

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN
Scienze Veterinarie**

Ciclo XXVIII

**Settore Concorsuale di afferenza:
07/H5 Cliniche chirurgica e ostetrica veterinaria**

**Settore Scientifico disciplinare:
VET/10 Clinica ostetrica e ginecologia veterinaria**

TITOLO DELLA TESI

**INDIVIDUAZIONE DI MARKER CLINICI E
CLINICOPATOLOGICI DI UTILITÀ PROGNOSTICA
IN CANI AFFETTI DA PIOMETRA O
ASCESSO PROSTATICO**

**Presentata da:
Dr.ssa COSTANZA BINI**

**Coordinatore Dottorato:
Prof. CARLO TAMANINI**

**Relatore:
Prof. DANIELE ZAMBELLI**

**Correlatore:
Prof. MASSIMO GIUNTI**

Esame finale anno 2016

INDICE

Introduzione.....	5
<i>PARTE GENERALE</i>	
CAPITOLO I	
La piometra.....	9
1.1 <i>Definizione, incidenza ed eziopatogenesi</i>	9
1.2 <i>Segnalamento, presentazione clinica e diagnosi</i>	11
1.3 <i>Trattamento e outcome</i>	14
CAPITOLO II	
SIRS e sepsi.....	17
2.1 <i>Definizioni, incidenza e outcome</i>	17
2.2 <i>Patogenesi della sepsi</i>	18
2.3 <i>La sepsi: una sfida diagnostica</i>	22
2.4 <i>Sepsi e piometra</i>	25
CAPITOLO III	
I biomarcatori.....	26
3.1 <i>Definizione e caratteristiche</i>	26
3.2 <i>Biomarker in corso di piometra</i>	27
3.2.1 <i>Parametri ematobiochimici</i>	30
3.2.2 <i>Parametri della coagulazione e piastrine</i>	34
3.2.3 <i>Lattatemia e altri marker di ipoperfusione tissutale</i>	37
3.2.4 <i>Poteine di Fase Acuta</i>	39
3.2.5 <i>Citochine</i>	46
3.2.6 <i>Biomarker urinari associati a danno renale</i>	48
3.2.7 <i>Altri biomarcatori indagati in corso di piometra</i>	50
CAPITOLO IV	
Prostatite e ascesso prostatico.....	53
<i>PARTE SPERIMENTALE</i>	
CAPITOLO V	
Obiettivi.....	59
CAPITOLO VI	
Materiali e metodi.....	61
6.1 <i>Selezione della popolazione</i>	61
6.2 <i>Gestione dei pazienti, prelievo e processazione dei campioni</i>	63
6.3 <i>Determinazioni e metodiche analitiche</i>	66
6.4 <i>Analisi statistica</i>	76
CAPITOLO VII	
Risultati.....	77
7.1 <i>Descrizione della popolazione di studio</i>	77
7.1.1 <i>Segnalamento</i>	77
7.1.2 <i>Sintomatologia clinica</i>	79
7.1.3 <i>Stadiazione clinica, trattamento e outcome</i>	82
7.2 <i>Analisi statistica dei risultati</i>	83

7.2.1 Statistica descrittiva	83
7.2.2 Confronto tra malati e sani	93
7.2.3 Confronto tra sopravvissuti e non sopravvissuti: correlazioni con l' <i>outcome</i>	97
7.2.4 Ricovero in terapia intensiva (ICU)	109
7.2.5 <i>Delta Neutrophil Index</i>	109
7.2.7 Altre variabili associate alla presenza di shock settico	113
7.2.7 Altre correlazioni	115

CAPITOLO VIII

Discussione	116
--------------------------	------------

Bibliografia	130
---------------------------	------------

Introduzione

Tra le patologie che colpiscono l'apparato riproduttore nella specie canina, due assumono particolare interesse nell'ambito della terapia d'urgenza e potenzialmente della terapia intensiva: si tratta delle infezioni croniche a carico dell'utero o della prostata che danno luogo, rispettivamente nella cagna e nel cane maschio, alla piometra e alla prostatite associata ad ascesso prostatico.

