenza di un processo infiammatorio più imponente nel gruppo B, in cui è presente uno stato di aumentata fibrinolisi; tuttavia, la mancanza di una valutazione più completa dell'asse coagulativo impedisce di trarre delle conclusioni a riguardo.

Imponendo come *cut off* il valore della mediana della **Albumina**, abbiamo stabilito come Gruppo A quei soggetti con un valore dell'Albumina minore di 2 g/dl mentre il gruppo B quelli con valori uguali o superiori a 2 g/dl. Questo valore di cut off riveste inoltre un significato biologico, in quanto viene anche riportato in letteratura come limite al di sotto del quale può essere raccomandato l'utilizzo di emoderivati o sostituti del plasma:

- Il valore dell'Ematocrito degli Eritrociti, così come la concentrazione sierica di Proteine totali, Creatinina e Urea sono risultate più elevate, in maniera altamente significativa, nel gruppo B, confermando l'ipotesi che una componente di emoconcentrazione sia rilevante in questa popolazione.
- I valori di concentrazione della TIBC sembrano ugualmente risentire dell'emoconcentrazione risultando significativamente più elevati nel gruppo B.
- I valori di concentrazione del Fibrinogeno, APP positiva, si mostrano significativamente più elevati nel gruppo B e comunque mediamente superiori

agli intervalli di riferimento in entrambi i gruppi. Questo dato ribadisce nuovamente l'influenza dell'emoconcentrazione, ma anche la presenza di una flogosi in questa popolazione. D'altro canto, la presenza di valori di fibrinogeno significativamente più bassi nel gruppo A, che ricordiamo presentare valori critici di albumina, potrebbe portare a considerare la presenza di una risposta infiammatoria meno marcata in questo gruppo, oppure un'influenza su di esso del già citato stato di ipercoagulabilità.

Pur avendo stabilito come ulteriore *cut off* il valore mediano della concentrazione di Fibrinogeno, non si sono ottenuti risultati significativi, tranne che per l'albumina.

CONCLUSIONI

In conclusione, in questa popolazione di cani affetti da parvoviroso canina abbiamo riscontrato una prevalenza di soggetti meticci, di 2 mesi d'età, e che la razza più colpita, sembra essere il Rottweiler, mentre l'incidenza maggiore di questa patologia è durante il periodo invernale. Per quanto riguarda agli esami ematobiochimici, abbiamo ritrovato una popolazione tendenzialmente anemica, nonché emoconcentrata. Le concentrazioni delle APPs positive (Hp, CRP, Fibrinogeno e Ferritina), nonostante la perdita proteica gastroenterica, si sono dimostrate complessivamente elevate, il che, non solo indica la presenza di una risposta infiammatoria sistemica nei soggetti parvoviroso, ma le rende efficaci nell'identificazione di una SIRS. Le Proteine Totali, l'Albumina, la TIBC e l'AT hanno mostrato livelli sierici inferiori ai valori di riferimento, dato correlato possibilmente al loro comportamento come APPs negative e inoltre, alla diarrea proteino-disperdente in corso di Parvoviroso e sembrano potere rivestire un ruolo prognostico in corso di questa patologia. I diversi criteri SIRS definiti in letteratura per il cane non hanno fornito, nella nostra popolazione, indicazioni utili a stabilire la gravità della risposta infiammatoria; tuttavia la differenza poco significativa tra i 3 gruppi SIRS ricavati nello studio in oggetto rimanda ad ulteriori valutazioni su popolazioni più eterogenee. D'altra parte, lo *Score* clinico creato da diversi Autori (Mohr et al., 2003; Savigni e Macintire, 2010) per stabilire la gravità della patologia in corso di

Parvovirosi, si è dimostrato un ottimo strumento per stratificare la popolazione e per la caratterizzazione della sindrome della risposta infiammatoria in questi soggetti. Le concentrazioni plasmatiche dell'Ematocrito, degli Eritrociti, e dell'Emoglobina si sono riscontrate più elevate nei soggetti con un valore mediano dello Score pari a 7. Questo reperto, messo insieme alla bassa concentrazione delle Proteine totali, conferma l'ipotesi dell'ipovolemia in questi pazienti affetti da una sintomatologia più grave. L'andamento dei livelli sierici dell'Aptoglobina e della Ferritina, sembrerebbe confermare, insieme alla CRP, il loro ruolo di APPs positive e rappresentare un utile strumento diagnostico e prognostico in corso di questa patologia. In particolare, il ruolo Ferritina, di cui i dati disponibili nella letteratura veterinaria sono pressoché assenti, andrebbe indagato in una più ampia gamma di patologie di natura infiammatoria per valutare le sue potenzialità come marker di flogosi e per una più completa valutazione del profilo sideremico. Per concludere, la concentrazione sierica di Albumina che sembra essere significativamente più ridotta nei soggetti deceduti può rappresentare un indicatore prognostico significativo in corso di parvovirosi. Considerata poi il fatto che la metodica per la misurazione dell'albumina è semplice e di costo limitato, la sua valutazione è fortemente raccomandata per monitorare il decorso clinico della suddetta patologia.

BIBLIOGRAFIA

8 BIBLIOGRAFIA

- 1 **Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S. (2000)** - *Cellular and molecular immunology*, 4th edition by W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- 2 **Appel MJ, Parrish CR. (1987)** - Canine parvovirus type-2. In: Appel M.J. e Parrish C.R.: *Virus infection of carnivores*, Elsevier publishers, Amsterdam.
- 3 **Aiwaka N, Fujishima S, Endo S, et al. (2005)** – Multicenter prospective study of procalcitonin as an indicator of sepsis. *J Infect Chemother*; 11: 152-159.
- 4 **Anderson R, Schmidt R (2010)** – Clinical biomarkers in sepsis. *Frontiers in Bioscience*; E2, 504-520.
- 5 **Albiger B., Dahlberg S., Henriques-Normark B., Normark S. (2007)** - Role of the innate immune system in host defense against bacterial infections: focus on the Toll-like receptors. *Journal of Internal Medicine*, 261: 511-528.
- 6 **Ammori BJ, Becker KL, Kite P, et al. (2003)** – Calcitonin precursors: Early markers of gut barrier dysfunction in patients with acute pancreatitis. *Pancreas*; 27: 239-243.
- 7 **Assicot M, Gendrel D, Carsin H, et al. (1993)** – High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *Lancet*; 341: 515-528.
- 8 **Barton L. (2005)** - Sepsi e sindrome da risposta infiammatoria sistemica. In Ettinger S.J. Feldman E.C. *Trattato di clinica medica veterinaria*. Malattie del cane e del gatto. Elsevier editore, Milano, vol 1, cap. 123, pag. 466-468.

- 9 Barton GM. (2008)** - A calculate response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*, 118: 413-420.???
- 10 Battersby IA, Murphey KF, Taskers S et al. (2006)** – Retrospective study of fever in dogs: laboratory testing, diagnoses and influence of prior treatment. *J Small Anim Pract*; 370-376.
- 11 Battilani M, Scagliarini A, Ciulli S, et al. (2006)** - High genetic diversity of the VP2 gene of canine parvovirus strain in domestic cat. *Virology*; 352: 22-26.
- 12 Bayne C.J., Gerwick L. (2001)** - The acute phase response and innate immunity of fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 25:725-743.
- 13 Becker KL, Snider R, Nylene ES. (2008)** – Procalcitonin assay in systemic inflammation, infection, and sepsis: Clinical utility and limitations. *Crit cre Med*; 36: 941-952.
- 14 Bellingan G. (1999)** - Inflammatory cell activation in sepsis. *British Medical Bulletin*, 55:12-29.
- 15 Bellingan G. (2003)** - Apoptosis and the resolution of inflammation in sepsis. In Vincent J., Carlet J., Opal S.M.: *The Sepsis Text*, Kluwer Academic Publishers, cap. 13, pag. 231-242.
- 16 Bence LM, Addie DD, Eckersall PD. (2005)** – An immunoturbidimetric assay for rapid quantitative measurement of feline alpha-1-acid glycoprotein in serum and peritoneal fluid. *Vet Clin Pathol*; 34: 335-341.
- 17 Bence LM, Eckersall PD, Addie DD. (2004)** – Development of an immunoturbidimetric assay for measurement of feline AGP. *Vet Clin Pathol*; 33: 258.