Tali malattie insorgono come forme localizzate all'apparato genitale ma possono evolvere fino a determinare un coinvolgimento generale dell'organismo legato alla diffusione di batteri o loro tossine dal focolaio infettivo, cui sono associate condizioni gravi e potenzialmente mortali quali la sepsi e la Sindrome da Disfunzione Multiorganica (MODS). Sia la piometra che la prostatite/ascesso prostatico sono infezioni sostenute prevalentemente da germi Gram-negativi, responsabili della produzione di endotossine che, rilasciate in circolo, inducono una risposta infiammatoria sistemica determinando SIRS (Sindrome della Risposta Infiammatoria Sistemica) e in certi casi sepsi grave, shock settico e morte. La piometra, che si stima colpisca circa una su quattro femmine intere entro i dieci anni, evolve in SIRS in più del 50% dei casi: ciò si riflette in un aumento dei tempi di ospedalizzazione e in un incremento della mortalità associata alla patologia, che nei casi di sepsi grave può arrivare a superare il 35% dei soggetti colpiti. Analogamente la prostatite associata ad ascesso prostatico, sebbene sia una patologia relativamente meno comune e scarsamente studiata, risulta frequentemente associata a interessamento sistemico e sepsi e può essere considerata, nel cane maschio, una condizione assimilabile alla piometra per gravità, evoluzione clinica e gestione terapeutica.

Per questi motivi le due patologie prese in esame sono ritenute emergenze medico-chirurgiche e come tali trattate. In quest'ottica acquista crescente importanza l'individuazione di marcatori che agevolino l'esecuzione di una rapida e corretta diagnosi, che forniscano indicazioni sulla gravità del caso e consentano una stadiazione clinica del paziente, permettendo di eseguire le scelte terapeutiche più appropriate in ciascuna situazione e di indirizzare il trattamento monitorandone al contempo l'efficacia, e che,

infine, permettano in certa misura di fare previsioni sull'*outcome*. Simili indicatori, o *marker*, possono essere ricercati in ogni alterazione biologica (cellulare, biochimica o molecolare) misurabile e oggettivamente valutabile in relazione ad un processo fisiologico o patologico.

Per quanto riguarda la piometra, numerosi sono i *marker* di cui sono stati indagati il significato diagnostico, prognostico o di monitoraggio dell'evoluzione clinica del paziente, mentre mancano studi analoghi sulla prostatite/ascesso prostatico, apparentemente a causa della scarsa frequenza di questa patologia. La piometra, inoltre, essendo caratterizzata da elevata incidenza e da frequente evoluzione sistemica, rappresenta un ottimo modello di studio di sepsi spontanea nel cane ed è pertanto target di lavori incentrati sullo studio di questa condizione oltre che sulla patologia in sé.

La vasta letteratura riguardante gli indicatori associati alla piometra comprende quindi numerosi *marker* d'inflammazione sistemica, come Proteine di fase Acuta e Citochine, oltre che parametri ematobiochimici considerati più o meno di *routine*, parametri associati a danno d'organo e in particolare a danno renale, parametri di ipoperfusione tissutale (anch'essi associati all'inflammazione o meglio alle conseguenze della sepsi grave) e indicatori clinici, ognuno variabilmente correlato con la presenza della patologia, in forma localizzata o sistemica, con la gravità del quadro clinico e con l'*outcome*.

Nella parte generale della presente tesi, oltre descrivere brevemente le patologie prese in esame e a definire la condizione di sepsi, si offre una panoramica sui principali marcatori indagati in corso di piometra, fornendo un contesto bibliografico al lavoro di ricerca eseguito e descritto in seguito. Laddove in letteratura non risultassero studi incentrati su alcuni specifici marcatori, ritenuti di potenziale interesse, in relazione alla piometra, ci si è basati su lavori riguardanti l'inflammazione sistemica e la sepsi in senso lato.

Nella seconda parte del lavoro sono descritti i risultati dello studio sperimentale, i cui obiettivi erano quelli di indagare l'efficacia di parametri clinici e clinicopatologici come *marker* associati alla gravità del quadro clinico e quindi alla prognosi, in una popolazione di cani affetti da piometra o prostatite/ascesso prostatico.