- 18 Bentley AM, Otto CM. (2007)** – Comparison of dogs with septic peritonitis: 1998-1993 versus 1999-2003. *J Vet Emerg Crit Care*; 17(4): 391-398.
- 19 Berner R, Niemeyer CM, Leititis JU, et al. (1998)** – Plasma levels and gene expression of granulocyte colony-stimulating factor, tumor necrosis factor-alpha, interleukin (IL)-1beta, IL-6, IL-8, and soluble intercellular adhesion molecule-1 in neonatal early onset sepsis. *Pediatric Res*; 44: 469-477.
- 20 Beutler B. (2004)** - Innate immunity: an overview. *Mol Immunol*, 40: 845-859.
- 21 Binn LN, Lazar C, Eddy GA, et al. (1970)** - Recovery and characterization of a minute virus of canines. *Infect Immun*; 1(5): 503-508.
- 22 Black S, Kushner I, Samols D. (2004)** – C-reactive protein. *J Biol Chem*; 279(47): 48487-48490.
- 23 Bochsler ON, Slauson DO. (2002)** - Inflammation and repair tissues. In Slauson O.N., Cooper B.J.: *Mechanism of disease: a textbook of comparative general pathology*. 3rd edition by Mosby, St. Louis, cap. 4, pag. 140-245.
- 24 Bone RC. (1996)** - Towards a theory regarding the pathogenesis of the systemic inflammatory response system: what we do and do not know about cytokine regulation. *Crit Care Med*; 24: 163-172.
- 25 Bone R.C. (1996)** - Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Annals of Internal Medicine*, Vol. 125, N° 8, pag 680-687.
- 26 Bone R.C., Balk R.A., Cerra F.B. et al. (1992)** - Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest

Physicians/Society of Critical Care. *Chest*. 101: 878-885.

- 27 **Bone R.C., Grodzin C.J., Balk R.A. (1997)** - Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*. 112: 235-243.
- 28 **Borer LR, Pee JE, Seewald W, et al., (2003)** – Effect of carprofen, etodolac, meloxicam or butorphanol in dogs with acute synovitis. *Am J Vet Res*; 64: 1429-1437.
- 29 **Bota D.P., Melot C., Lopes Ferreira F. et al (2002)** - The multiple organ dysfunction score (MODS) versus the sequential organ failure assessment (SOFA) score in outcome prediction. *Intensive Care Med*, 28: 1619-1624.
- 30 **Bozza FA, Bozza PT, Castro Faria Neto HC. (2005)** – Beyond sepsis pathophysiology with cytokines: what is their value as biomarkers for disease severity? *Mem Inst Oswaldo Cruz*; 100 Suppl 1, 217-221.
- 31 **Brady C.A., Otto C.M (2001)** - Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and multiple organ dysfunction. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 31: 1147-1162.
- 32 **Broadley C, Hoover RL (1989)** – Ceruloplasmin reduces the adhesion and scavenges superoxide during the interaction of activated polymorphonuclear leukocytes with endothelial cells. *Am J Pathol*; 135: 647-655.
- 33 **Brunkhorst FM, Heinz U, Forycki ZF. (1998)** – Kinetics of procalcitonin in iatrogenic sepsis. *Intensive Care Med*; 24(8): 888-889.
- 34 **Brunkhorst FM, Wegsheider K, Forycki ZF, et al. (2000)** – Procalcitonin for early diagnosis and differentiation of SIRS, sepsis, severe sepsis and septic shock. *Intensive Care Med*; 26: S 148-152.
- 35 **Brunner CJ, Swango LJ. (1985)** - Canine parvovirus infection. Effects on the

immune system and factors that predispose to severe disease. *Comp Contin Educ Vet Pract.* 12: 979-988.

- 36 Buonavoglia C, Martella V; Pratelli M, et al. (2001)** – Evidence for evolution of canine parvovirus type-2 in Italy. *J Gen Virol*, 82: 3021-3025.
- 37 Caldin M, Tasca S, Carli E, et al. (2006)** – Acute phase proteins in dogs with hyperadrenocorticism: a particular profile? *Vet Clin Pathol*; 35: 477.
- 38 Carr-Smith S, Macintire DK, Swango LJ. (1997)** - Canine parvovirus: Part 1. Pathogenesis and Vaccination. *Comp Cont Ed Pract Vet*; 19 (2): 125-133.
- 39 Carroll M.C. (2004)** - The Complement System in regulation of adaptive immunity. *Nature Immunology.* 5: 981-986.
- 40 Caspi D, Baltz ML, Snel F, et al. (1984)** - Isolation and characterization of C-reactive protein from the dog. *Immunology*: 53:307-313.
- 41 Caspi D, Snel WJJ, Batt RM, et al. (1987)** - C-reactive protein in dogs. *Am J Vet Res*; 48: 919-921.
- 42 Cavalli A, Bozzo N, Decaro A, et al. (2001)** – Characterization of a canine parvovirus strain isolated from an adult dog. *Microbiologica*; 24: 239-242.
- 43 Cavalli A, Campolo M, Desario C, et al. (2006)** - Immunogenicità nel cucciolo di un vaccino attenuato del parvovirus del cane tipo 2b. *Bolletino AIVPA.* 2:27-30.
- 44 Cavalli A, Martella V, Desario C, et al. (2008)** - Evaluation of antigenic relationships among the canine parvovirus (CPV-2) variants. *Clin Vaccine Immunol.* (Epub ahead of print).
- 45 Ceciliani F, Giordano A, Spagnolo V. (2002)** – The systemic reaction during

inflammation: the acute phase proteins. *Protein Pept Lett*; 3: 211-223.

- 46 **Ceciliani F, Grossi C, Giordano A et al. (2004)**- Decreased sialylation of the acute phase protein alpha-1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis (FIP). *Vet Immunol Immunopathol*; 99: 229-236.
- 47 **Cerón JJ, Eckersall PD, Martínez-Subiela S. (2005)** - Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol*. 34: 85-99.
- 48 **Cerón JJ, Martínez-Subiela S. (2004)** – An automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in serum. *Vet Res*; 35: 671-679.
- 49 **Ceron JJ, Ohno K, Caldin M. (2008)** - A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals. *Vet J*. 177: 6-7.
- 50 **Chamanza R, Touissant MJM, Vanederen AM, et al. (1999)** – Serum amyloid A and transferrin in chicken. A preliminary investigation of using acute-phase variables to assess disease in chickens. *Vet Q*; 21: 158-162.
- 51 **Christ-Crain M, Muller B. (2007)** - Biomarkers in respiratory tract infections: diagnostic guides to antibiotic prescription, prognostic markers and mediators. *Eur Respir J*. 30: 556-573.
- 52 **Claeys R, Vinken S, Spapen H, et al. (2002)** – Plasma procalcitonin and C-reactive protein in acute septic shock: clinical and biological correlates. *Crit Care Med*; 30(4): 757-762.
- 53 **Clec'h C, Ferriere F, Karoubi P, et al. (2004)** – Diagnostic and prognostic value of procalcitonin in patients with septic shock. *Crit Care Med*; 32: 1166-1169.
- 54 **Conner J.G., Eckersall P.D., Ferguson (1988a)** - APR in dogs following

surgical trauma. *Res Vet Sci*; 45: 107-110.

- 55 Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, et al. (1988b)** - Bovine acute phase response following turpentine injection. *Res Vet Sci*; 44: 82-88.
- 56 Conway DSG, Buggins P, Hughes E, et al. (2004)** – Relationship of interleukin-6 and C-reactive protein to the prothrombotic state in chronic atrial fibrillation. *J Am Coll Cardiol*; 43: 2075-2082.
- 57 Correa SS, Mauldin GN, Mauldin GE, et al. (2001)** – Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am Anim Hosp Assoc*; 37: 153-158.
- 58 Cunha BA. (2008)** – Sepsis and Septic Shock: Selection of Empiric Antimicrobial Therapy. *Crit Care Med*; 24: 313-334.
- 59 Dandona P, Nix D, Wilson MF, et al. (1994)** – Procalcitonin increase after endotoxin injection in normal subjects. *J Clin Endocrinol Metab*; 79: 1605-1608.
- 60 Dale D.C., Boxer L., Liles C. (2008)** - The fagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*. 112: 935-945.
- 61 Davies MG, Hagen O. (1997)** – Systemic inflammatory response syndrome. *British J Surgery*, 84:920-935.
- 62 Decaro N, Desario C, Campolo M, et al. (2005)** - Clinical and virological findings in pups naturally infected by canine parvovirus type 2 Glu-426 mutant. *J Vet Diagn Invest*; 17: 133-138.
- 63 Decaro N, Elia G, Martella V, et al., (2005a)** – A real-time PCR assay for rapid detection and quantification of canine parvovirus type 2 DNA in the feces of dogs. *Vet Microbiol*; 105: 19-28.