PARTE GENERALE

CAPITOLO I

La piometra

1.1 Definizione, incidenza ed eziopatogenesi

Si definisce piometra l'infiammazione dell'utero caratterizzata da accumulo di materiale purulento all'interno del lume in seguito ad infezione batterica, che si verifica in associazione con una varietà di sintomi e cambiamenti patologici, tipicamente nelle cagne intere sessualmente mature durante o immediatamente in seguito ad una fase di dominanza progestinica (Dow, 1959 a, Hardy et Osborne, 1974, Smith, 2006, Pretzer, 2008).

Tale patologia è piuttosto frequente, colpendo circa il 24% delle femmine intere entro i 10 anni di età e fino al 50% delle cagne di determinate razze (Egenvall et al., 2001). Sono riportate incidenze variabili dal 2% circa in una popolazione mista (Gibson et al., 2013) al 15,2% in una colonia di Beagle con età superiore ai 4 anni (Fukuda, 2001).

Sebbene l'esatta eziopatogenesi della malattia resti fondamentalmente poco chiara, è comunemente accettato il ruolo del progesterone (Dow, 1959 b) che si trova ad agire su un endometrio precedentemente sensibilizzato dalla stimolazione estrogenica (Sugiura et al., 2004) facilitando l'instaurarsi di un'infezione opportunistica dell'utero. L'aumento dei livelli di progesterone che si verifica nella prima metà del diestro, infatti, oltre ad agire stimolando la proliferazione e secrezione delle ghiandole endometriali, inibendo la contrattilità del miometrio e inducendo la chiusura della cervice, risulta in un calo dell'immunità aspecifica (Sugiura et al., 2004) che costituisce la principale risposta immunitaria a livello di tratto genitale (Horne et al., 2008). Tale calo delle difese immunitarie favorisce la colonizzazione da parte di batteri arrivati in utero durante l'estro attraverso la cervice aperta (Sugiura et al., 2004).

Una risposta esagerata al progesterone da parte dei tessuti target, piuttosto che un'esposizione eccessiva o prolungata allo stesso, potrebbe essere alla base della

predisposizione a sviluppare la patologia (Verstegen et al., 2008). Hadley et al (1975) ipotizzarono che cambiamenti nel numero o nell'affinità dei recettori endometriali potessero indurre un accumulo locale degli ormoni steroidei inducendo lesioni istologiche (Faldyna et al., 2001).

Storicamente si ritiene che una degenerazione cistica dell'endometrio, o Iperplasia Endometriale Cistica (IEC), sia alla base della patogenesi della malattia fornendo le condizioni necessarie alla sovrainfezione batterica (Verstegen et al., 2008), tanto da parlare di Complesso Iperplasia Cistica – Piometra (Dow, 1959 a). Il succedersi delle stimolazioni ormonali durante i cicli estrali, avendo un effetto cumulativo sull'endometrio, porta col tempo allo sviluppo di IEC predisponendo quindi allo sviluppo della malattia (Dow, 1959 a). Tuttavia, poiché non tutti i casi di IEC evolvono necessariamente in piometra, alcuni Autori tendono a considerare i due processi patologici come entità separate, parlando di Iperplasia Endometriale Cistica - Mucometra in contrapposizione all'Endometrite - Piometra in relazione alla presenza di segni clinici e all'infiammazione indotta (De Bosschere et al., 2001). Un'ulteriore ipotesi patogenetica vede la piometra come conseguenza dell'ipertrofia ed iperplasia dell'endometrio indotta da uno stimolo primario, quale un'infezione subclinica o l'irritazione indotta da un corpo estraneo durante la fine dell'estro o l'inizio del diestro; tale ipotesi spiegherebbe la diagnosi di piometra in soggetti giovani che non abbiano avuto modo di sviluppare IEC nel tempo (Verstegen et al., 2008). La specie batterica principalmente coinvolta nello sviluppo di piometra, ovvero quella isolata dall'utero infetto nella maggior parte dei casi, è *Escherichia coli*; cloni identici di *E. coli* sono stati isolati sia dal retto che dall'utero di cagne infette, confermando l'origine ascendente dell'infezione a partire dalla flora fecale (Fransson, 2003, Bartoskova et al., 2007, Dabrowski et al., 2013 e 2015 a). Sandholm et al. (1975) suggerirono inoltre il tratto urinario come possibile serbatoio d'infezione, in quanto spesso è possibile isolare dalla vescica urinaria gli stessi batteri isolati dall'utero infetto (Sandholm et al., 1975, Fransson, 2003, Hagman et al., 2006 a, Küplülü et al., 2009, Maddens et al., 2011). Appare tuttavia più probabile che l'infezione urinaria sia contratta secondariamente all'infezione uterina (Fransson, 2003).