- 64 Deitch EA. (2005)** – Rodents models of intra-abdominal infection. *Shock*; 24 (Suppl. 1): 19-23.
- 65 de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP et al. (2003)** - Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med*; 17: 674-679.
- 66 Denoix PX (1946)** – Enquete permanent dans le centres anticancereaux. *Bull Inst Natl Hyg*; 1: 70-75.
- 67 de Mari K, Maynard L, Eun HM, et al., (2003)** - Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled field trial. *Vet Rec*; 152: 105-108.
- 68 Desario C, Decaro N, Campolo M, et al. (2005)** - Canine parvovirus infection: which diagnostic test for virus? *J Virol Methods*; 126: 179-185.
- 69 Desario C, Lorusso E, Nardi M, et al. (2007)** - Outbreak of canine type 2c natural infection in adult dogs repeatedly administered a type 2-based vaccine (Abstract P 03). In *Proceedings of the international parvovirus meeting*. Bari (Italy).
- 70 de Werra I, Jaccard C, Corradin SB, et al. (1997)** – Cytokines, nitrite/nitrate, soluble tumor necrosis factor receptors, and procalcitonin concentrations: Comparisons in patients with septic shock, and bacterial pneumonia. *Crit Care Med*; 25: 607-613.
- 71 DiBartola SP, Reiter JA, Kociba GJ, et al. (1989)**- Serum amyloid A protein concentration measured by radial immunodiffusion in Abyssinian and non-Abyssinian cats. *Am J Vet Res*; 50: 1414-1417.
- 72 Diemunsch P, Shoeffler P, Bryssine B, et al. (1999)** - Antiemetic activity of the NK1 receptor antagonist GR205171 in the treatment of established post-operative

- nausea and vomiting after major gynaecological surgery. *Br J Anaesth*; 82: 274-276.
- 73 Dillman RC, Coles EH. (1966)** – A canine serum fraction analogous to human C-reactive protein. *Am J Vet Res*; 27: 1769-1775.
- 74 Dinarello CA. (1997)** - Pro-inflammatory and Anti-inflammatory Cytokines as Mediators in the Pathogenesis of Sptic Shock. *Chest*, 112: S 321-S 319.
- 75 Dinarello CA. (2007)** - Historical insights into cytokines. *Eur J Immunol*, 37: S 34-45.
- 76 Du Clos TW, Mold C (2004)** - C-reactive protein: An activator of innate immunity and a modulator of adaptive immunity. *Immunol Res*; 30:261-277.
- 77 Duthie S, Eckersall PD; Addie DP, et al. (1997)** – Value of α 1-acid glycoprotein in the diagnosis of felin infectious peritonitis. *Vet Rec*; 141: 299-303.
- 78 Ebersole J, Capelli D. (2000)** - Acute phase reactants and inflammatory diseases. *Periodontology*; 23: 19-49.
- 79 Eckersall PD. (1995)** - Acute phase proteins as markers of inflammatory lesions. *Comp Haematol Int*; 5: 93-97.
- 80 Eckersall PD. (2000a)** - Acute phase proteins as markers of infection and inflammation: monitoring animal health, animal welfare and foof safety. *Irish Vet J*; 53: 307-311.
- 81 Eckersall PD. (2000b)** - Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as markers of disease in animals. *Rev Med Vet*, 151:577-584.
- 82 Eckersall P.D. (2004)** - The time is right for acute phase protein assays. *Vet J*,

168: 3-5.

- 83 Eckersall PD, Conner JG. (1988)** - Bovine and canine acute phase proteins. *Vet Res Commun*; 12: 169-178.
- 84 Eckersall PD, Conner JG, Harvie J (1999b)** – An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Vet Res commun*; 15: 17-24.
- 85 Eckersall PD, Conner JG, Patron H. (1989)** - An enzyme-linked immunosorbent assay for canine C-reactive protein. *Vet Rec*; 124: 490-491.
- 86 Eckersall PD, Duthie S, Safi S, et al. (1999a)** – An automated biochemical assay for haptoglobin: prevention of interference from albumin. *Comp Haematol Intern*; 5: 117-124.
- 87 Engel A, Mack E, Kern P, et al. (1998)** – An analysis of interleukin-8, interleukin-6 and C-reactive protein serum concentrations to predict fever, gram-negative bacteremia and complicated infection in neutropenic cancer patients. *Infection*; 26: 213-221.
- 88 Esfandiari J, Klingeborn B. (2000)** – A comparative study of a new rapid and one-step test for the detection of parvovirus in faeces from dogs, cats and mink. *J Vet Med*; B 47: 145-153.
- 89 Eugster AK, Bendele RA, Jones LP. (1978)** - Parvovirus infection in dogs. *J Am Vet Assoc*; 173: (10): 1340-1341.
- 90 Faurschou M., Borregaard N. (2003)** - Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes and infection*, 5: 1317-1327.
- 91 Feldman BF, Kaneko JJ, Farver TB. (1981)** - Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization. *Am J Vet Res* 42:1109.

- 92 Flo TH, Smith KD, Sato S, et al. (2004)** – Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature*; 432: 917-921.
- 93 Fong Y, Moldawer LL, Marano M, et al. (1989)** – Endotoxemia elicits increased circulating beta 2-IFN/IL in man. *J Immunol*; 142(7): 2321-2324.
- 94 Fournier T., Medjoubi-N N., Porquet D. (2000)** - Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1482: 157-171.
- 95 Fransson BA, Lagerstedt A, Bergstrom A. et al. (2007)** - C-reactive protein, tumor necrosis factor α and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *J Vet Emer Crit Care*. 17. 373-381.
- 96 Gabay C, Kushner I. (1999)** - Acute- phase proteins and other systemic responses to inflammation. *N Engl J Med*; 340: 448-454.
- 97 Gahmberg CG, Andersson LC. (1978)** - Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid). *J Exp Med*; 148: 507-521.
- 98 Gaini S, Koldkjaer OG, Pedersen C, et al. (2006)** – Procalcitonin, lipopolysaccharide-binding protein, interleukin-6 and C-reactive protein in community-acquired infections and sepsis: a prospective study. *Crit Care Med*; 10(2): R53.
- 99 Gando S, Nanzaki S, Sasaki S, et al. (1998)** - Activation of the extrinsic coagulation pathway in patients with severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*; 26: 2005-2009.
- 100 Gardner CJ, Twissell DJ, Dale TJ, et al. (1995)** - The broad-spectrum antiemetic activity of the novel non-peptide Tachynin NK1 receptor antagonist GR203040. *Br J Pharmacol*. 116: 3158-3163.

- 101 Gebhardt C, Hirschberger J, Rau S. et al. (2009)** - Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis. *J Vet Emerg Crit Care*; 19: 450-458.
- 102 Gendrel D, Raymond J, Assicot M, et al. (1997)** – Measurement of procalcitonin levels in children with bacterial or viral meningitis. *Clin Infect Dis*; 24: 124-1242.
- 103 Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, et al. (2004)** - Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection. *Vet J*; 167: 38-44.
- 104 Giunti M, Gentilini F, Sanguinetti V, Famigli Bergamini P. (2006)** - SIRS increases circulating procalcitonin in dogs. Abstract Twenty-ninth Annual Conference on Shock. Broomfield, Colorado. Saturday June 3 to Tuesday 6 June, 2006. *Shock*. 25 (Suppl. 1): 73.
- 105 Glickman LT, Domanski LM, Patronek GJ, et al. (1985)** – Breed-related risk factors for canine parvovirus enteritis. *J Am Vet Med Assoc*; 187: 589-594.
- 106 Goddard A, Leisewitz AL, Cristopher MM, et al. (2008).** Prognostic usefulness of blood leucocyte changes in canine parvoviral enteritis. *J Vet Internal Med*, 22: 309-316.
- 107 Goris RJA. (1996)** – MODS/SIRS: Result on an overwhelming inflammatory response? *World J Surg*, 20: 418-421.
- 108 Gruys E, Obwolo MJ, Toussaint MJM. (1994)** – Diagnostic significance of the major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. *Vet Bull*; 64: 1009-1018.

- 109 Gruys E., Toussant M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J. (2005)** - Acute phase reaction and acute phase proteins. *J Zhejiang Univ SCI*, 6B (11): 1045-1056.
- 110 Gruys E., Toussant M.J.M., Niewold T.A., Koopmans S.J., et al. (2006)** - Monitoring health by values of acute phase proteins. *Acta histochemica*, 108: 229-232.
- 111 Guyton AC, Hall JE. (2007)** - Le funzioni metaboliche del fegato. In: Guyton AC, Hall JE.: *Fisiologia Medica*, 2nd Edizione EdiSES srl- Napoli, cap. 70, pag. 819-820.
- 112 Hahan KA, Freeman KP, Barnhill MA, et al. (1999)** – Serum alpha 1 acid glycoprotein concentrations before and after relapse in dogs with limphoma treated with doxorubicin. *J Am Vet Med Assoc*; 214: 1023-1025.
- 113 Hall EJ, German AJ. (2005)** – Enteriti virali: parvovirus canino. In: Ettinger SJ, Feldman EC: *Trattato di clinica medica veterinaria. Malattie del cane e del gatto*. Elsevier editore, Milano, vol. 2, cap. 222, pag. 1385-1386.
- 114 Harbarth S, Holeckova K, Froidevaux, et al., (2001)** – Diagnostic value of procalcitonin, interleukin-6, and interleukin-8 in critically ill patients admitted with suspected sepsis. *Am J Resp Crit Care Med*; 164(3); 396-402.
- 115 Harvey JW. (1986)** – Comparison between serum haptoglobin and α 2-globulin concentrations in dogs. *Vet Clin Pathol*; 15: 4-5.
- 116 Harvey JW, Gaskin JM. (1978)** – Felin haptoglobin. *Am J Vet Res*; 39: 549-553.
- 117 Harvey JW, West GL. (1987)** – Prednisone-induced increases in serum alpha-2-globulin and haptoglobin concentrations in dogs. *Vet Pathol*; 24: 90-92.