Si ritiene che i ceppi di *E. coli Uropatogeni* siano principalmente coinvolti nella patogenesi della piometra, aderendo in maniera specifica a particolari recettori presenti sull'endometrio sensibilizzato dal progesterone attraverso il Fattore di Virulenza

Uropatogenetico (UVF) (Verstegen et al., 2008, Krekeler et al., 2012, Hagman, 2014). Specie batteriche isolate con minor frequenza comprendono *Pseudomonas* spp, *Proteus* spp, *Klebsiella* spp, *Edwardsiella* spp e i gram-positivi *Stafilococcus* spp, *Streptococcus* spp e *Corinebacterium* spp (Fransson et al., 1997, Okano et al., 1998, Fransson, 2003, Bigliardi et al., 2004, Hagman et al., 2006 a, Küplülü et al., 2009, Maddens et al., 2011, De Clue et al., 2012, Dabrowski et al., 2013, Enginler et al., 2014, Jitpean et al. 2014 c, Karlsson et al., 2016). Le stesse specie batteriche possono essere isolate dal tratto vaginale di cagne sane in colonie pure o miste in diverse fasi del ciclo (Groppetti et al., 2012), il che conferma la natura opportunistica dell'infezione.

1.2 Segnalamento, presentazione clinica e diagnosi

La patologia colpisce generalmente cagne di età medio-avanzata, in accordo con quanto accennato in precedenza riguardo all'effetto cumulativo delle stimolazioni ormonali sull'endometrio durante successivi cicli estrali, con un'età media alla diagnosi di 6-9 anni (Egenvall et al., 2001, Gibson et al., 2013); non mancano tuttavia segnalazioni di soggetti presentati per piometra in seguito al primo calore e sono riportati *range* di età variabili tra i 4 mesi e i 19 anni (Pretzer, 2008, Gibson et al., 2013). Sembra inoltre che l'età media alla diagnosi risulti significativamente più bassa per determinate razze (come ad esempio Dogue de Bordeaux e Bullmastiff) e più elevata per altre (Border Collie e Yorkshire Terrier) (Gibson et al., 2013), suggerendo un certo grado di predisposizione genetica allo sviluppo della patologia (Egenvall et al., 2001, Gibson et al. 2013). Tali differenze, tuttavia, potrebbero semplicemente riflettere la differente durata di vita propria delle diverse tipologie canine (Egenvall et al., 2001). Pur non essendo stata dimostrata una chiara predisposizione genetica, alcuni studi indicano alcune razze come a maggior rischio di sviluppare piometra e tra queste si annoverano Bullmastiff, Golden Retriever e Dogue de Bordeaux (Gibson et al., 2013), Collie, Rottweiler, Bovaro Bernese e Cavalier King Charles Spaniel (Egenvall et al., 2001), San Bernardo, Chow Chow, Schnauzer nano, Irish Terrier, Airedale Terrier (Pretzer, 2008), Danese, Leonberger, Irish Wolfhound, Staffordshire Bull Terrier, Keeshond, Bull Terrier, Bovaro delle Fiandre e Newfoundland (Jitpean, 2015).

La diagnosi di piometra avviene, generalmente, tra le 4 settimane ed i 4 mesi dopo un estro manifesto (Smith, 2006). Si tratta di una patologia tradizionalmente considerata diestrale, per quanto approssimativamente un terzo delle diagnosi avvenga in animali in anestro (Noakes et al., 2001); Tale anestro potrebbe far seguito ad una normale fase luteinica oppure ad una fase prematuramente accorciata per effetto di prostaglandine endogene prodotte in risposta alla stessa infiammazione uterina (Verstegen et al., 2008).