- 118 Hatherill M, Tibby SM, Turner C. et al. (1999)** – Diagnostic markers of infection: comparison of procalcitonin with C reactive protein and leucocyte count. *Arch Dis Child*; 81: 417-421.
- 119 Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. (1997)** - Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg*; 26: 393-397.
- 120 Haupt W, Hohenberger W, Mueller R, et al. (1997)** – Association between preoperative acute phase response and postoperative complications. *Eur J Surg*; 163: 39-44.
- 121 Helfer-Baker C, Evermann JF, McKeirnan AJ, et al., (1980)** – Serologic studies on the incidence of canine viral enteritis viruses. *Canine Pract*; 7: 37.
- 122 Hirasawa T, Kaneshige T, Mikazuki, K. (1994)** – Sensitive detection of canine parvovirus DNA by the nested polymerase chain reaction. *Vet Microbiol*; 41: 135-145.
- 123 Hoare M, DeBouch P, Wiserman A. (1997)** – Immunogenicity of a low-passage, high-titre modified live canine parvovirus vaccine in pups with maternally derived antibodies. *Vaccine*; 15: 273-275.
- 124 Hochepped T, Berger FG, Baumann H et al. (2003)** – Alpha-1-Acid glycoprotein: an acute protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth factor Reviews*; 14: 25-34.
- 125 Hoffmann G, Czechowski M, Schloesser M, et al. (2002)** – Procalcitonin amplifies inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide production in vascular smooth muscle cells. *Crit Care Med*; 30: 2091-2095.????
- 126 Hold PR, Gruys E. (1984)** - Amyloid A proteins in different species. *Applied Pathology*, 2 316-327.

- 127 Holm J.L., Rozanski E.A. et al., (2004)** - C-reactive protein concentrations in canine acute pancreatitis. *J Vet Emerg Crit Care*, 14(3):183-186.
- 128 Hopkins SJ. (2003)** - The pathophysiological role of cytokines. *Legal Medicine*, 5: S 45-47.
- 129 Houston DM, Ribble CS, Head LL. (1996)** - Risk factors associated with parvovirus enteritis in dogs: 283 cases (1982-1991). *J Am Vet Med Assoc*. 208: 542-546.
- 130 Hubbard WJ, Choundhry M, Schwacha MG, et al. (2005)** – Cecal ligation and puncture. *Shock*; 24(Suppl. 1): 52-57.
- 131 Hulton NR, Johnson DJ, Wilmore DW. (1985)** – Limited effects of prostaglandin inhibitors in *Escherichia coli* sepsis. *Surgery*; 98: 291-297.
- 132 Ingenbleek M, Young V. (1994)** – Transthyretin (prealbumin) in health and disease: nutritional implications. *Ann Rev Nutr*; 14:495-533.
- 133 Iovane G, Martone F, Bonaduce A, et al. (1985)** – Diffusione della parvovirosi canina nell'Italia meridionale. Inchiesta sierologica. *Acta Medica Veterinaria*; 31: 175-183.
- 134 Ishiwata K, Minigawa T, Kajimoto T. (1998)** - Clinical effects of the recombinant feline interferon- ω on experimental parvovirus infection in beagle dogs. *J Vet Med Sci*; 60(8): 911-917.
- 135 Jain NC. (1989)** – Acute phase proteins. In: Kirk RW, ed. *Current Veterinary Therapy X: Small Animal Practice*. 10 th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders; 468-471.
- 136 Johnson V, Gaynor A, Chan DL. et al. (2004)** - Multiple organ dysfunction

syndrome in humans and dogs. *J Vet Emerg Crit Care*; 14: 158-166.

- 137 Jurado RL (1997)** - Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clin Infect Dis* 25:888.
- 138 Kajikawa T, Furuta A, Onishi T, et al. (1999)** – Changes in concentrations of serum amyloid A protein, α 1-acid glycoprotein, haptoglobin, and C-reactive protein in feline sera due to induced inflammation and surgery. *Vet Immunol Immunopathol*; 68: 91-98.
- 139 Kariuki NM, Nyaga PN, Buoro IBJ, et al (1990)** – Effectiveness of fluids and antibiotics as supportive therapy of canine parvovirus-2 enteritis in puppies. *Bull Anim Health Prod Afr*; 38: 379-389.
- 140 Kent J (1992)** – Acute phase proteins: Their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J*; 148: 279-281.
- 141 Kelso A. (1998)** - Cytokines: Principles and prospects. *Immunol Cell Biol*; 76: 300-317.
- 142 King LG. (1994)** – Postoperative complications, prognostic indicators in dogs and cats with septic peritonitis: 23 cases (1989-1992). *J Am Vet Med Assoc*; 204 (3): 407-414.
- 143 King LG, Wohl JS, Manning AM, Hackner SG, et al. (2001)** - Evaluation of the survival prediction index as a model of risk stratification for clinical research in dogs admitted to intensive care units at four locations. *Am J Vet Res*; 62: 948-954.
- 144 Kita Y, Iwaki Y, Noguchi K, et al. (1996)** – Daily serum interleukin-6 monitoring in multiple organ transplantation with or without liver allografts. *Transplant Proc*; 28: 1229-1234.

- 145 Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Kristensen AT. (2003b)** – Evaluation of a commercially available human C-reactive protein (CRP) turbidometric immunoassay for determination of canine serum CRP concentration. *Vet Clin Pathol*; 32: 81-87.
- 146 Kjelgaard-Hansen M, Kristensen AT, Jensen AL. (2003a)** - Evaluation of a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the determination of canine serum C- reactive protein in canine serum. *J Vet Med*; 50: 164-168.
- 147 Kjelgaard-Hansen M, Mikkelsen LF, Kristensen AT, et al. (2003c)** – Study on biological variability of five acute phase reactants in dogs. *Comp Clin Pathol*; 12: 69-74.
- 148 Kramer JM, Meunier PC, Pollock RVH. (1980)** - Canine parvovirus: update. *Vet Med Small Anim Clin*; 75: 1541.
- 149 Kumar V, Abbas AK, Fausto N. (2005)** – Acute and chronic inflammation. In Kumar V, abbas AK, Fausto N: Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th edition, Elsevier (USA), cap. 2 pag. 48-86.
- 150 Kuribayashi T, Shimizu M, Shimada T et al. (2003)** - Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) levels in healthy and pregnant beagle dogs. *Expl Anim*; 52: 377-381.
- 151 Kushner I. (1982)** - The phenomenon of the acute phase response. *Annals New York Academy of Sciences*, 389: 39-48.
- 152 Kushner I., Mackiewicz A. (1993)** - The acute phase response: an overview. In: Mackiewicz A., Kushner I., Baumann H., eds. Acute phase proteins: Molecular Biology, Biochemistry and Clinical Applications. London: CRC Press; 3-19.

- 153 Kutukculer N, Caglayan S, Aydogdu F. (1998)** – Study of pro-inflammatory (TNF-alpha, IL-1alpha, IL-6) and T-cell-derived (IL-2, IL-4) cytokines in plasma and synovial fluid of patients with juvenil chronic arthritis: correlations with clinical and laboratory parameters. *Clin Rheumatol*;17: 288-292.
- 154 Kuzi S, Aroch I, Peleg K, et al. (2008)** - Canine procalcitonin messenger RNA expression. *J Vet Diagn Invest*; 20:629-633.
- 155 LaRosa DF, Orange JS. (2008)** - Lymphocytes. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2: S 364-369.
- 156 Larson LJ, Schultz RD. (1996)** - Vaccino ad alto titolo contro la Parvoviroso canina: risposta sierologica e risposta immunitaria dopo infezione sperimentale. *Veterinari Medicine publishing group*. 913: 492-430.
- 157 Levy MM, Fink MP, Marshall J. et al. (2003).** - 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS, International Sepsis Definitions Conference. *Intensive Care Med*, 29: 530-538.
- 158 Lin Y, Rajala MW, Berger JP. et al. (2001).** Hyperglycemia-induced production of acute phase reactants in adipose tissue. *The Journal of Biological Chemistry*; 276: 42077-42083.
- 159 Linde A., Ross C.D., Davis E.G. et al. (2008)** - Innate immunity and host defense peptides in veterinary medicine. *J Vet Int Med*, 22: 247-265.
- 160 Liste F, Gascon FM, Palacio J, et al. (1994)** – Iron status and anemia in canine leishmaniosis. *Rev Med Vet*; 145: 171-176.
- 161 Lobetti RG, Mohr AJ, Dippenaar T et al. (2000)** – A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *J S Afr Vet Assoc*; 71: 38-42.