Nella piometra, l'infiammazione a carico dell'utero si presenta spesso associata ad un coinvolgimento generale dell'organismo (Hardy e Osborne, 1974) e i sintomi riportati possono pertanto variare da localizzati a sistemici (Hagman, 2012). La presentazione clinica dipende essenzialmente dallo stato di pervietà della cervice e dal grado di coinvolgimento generale, in termini di risposta infiammatoria sistemica e compromissione della funzionalità organica (Jitpean, 2015). La pervietà della cervice influenza a sua volta il grado di affezione sistemica, in quanto cagne con piometra a cervice aperta presentano generalmente una minor compromissione generale (Pretzer, 2008, Dabrowski et al., 2013), anche grazie ad una maggior tempestività nella diagnosi (Verstegen et al., 2008). In questo caso, il più evidente tra i segni a carico dell'apparato genitale è la presenza di scolo vulvare maleodorante a carattere ematico o mucopurulento che nelle fasi iniziali della patologia può essere l'unico sintomo presente (Dow, 1959 a, Hardy e Osborne, 1974). Talvolta la quantità di scolo è minima e la sua presenza può essere rilevata soltanto dall'esame vaginoscopico o grazie all'esecuzione di un tampone vaginale, oppure è mascherata dall'autolambimento da parte della cagna stessa (Verstegen et al., 2008). Basandosi sui dati presenti in letteratura lo scolo vulvare è presente, tra gli altri sintomi, in una percentuale variabile tra il 52 (Fransson et al., 2004) e il 76,7% (Jitpean et al., 2014 a) delle cagne con piometra (Fransson et al., 2004, Dabrowski et al., 2009, 2015 b, Maddens et al., 2011, Enginler et al., 2014, Jitpean et al., 2014 a, 2014 c).

Gli altri segni clinici, caratterizzati da insorgenza graduale ed insidiosa, includono letargia, depressione, inappetenza, vomito, poliuria e polidipsia, diarrea, distensione addominale e disidratazione negli stadi più avanzati della patologia, accompagnati da febbre o ipotermia (Fransson et al., 2004, Hagman et al., 2006 a, Smith, 2006, Pretzer, 2008, Verstegen et al., 2008, Küplülü et al., 2009, Dabrowski et al., 2009, 2013, 2015 b, Jitpean et al., 2014 a, 2014 c, Enginler et al., 2014). Disturbi dell'appetito (inappetenza o anoressia) e polidipsia accompagnata da poliuria risultano i segni riscontrati più costantemente, con una frequenza

che arriva al 100% dei soggetti esaminati in alcuni studi (Küplülü et al., 2009, Dabrowski et al., 2009). Il vomito è presente nel 13-31% dei casi (Maddens et al., 2011, Jitpean et al., 2014 a, 2014 c, Dabrowski et al., 2015 b). Anche un certo grado di alterazione dello stato mentale, variabilmente descritto come apatia o letargia fino alla depressione, è tra i sintomi più costantemente rilevati, con una frequenza variabile tra il 63 e il 100% dei soggetti esaminati (Fransson et al., 2004, Dabrowski et al., 2009, 2015 b, Jitpean et al., 2014 a, 2014 c).

Alla visita clinica si rilevano febbre, più frequentemente rispetto all'ipotermia, (Jitpean et al., 2014 c), disidratazione soprattutto nei soggetti con cervice chiusa (Dabrowski et al., 2013), alterazione del normale colorito delle mucose (che si presentano iperemiche più spesso che pallide, Jitpean et al., 2014 a) (Hagman et al., 2006 a, Fransson et al., 2004, Dabrowski et al., 2015 b), dolore alla palpazione addominale (Hardy e Osborne, 1974, Fransson et al., 2004, Maddens et al., 2011).