- 162 Lobo SM, Lobo FR, Bota DP, et al (2003)** – C-reactive protein levels correlate with mortality and organ failure in critically ill patients. *Chest*; 123(6): 2043-2049.
- 163 Luzzani A, Polati E, Dorizzi R, et al. (2003)** – Comparison of procalcitonin and C-reactive protein as markers of sepsis. *Crit Care Med*; 31:1737-1341.
- 164 Macart M, Koffi A, Henocque G. et al. (1989)** – Optimized microturbidimetric assay for fibrinogen. *Clinical Chemistry*; 35: 211-214.
- 165 Macintire DK, Smith-Carr S. (1997)** - Canine parvovirus. Part II. Clinical signs, diagnosis, and treatment. *Comp Cont Ed Pract Vet*; 19(3): 291-300.
- 166 Magnotti LJ, Deitch EA. (2005)** – Burns, bacterial translocation. Gut barrier function, and failure. *Burn Care Rehabil*; 26: 383-391.
- 167 Mak TW, Saunders ME. (2006)** – Perspective on immunity and immunology. In: *The immune response: basic and clinical principles*. Elsevier Inc., cap.1, pag. 7-13.
- 168 Malaguarnera M, Di Fazio I, Romeo MA, et al. (1997)** – Elevation of interleukin-6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J Gastroenterol*; 32: 211-215.
- 169 Mann FA, Boon GD, Wagner-Mann CC, et al. (1998)** – Ionized and total magnesium concentrations in blood from dogs with naturally acquired parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc*; 212(9): 1398-1401.
- 170 Marchant A, Deviere J, Byl B, et al. (1994)** – Interleukin-10 production during septicaemia. *Lancet*; 343: 707-708.
- 171 Marnell L., Mold C., Du Clos T.W. (2005)** - C-reactive protein: Ligands,

receptors and role inflammation. *Clin Immunol*, 117: 104-111.

- 172 Marshall JC, Vincent JL, Fink MP et al. (2003)** – Measures, markers and mediators: toward a staging system for clinical sepsis. A report of Fifth Toronto Sepsis Roundtable, Toronto, Ontario, Canada, October 25-26, 2000. *Crit Care Med*; 31: 1560-1567.
- 173 Martella V, Cavalli A, Decaro N, et al. (2005)** - Immunogenicity of a modified-live canine parvovirus type 2b vaccine administered intranasally in pups with maternally derived antibodies. *Clin Diagn Lab Immunol*; 12: 1243-1245.
- 174 Martin GS, Mannino DM, Eaton S. (2003)** - The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. *N Engl J Med*, 348: 1546-1554.
- 175 Martin V, Najbar W, Gueguen S, et al. (2002)** – Treatment of canine parvoviral enteritis with interferon-omega in a placebo-controlled challenge trial. *Vet Microbiol*; 89: 115-127.
- 176 Martínez-Subiela S (2003)** – Acute phase proteins in the dog: Analytical and Clinical Validation Studies. (PhD thesis). University of Murcia, Spain.
- 177 Martínez-Subiela S, Bernal LJ, Cerón JJ. (2003)** – Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment. *Am J Vet Res*; 64: 1021-1026.
- 178 Martínez-Subiela S, Cerón JJ. (2005)** - Analytical validation of commercial techniques of haptoglobin, C-reactive protein and serum amyloid A determinations in dogs. *Archivos de Medicina Veterinaria*; 37: 61-66.
- 179 Martínez-Subiela S, Cerón JJ. (2002)** - Serum amyloid A levels in canine leishmaniasis. (Abstract) *Vet Clin Pathol*; 31:205.
- 180 Martínez-Subiela S, Ginel PJ, Cerón JJ. (2004)** – Effects of different

- glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *Vet Rec*;154: 814-817.
- 181 Martínez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Cerón JJ. (2002)** - Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Rec*, 150: 241-244.
- 182 Martínez-Subiela S, Tecles F, Parra MD, et al. (2001)** – Acute phase proteins: general concepts and main clinical applications in veterinary medicine. *Anuales de Veterinaria de Murcia*; 17: 99-116.
- 183 Mastrorilli C, Dondi F, Agnoli C, et al. (2007)** – Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans australis* serogroup infection in dogs: A retrospective study of 20 cases (2001-2004). *J Vet Intern Med*; 21: 3-10.
- 184 Matijatko V, Kucer N, Bari-Rafac R et al. (2002)** - CRP concentration in dogs with uncomplicated babesiosis. In: *Proceedings in the Third Colloquim on Fodd Safety and Acute Phase Proteins*. Doorn, The Netherlands; 55.
- 185 Matijatko V, Mrljak V, Kis I, et al. (2007)** – Evidence of an acute phase response in dogs naturally infected with *Babesia canis*. *Vet Parasitol*; 144: 242-250.
- 186 Marcato PS. (2000)** – Patogenesi cellulare e molecolare di fenomeni infiammatori. In: *Anatomia e istologia patologica veterinaria*, terza ed. Società editrice Esculapio, cap.35, pag. 734-759.
- 187 Marcato PS. (2002)** - Sistema gastroenterico e peritoneo: parvovirosi canina. In: Marcato PS.: *Patologia sistematica veterinaria*, Edagricole, Bo, cap. 5, pag. 701-703.
- 188 Mazzaferro EM, Rudloff E, Kirby R. (2002)** - The role of albumin replacement

in the critically ill veterinary patient. *J Vet Emer Crit Care*; 12(2): 113-124.

- 189 McCaw DL, Hoskins JD. (2006)** – Canine Viral Enteritis. In: Green CE, *Infectious disease of the dog and cat*. 3rd Ed. SAUNDERS ELSEVIER, Philadelphia (PA); cap, 8; pag: 63-70.
- 190 McGrotty Y.L., Knottenbelt C.M. et al. (2003)** - Haptoglobin concentrations in a canine hospital population. *Vet Rec*; 152: 562-564.
- 191 McGrotty Y.L., Knottenbelt C.M. et al. (2004)** - Evaluation of rapid a assay for canine C-reactive protein. *Vet Rec*; 154: 175-176.
- 192 Means RT, Krantz SB (1992)** - Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease. *Blood*; 80:1639.
- 193 Meisner M (2002)** – Patobiochemistry and clinical use of procalcitonin. *Clin Chim Acta*; 323: 17-29.
- 194 Meisner M, Tschakowsky K, Palmaers T, et al. (1999)** – Comparison of procalcitonin (PCT) and C-reactive protein (CRP) plasma concentrations at different SOFA scores during the course of sepsis and MODS. *Crit Care (Lond)*; 3: 45-50.
- 195 Miranda-Ribera A, Lecchi C, Bronzo V, et al. (2009)** – Down-regulation effect of alpha-1-acid glycoprotein on bovine neutrophil degranulation. *Comp Immun Microbil Infect Dis*; doi: 10.1016/j.cimid.2008.10.009.
- 196 Mitaka C. (2005)** – Clinical laboratory differentiation of infectious versus non-infectious systemic inflammatory response syndrome. *Clin Chim Acta*; 351: 17-29.
- 197 Mochizuki M, San Gabriel MC, Natakani H, et al. (1993)** - Comparison of

polymerase chain reaction with virus isolation and hemoagglutination assays for the detection of canine parvoviruses in faecal specimens. *Res Vet Sci*; 55: 60-63.

- 198 Mokart D, Merlin M, Sannini A, et al. (2005)** – Procalcitonin, interleukin 6 and systemic inflammatory response syndrome (SIRS): early markers of postoperative sepsis after major surgery. *Br J Anaesth*; 94: 767-773.
- 199 Monneret G, Labaune JM, Isaac C, et al. (1997)** – Procalcitonin and C-reactive protein levels in neonatal infections. *Acta Paediatr*; 86: 2092-212.
- 200 Morgenthaler NG, Struck J, Fisher-Schulz C, et al. (2002)** – Detection of procalcitonin (PCT) in healthy controls and patients with local infection by a sensitive ILMA. *Clin Lab*; 48: 263-270.
- 201 Mohr AJ, Leisewitz L, Jacobson LS, et al. (2003)** – Effect of early enteral nutrition on intestinal permeability, intestinal protein loss, and outcome in dogs with severe parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med*; 17: 791-798.
- 202 Moshage H. (1997)** - Cytokines and the hepatic acute phase response. *J Pathol*; 181: 257-266.
- 203 Muller WA. (2002)** - Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Lab Invest*; 82: 521-533.
- 204 Müller B, Becker KL, Schächinger H, et al. (2000)** - Calcitonin precursors are reliable markers of sepsis in a medical intensive care unit. *Crit Care Med*; 28: 977-983.
- 205 Murata H., Shimada N., Yoshioka M. (2004)** - Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Vet J*, 168: 28-40.
- 206 Murphy TJ, Paterson HM, Mannick JA, et al. (2004)** - Injury, sepsis and the regulation of Toll-like receptors responses. *J Leuk Biol.* 75: 400-407

- 207 Nakamura M, Nakamura K, Miyazawa T, et al. (2003)** - Monoclonal antibodies that distinguish antigenic variants of canine parvovirus. *Clin Diagn Lab Immunol*; 10: 1085-1089.
- 208 Nakamura M, Takahashi M, et al. (2008)** - C-reactive protein concentration in dog with various diseases. *J Vet Med Sci*; 70: 127-131.
- 209 Nast-Kolb D, Waydhas C, Gippner-Steppert C, et al. (1997)** – Indicators of the posttraumatic inflammatory response correlate with organ failure in patients with multiple injuries. *J Trauma*; 42: 446-454.
- 210 Ndungu JM, Eckersall PD, Jennings FW. (1991)** – Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta Trop*; 49: 77-85.
- 211 Nelson CD, Palermo LM, Hafenstein SL, et al. (2007)** - Different mechanisms of antibody-mediated neutralization of parvoviruses revealed using the Fab fragments of monoclonal antibodies. *Virology*; 361(2): 283-293.
- 212 Nemzek JA, Agrodnia MD, Hauptman JG. (2007)** - Breed-specific pro-inflammatory cytokine production as a predisposing factor for susceptibility to sepsis in the dog. *J Vet Emerg Crit Care*, 17: 368-372.
- 213 Nguyen HT. (1999)** – Transport proteins. In: Loeb WF, Quimby FW, eds. *Clinical Chemistry of Laboratory animals*. 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis: 309-335.
- 214 Nguyen HB, Rivers EP, Abrahamian FM, et al. (2006)** - Severe sepsis and septic shock: review of the literature and emergency department management guidelines. *Ann Emerg Med*. 48 (1): 28-54.
- 215 Niederman MS, Fein AM. (1990)** - Sepsis syndrome, the adult respiratory

distress syndrome, and nosocomial pneumonia: a common clinical sequence. *Clin Chest Med.* 11: 663-665.

- 216 Nielsen L, Toft N, Eckersall PD, et al. (2007)** – Serum C-reactive protein concentrations an indicator of remission status in dogs with multicenter lymphoma. *J Vet Intern Med*; 27: 1231-1236.
- 217 Nystrom PO. (1998)** - The systemic inflammatory response syndrome: definitions and aetiology. *J Antimicrob Chem.* 41 (Suppl. A): 1-7.
- 218 Oberhoffer M, Karzai W, Meier- Hellmann A, et al. (1999)** – Sensitive and specificity of various markers of inflammation for the prediction of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in patients with sepsis. *Crit Care Med*; 27: 1814-1818.
- 219 Oberhoffer M, Stonans I, Russwurm S. et al. (1999)** - Procalcitonin expression in human peripheral blood mononuclear cells and its modulation by lipopolysaccharides and sepsis-related cytokines in vitro. *J Lab Clin Med.* 134: 49-55.
- 220 Oda S, Hirasawa H, Shiga H, et al. (2005)** – Sequential measurement of IL-6 blood levels in patients with systemic inflammatory response syndrome (SIRS)/sepsis. *Cytokine*; 29: 169-175.
- 221 Ogilvie GK, Walters LM, Greeley SG, et al., (1993)** - Concentration of alpha-1-acid glycoprotein in dogs with malignant neoplasia. *J Am Vet Med Assoc*; 203: 1144-1146.
- 222 Ohno K, Yokoyama Y, Nakashima K, et al. (2007)** – C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *J Vet Med Sci*; 68: 1275-1279.
- 223 Ohwada K, Tamura K. (1995)** – Usefulness of alpha 1 acid glycoprotein values in screening pound dogs acquired from animal shelters for experimental use. *Exp*

Anim 42: 627-630.

- 224 Okano S, Yoshida M, Fukushima U, et al. (2002)** - Usefulness of systemic inflammatory response syndrome criteria as an index for prognosis judgement. *Vet Rec*; 150: 245-246.
- 225 Onishi T, Inokuma H, Ohno K, et al. (2000)** – C-reactive protein concentrations in normal and diseased dogs—measured by laser nephelometric immunoassay. *J Jpn Vet Med Assoc*; 53: 595-601.
- 226 Opal SM, Cohen J. (1999)** - Clinical Gram Positive Sepsis: Does it fundamentally differs from Gram negative bacterial sepsis? *Crit Care Med*; 27: 1608-1616.
- 227 Opal SM. (2005)** - Concept of PIRO as a new conceptual framework to understand sepsis. *Pedriatic Crit Care Med*; 6 S: 55-60.
- 228 Opal SM, Depalo VA. (2000)** - Anti-inflammatory Citokines. *Chest*, 117: 1162-1172.
- 229 Otabe K, Ito T, Sugimoto T. et al. (2000)** - C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Lab Anim*; 34: 434-438.
- 230 Ottenjann M, Weingart C, Arndt G, et al. (2006)** – Characterization of the anemia of inflammatory disease in cats with abscesses, pyothorax or fat necrosis. *J Vet Intern Med*; 20: 1143-1150.
- 231 Otto CM, Drobatz KJ, Sorter C. (1997)** - Endotoxemia and tumor necrosis factor in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med*; 11: 65-70.
- 232 Otto CM, Jackson CB, Rogell E, et al. (2001)** – Recombinant bactericidal/permeability increasing protein (rBPI21) for treatment of parvovirus

- enteritis: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *J Vet Intern Med*; 15: 355-360.
- 233 Otto CM, Rieser TM, Brooks MB et al. (2000)** - Evidence of hypercoagulability in dogs with parvoviral enteritis. *J Am Vet Med Assoc*; 217: 1500-1504.
- 234 Otto CM. (2007a)** - Sepsis in veterinary patients: what do we know and where we can go? *J Vet Emerg Crit Care*; 17: 329-332.
- 235 Otto CM. (2007b)** - Clinical trials in spontaneous disease in dogs: a new paradigm for investigations of sepsis. *J Vet Emerg Crit Care*. 17 379-367.
- 236 Paltrinieri S. (2007)** - Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The Acute Phase Proteins. *Vet Res Commu*; 31(1): 125-129.
- 237 Paltrinieri S. (2008)** - The feline acute phase reaction. *Vet J*; 177: 26-35.
- 238 Paltrinieri S, Ceciliani F, Pocacqua V, et al. (2006)** – Correlation between coronaviral burden and quali-quantitative changes of serum alpha-1-acid glycoprotein. 6th European Colloquium of Acute Phase Proteins, Copenhagen, Denmark.
- 239 Paltrinieri S, Giordano A, Tranquillo V, et al. (2007)** – Critical assessment of the diagnostic value of feline α 1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using likelihood ratios approach. *J Vet Diagnos Invest*; 19: 266-272.
- 240 Páramo JA, Rodríguez JA, Orbe J. (2005)** – Fibrinogen. An old hemostatic protein with a new function: non-invasive marker of subclinical atherosclerosis. *Medicina Clinica*; 124: 790-794.
- 241 Parra MD, Papisoulitis K, Cerón JJ. (2004)** – C-reactive protein levels in canine effusions: a preliminary study (Abstract). *Vet Clin Pathol*; 33: 257

- 242 Parra MD, Tuomola M, Cabezas-Herrera J et al. (2005)** – Use of a time resolved immunofluorometric assay for determination of canine C-reactive protein concentrations in whole blood. *Am J Vet Res*; 66: 62-66.
- 243 Parra MD, Väisänen V, Cerón JJ. (2004b)** – Development of a time-resolved fluorometry based immunoassay for the determination of canine haptoglobin in various body fluids. *Vet Res*; 36: 117-129.
- 244 Parrish CR. (1999)** – Host range relationships and the evolution of canine parvovirus. *Vet Microbiol*; 69:29-40.
- 245 Parrish CR, Have P, Foreyt WJ, et al. (1988)** - The global spread and replacement of canine parvovirus strains. *J Gen Virol*, Cap. 69, pag. 1111-1116.
- 246 Pepys MB, Baltz ML. (1983)** - Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentraxins) and serum amyloid A protein. *Advances in immunology* 34: 141-212.
- 247 Pepys MB, Hirschfield GM. (2003)** – C-reactive protein: a clinical update. *J Clin Invest*; 111(12): 1805-1812.
- 248 Pereira CA, Monezi TA, Mehnert DU, et al. (2000)** – Molecular characterisation of canine parvovirus in Brazil by polymerase chain reaction assay. *Vet Microbiol*; 75: 127-133.
- 249 Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH. (2004)** - Application of acute phase measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*, 35:163-187.
- 250 Pinsky MR, Vincent JL, Deviere J, et al (1993)** – Serum cytokine levels in human septic shock. Relation to multiple-system organ failure and mortality. *Chest*; 103: 565-575.

- 251 Planellas M., Bassols A., Siracusa C, et al. (2009)** - Evaluation of serum haptoglobin and C-reactive protein in dogs with mammary tumors. *Vet Clin Pathol*; 3873: 348-352.
- 252 Platt SR, Radaelli ST, McDonnell JJ. (2001)** - The prognostic value of the modified Glasgow Coma Scale in head trauma in dogs. *J Vet Intern Med*; 15: 581-584.
- 253 Ponti W. (2005)** - Classificazione dei virus e virologia speciale. In Poli G, Cocilovo A, Dall'Ara P. et al., (2005): *Microbiologia e Immunologia Veterinaria*. Seconda edizione – UTET S.p.A. Scienze Mediche, cap. 32, pag. 430-433.
- 254 Poli G. (1998)** - Virologia Generale. In Andrea E, Buonavoglia C, Compagnucci M et al. In: *Trattato di malattie infettive degli animali domestici*. Seconda edizione, UTET, To, cap. 2, pag. 12-19.
- 255 Pollock RV, Carmichael LE. (1990)** - Canine parvoviral enteritis. In: Green CE. *Infectious disease of the dog and cat*. Ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia.
- 256 Pratelli A, Cavalli A, Martella V, et al. (2001)** – Canine parvovirus (CPV) vaccination: comparison of neutralizing antibody response in pups after inoculation with CPV-2 or CPV-2b modified live virus vaccines. *Clin Diagn Lab Immunol*; 8: 612-615.
- 257 Poland DC, Kratz E, Vermeiden JP et al. (2002)** - High levels of α 1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis groups on its glycans: Supporting evidence for a prostatic origin. *Prostate*. 52: 34-42.
- 258 Pollock RV, Carmichael LE, (1983)** - Canine viral enteritis. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 13(3): 551-566.

- 259 Pollock RH, Coyne MJ. (1993)** - Canine Parvovirus. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*; 23(3), 555-568.
- 260 Póvoa P, Almeida E, Moreira P, et al. (2002)** – C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med*; 24: 1052-1056.
- 261 Prittie J. (2004)** - Canine parvoviral enteritis: a review of diagnosis, management, and prevention. *J Vet Emerg Crit Care*. 14: 167-176.
- 262 Quaye IK. (2008)** – Haptoglobin, inflammation and disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical and Hygiene*; 102: 735-742.
- 263 Ramadori G, Christ B. (1999)** - Cytokines and the hepatic acute-phase response. *Seminars in Liver Disease*, 19:141-155.
- 264 Ramsey DS, Kincaid K, Watkins JA, et al. (2008)** - Safety and efficacy of injectable and oral maropitant, a selective neurokinin1 receptor antagonist, in a randomized clinical trial for treatment of vomiting in dogs. *J Vet Pharmacol Therap*; 31, 538-543.
- 265 Rau B, Steinbach G, Gansauge F, et al. (1997)** – The potential role of procalcitonin and interleukin 8 in the prediction of infected necrosis in acute pancreatitis. *Gut*; 41: 832-840.
- 266 Rau S, Kohn B, Richter C. et al. (2007)** - Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Vet Clin Pathol*. 36: 253-260.
- 267 Redl H, Spittler A, Strohmaier W. (2003)** – Markers of sepsis. In Vincent J, Carlet J, Opal SM.: *The Sepsis Test*. Kluwer Academic Publishers, cap. 4, pag. 47-66.

- 268 Reinhart K, Meisner M, Brunkhorst FM. (2006)** – Markers for Sepsis Diagnosis: What is Useful? *Crit Care Clin*; 22: 503-519.
- 269 Reinhart K, Wiegand-Lohnert C, Grimminger F, et al. (1996)** – Assessment of safety and efficacy of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody-fragment, MAK 195F, in patients with sepsis and septic shock: a multicenter, randomized, placebo-controlled, dose-ranging study. *Crit Care Med*; 24: 733-742.
- 270 Richter J, Andersson T, Olsson I, (1989)** - Effect of tumor necrosis factor and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor on neutrophil degranulation. *J Immunol*; 142:3199.
- 271 Ridker PM. (2001)** – Role of inflammatory biomarkers in prediction of coronary heart disease. *Lancet*; 358: 946-948.
- 272 Rikihisa Y, Yamamoto S, et al., (1994)** - C-reactive protein and alpha-1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *J Clin Microbiol*; 32: 912-917
- 273 Riley RF, Zontine W. (1972)** – Further observation on the properties of dog C-reactive protein and the C-reactive protein response in the dog. *J Lab Clin Med*; 80: 698-703.
- 274 Rivers E, Nguyen B, Havstad S. et al. (2001)** – Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med*; 345: 1368-1377.
- 275 Robak T, Gladalska A, Stepień H, et al. (1998)** – Serum levels of interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm*; 7: 343-353.
- 276 Rockar RA, Drobatz KS. (1994)** - Development of scoring system for the

veterinary trauma patient. *J Vet Emerg Crit Care*; 4: 77-83.

- 277 Ruaux CG, Atwell RB. (1998)** - A severity score for spontaneous acute pancreatitis. *Aust Vet J*; 76: 804-808.
- 278 Ryan CM, Yarmush ML, Burke JF, et al (1992)** – Increased gut permeability early after burns correlates with the extent of burn injury. *Crit Care Med*; 20: 1508-1512.
- 279 Saini PK, Riaz M, Webert DW, et al. (1998)** – Development of a simple enzyme immunoassay for blood haptoglobin concentration in cattle and its application in improving food safety. *Am J Vet Res*; 59: 1101-1107.
- 280 Sandstedt K, Wienup M, (1981)** - Concomitant occurrence of *Campylobacter* and parvoviruses in dogs with gastroenteritis. *Vet Res Commun*; 4: 271-273.
- 281 Sasaki K, Ma Z, Khatlani TS, et al. (2003)** - Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J Vet Med Sci*; 65: 545-548.
- 282 Savigni MR, Macintire DK. (2010)** – Use of oseltamivir in the treatment of canine parvoviral enteritis. *J Vet Intern Med*; 20: 132-142.
- 283 Savill J. (2000)** – Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res*; 23: 173-174.
- 284 Schunck B, Kraft W, Truyen U. (1995)** – A simple touch-down polymerase chain reaction for the detection of canine parvovirus and feline panleukopenia virus in feces. *J Virol Methods*; 55: 427-433.
- 285 Selberg O, Hecker H, Martin M, et al (2000)** – Discrimination of sepsis and systemic inflammatory response syndrome by determination of circulating plasma concentration of procalcitonin, protein complement 3a, and interleukin-6. *Crit Care Med*; 28: 2793-2798.

- 286 Sellar GC, DeBeer MC, Lelias JM, et al. (1991)** - Dog serum amyloid A protein. Identification of multiple isoforms defined by cDNA and protein analyses. *J Biol Chem*; 266: 3505-3510.
- 287 Selting KA, Ogilvie GK, Lana SE, et al. (2000)** – Serum alpha 1-acid glycoprotein concentrations in healthy and tumor-bearing cats. *J Vet Intern Med*; 14: 503-506.
- 288 Senda M, Parrish CR, Harasawa R, et al. (1995)** – Detection by PCR of wild-type canine parvovirus which contaminates dog vaccines. *J Clin Microbiol*; 33: 110-113.
- 289 Sevelious E, Andersson M. (1995)** – Serum protein electrophoresis as a prognostic marker of chronic liver disease in dogs. *Vet Rec*; 137: 663-667.
- 290 Shenkin A, Fraser WD, Series J, et al. (1989)** – The serum interleukin 6 response to elective surgery. *Lymphokine Res*; 8: 123-127.
- 291 Sherding RG. (1989)** - Small bowel disease. In: Ettinger SJ, editor. 3rd edition, Textbook of veterinary medicine, vol. 2. Philadelphia: WB Saunders; pag. 1351-1353.
- 292 Sherwood ER, Toliver-Kinsky T. (2004)** - Mechanism of the inflammatory response. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 18: 385-405.
- 293 Shim BS, Yoon CS, Oh SK, et al. (1971)** – Studies on swine and canine serum haptoglobins. *Biochim Biophys Acta*; 243: 126-136.
- 294 Shimetani N, Shimetani K e Mori M. (2004)** – Clinical evaluation of the measurement of serum procalcitonin: comparative study of procalcitonin and serum amyloid A protein in patients with high and low concentrations of serum C-reactive protein. *Scand J Clin Invest*; 64: 469-474.

- 295 Smirnova MG, Kiselev SL, Gnuchev NV, et al. (2002)** – Role of the Pro-Inflammatory Cytokines: Tumor Necrosis Factor- α , Interleukin-1 β , Interleukin-6 and Interleukin-8 in the Pathogenesis of the Otitis Media with effusion. *European Cytokine Network*; 13: 161-172.
- 296 Smith JA. (1994)** - Neutrophils, host defense and inflammation: a double-edge sword. *J Leukocyte Biol*, 56: 672-686.
- 297 Smith JE. (1997)** – Iron metabolism and its disorders. In: Kaneko JJ, Havey JW; Bruss ML. eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. 4th ed. New York: Academic Press; 223-240.
- 298 Song M, Kellum JA (2005)** – Interleukin-6. *Crit Care Med*; 33(12Suppl): S463-465.
- 299 Solter PF, Hoffmann WE, Hungerford LL, et al. (1991)** – Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *Am J Vet Res*; 52: 1738-1742.
- 300 Southwood LL, Russell G. (2007)** – The use of clinical findings in the identification of equine peritonitis cases that respond favorably to medical therapy. *J Vet Emerg Crit Care*; 17(4): 382-390.
- 301 Spillmann T, Korrel J, Wittker A et al. (2002)** – Serum canine pancreatic elastase and canine C-reactive protein for the diagnosis and prognosis of acute pancreatitis in the dog. *J Vet Intern Med*; 16: 635.
- 302 Steinbach G, Rau B, Debard AL, et al. (2004)** – Multicenter evaluation of a new immunoassay for procalcitonin measurement on the Kryptor System. *Clin Chem Lab Med*; 42:440-449.
- 303 Stockham SL, Scott MA. (2008)** – Erythrocytes. In: Stockam SL, Scott MA. 2nd

Edition. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. Blacwell Publishing, USA; cap.3, pag. 202-209.

- 304 Stoddart ME, Whicher JT, Harbour DA. (1988)** – Cats inoculated with feline infections peritonitis virus exhibit a biphasic acute phase plasma protein response. *Vet Rec*;123: 622-624.
- 305 Swango IJ. (1989)** - Canine viral diseases. In: Ettinger SJ, editor. *Textbook of Veterinary Medicine*, vol 1. 3rd edition. Philadelphia: WB Saunders; pag. 307-309.
- 306 Tecles F, Caldin M, Zanella A, et al. (2009)**. Serum acute phase proteins concentrations in female dogs with mammary tumors. *J Vet Diagn Invest*; 21: 214-219.
- 307 Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, et al. (2005)**- Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic disease of the dog. *J Vet Med*; 19: 865-870.
- 308 Tempesta M, Pratelli A, Buonavoglia D, et al. (1998)** – The polymerase chain reaction for the detection of defective interfering canine parvovirus particles. *New Microbiol*; 21: 353-357.
- 309 TerWee J, Lauritzen AY, Sabara M, et al. (1997)** – Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotrophic or a “limping” strain of feline calicivirus. *Vet Microbiol*; 56: 33-45.
- 310 TerWee J, Sabara M, Kokjohn K, et al. (1998)** – Characterization of the systemic disease and ocular signs induced by experimental infection with *Chlamydia psittaci* in cats. *Vet Microbiol*; 59: 259-281.
- 311 Tiletts WS, Francis JrT. (1930)** – Serological reactions in pneumonia with a

nonprotein somatic fraction of pneumococcus. *J Exp Med*; 52: 561-585.

- 312 Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. (1995)** - Parvoviridae. In Timoney JF, Gillespie JH, Scott FW, et al. *Microbiology and Infectious Disease of Domestic Animal*. Editoriale Grazzo, BO, cap. 43, pag. 603-617.
- 313 Truyen U, Gruneberg A, Chang SF, et al. (1995)** – Evolution of the feline subgroup of parvoviruses and the control of canine host range in vivo. *J Virol*; 69: 4702-4710.
- 314 Truyen U, Platzer G, Parrish CR, et al (1994)** – Detection of canine parvovirus DNA in paraffinembedded tissues by polymerase chain reaction. *J Vet Med*;B 41: 148-152.
- 315 Tsukada K, Katoh H, Shiojima M, et al. (1993)** – Mortality rate and bacteremia, endotoxin, and endothelin-1 levels in antibiotic therapy for E.coli septic peritonitis. *APMIS (Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica)*; 101:97-100.
- 316 Turk J, Fales W, Miller M, et al. (1992)** - Enteric *Clostridium perfringens* infection associated with parvoviral enteritis in dogs: 74 cases (1987-1990). *J Am Vet Med Assoc*; 200: 991-994.
- 317 Turk J, Miller M, Brown T, et al. (1990)** – Coliform septicemia and pulmonary disease associated with canine parvoviral enteritis: 88 cases (1987-1988). *J Am Vet Med Assoc*; 196 (5): 771-773.
- 318 Uematsu S, Akira S. (2006)** - Toll-like receptors and innate immunity. *J Mol Med*. 84: 712-725.
- 319 Ugarte H, Silva E, Mercan D, et al. (1999)** – Procalcitonin used as a marker of infection in the intensive care unit. *Crit Care Med*; 27: 498-504.

- 320 Uhlar MC, Whitehead S. (1999)** - Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur. J. biochem*; 265: 501-523.
- 321 Uwatoko K, Sunairi, M Nakajima M, et al. (1995)** – Rapid method utilizing the polymerase chain reaction for detection for canine parvovirus in feces of diarrheic dogs. *Vet Microbiol*; 43: 315-323-
- 322 Van Miert ASJPAM. (2002)** - Present Concepts on the Inflammatory Modulators with Special Reference to Cytokines. *Vet Res Comm*, 26:111-126.
- 323 Ventetuolo CE, Levy MM. (2008)** – Biomarkers: diagnosis and risk of assessment in sepsis. *Clin Chest Med*; 29(4): 591-603.
- 324 Vigushin DM, Pepys MB, Hawkins PN. (1993)** – Metabolic and scintigraphic studies of radioiodinated human C-reactive protein in health and disease. *J Clin Invest*; 91: 1351-1357.
- 325 Wakefield CH, Barclay GR, Fearon KC, et al. (1998)** – Proinflammatory mediator activity, endogenous antagonist and the systemic inflammatory response in intra-abdominal sepsis. Scottish Sepsis Intervention Group. *Br J Surg*; 85: 818-825.
- 326 Warren HS. (2005)** – Toll-like receptors. *Crit Care Med*; S 457-459.
- 327 Weidemeyer CE, Solter PF. (1996)** – Validation of human haptoglobin immunoturbidimetric detection of haptoglobin in equine and canine serum and plasma. *Vet Clin Pathol*; 25: 141-146.
- 328 Weis F, Beiras-Fernandez A, Shelling G, et al. (2009)** – Stress doses of hydrocortisone in high-risk patients undergoing cardiac surgery: effects on interleukin-6 to interleukin-10 ratio and early outcome. *Crit Care Med*; 37(5): 1685-1690.

- 329 Weiss DJ, Krehbiel JD, (1983)** - Studies of the pathogenesis of the anemia of inflammation: erythrocyte survival. *Am J Vet Res* 44:1830.
- 330 Weiss DJ, Rashid J. (1998)** - The sepsis-coagulant axis: a review. *J Vet Intern Med*; 12: 317-324.
- 331 Woloski BM, Smith EM, Meyer WJ, et al (1985)** – Corticotropin-releasing activity of monokines. *Science*; 230(4729): 1035-1037.
- 332 Yamamoto S, Miyadi S, Ashida Y et al. (1994a)** – Preparation of anti-canine serum amyloid A (SAA) serum and purification of SAA from canine high-density lipoprotein. *Vet Immunol Immunopathol*; 41: 41-53.
- 333 Yamamoto S, Shida T, Miyaji H, et al. (1993)** - Changes in serum C-reactive protein levels in dogs with various disorders and surgical traumas. *Vet Res Comm*; 17: 85-93.
- 334 Yamamoto S, Shida T, Okimura T, et al. (1994b)** - Determination of C-reactive protein in serum and plasma from healthy dogs and dogs with pneumonia by ELISA and slides reverses passive latex agglutination test. *Vet Q*; 16: 74-77.
- 335 Yamashita K, Fujinaga T, Miyamoto T et al., (1994)** – Canine acute phase response: relationship between serum cytokines activity and acute phase protein in dogs. *J Vet Med Sci*; 56: 487-492.
- 336 Yilmaz Z, Ilcol YO, Ulus IH (2008)** - Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. *Crit Care Med*; 36: 828-833.
- 337 Yule TD, Roth MB, Dreier K, et al. (1997)** – Canine parvovirus vaccine elicits protection from the inflammatory and clinical consequences of the disease. *Vaccine*; 15: 720-729.