Dal momento che nessuno di questi segni è di per sé indicativo di piometra, la patologia dovrebbe essere considerata tra le diagnosi differenziali di fronte a qualsiasi femmina intera nel periodo post-estrale (in senso lato) che presenti anche uno solo tra i sintomi sopra riportati (Verstegen et al., 2008). Possibili fattori di rischio quali pregressi trattamenti ormonali (a base di estrogeni o progestinici), nulliparità (Dabrowski et al., 2015 a) e presenza di anomalie anatomiche vestibolo-vaginali (setti o restringimenti) dovrebbero essere inoltre considerati (Pretzer, 2008).

Sebbene l'aumento di volume dell'utero risulti in alcuni casi facilmente percepibile alla palpazione, l'esame ecografico è ritenuto un metodo più sicuro e affidabile per fare diagnosi di piometra (Verstegen et al., 2008). L'ecografia, infatti, risulta sempre in grado di individuare la presenza di raccolta endoluminale e permette inoltre di valutare il grado di distensione uterina e lo spessore delle pareti, oltre che l'integrità dell'endometrio e la presenza di ghiandole cistiche (Bigliardi et al., 2004). Tuttavia la presenza di fluido endoluminale è caratteristica comune anche all'idrometra e alla mucometra e, sebbene l'ecogenicità possa essere indicativa di differente cellularità, può risultare molto complesso differenziare tali patologie dalla piometra dal punto di vista puramente ecografico; va sottolineato che la centesi ecoguidata del contenuto uterino è in genere sconsigliata a causa del potenziale rischio di peritonite (Davidson e Baker, 2009).

La diagnostica di laboratorio può supportare la clinica nella diagnosi di piometra e in particolare nella differenziazione tra piometra e idrometra/mucometra: la conta leucocitaria, la percentuale di neutrofili a banda, i livelli di monociti risultano più elevati (Fransson et al., 2004, Enginler et al., 2014), inoltre il livello di colesterolo risulta aumentato mentre i livelli di albumina risultano inferiori, rispetto ai casi di idrometra/mucometra (Hagman et al 2006 b, Hagman, 2014, Enginler et al., 2014).

I dati clinicopatologici più frequentemente riportati in corso di piometra includono leucocitosi neutrofilica con left shift, aumento della percentuale di neutrofili a banda, monocitosi, segni di moderata anemia normocitica normocromica non rigenerativa, calo dei linfociti; iperbilirubinemia e ipercolesterolemia, incremento di AST e ALP, azotemia prerenale e renale con incremento di BUN e creatinina, ipoalbuminemia e iperproteinemia (Fransson, 2003, Verstegen et al., 2008, Dabrowski et al., 2009, Hagman, 2012, Küplülü et al., 2009, Jitpean et al., 2014 b).

1.3 Trattamento e *outcome*

La piometra è considerata una condizione patologica in cui il rapido intervento terapeutico risulta fondamentale ad impedire un possibile esito infausto. La mortalità associata alla patologia, riportata in letteratura, varia tra il 3-4% circa (Egenvall et al., 2001, Gibson et al., 2013) e il 10% (Jitpean et al., 2014 a).

Il trattamento chirurgico mediante ovarioisterectomia, oltre ad essere storicamente il più praticato (Verstegen et al., 2008), risulta il metodo più sicuro per risolvere la piometra, in quanto permette l'immediata rimozione della sorgente dell'infezione, e l'unico in grado di prevenire la recidiva (Hardy e Osborne, 1974, Hagman, 2012). Ad oggi resta il trattamento di prima scelta (Bartoskova et al., 2007, Dabrowski et al., 2009, 2015 a, Jitpean et al., 2014 a) di fronte a soggetti di trascurabile valore riproduttivo dal momento che, ovviamente, l'ovarioisterectomia comporta la permanente infertilità della cagna. Il candidato alla chirurgia deve inoltre presentarsi in condizioni adeguate a supportare la procedura anestesiológica; quest'ultimo fattore costituisce il principale limite della terapia chirurgica (Verstegen et al., 2008). La procedura deve pertanto essere ritardata in favore di una stabilizzazione delle condizioni cliniche del paziente, tenendo tuttavia presente che un

eccessivo ritardo potrebbe esitare in complicazioni importanti quali la rottura uterina con conseguenti peritonite e sepsi (Fransson, 2003, Hagman, 2012). D'altra parte una corretta stabilizzazione con somministrazione di fluidi, correzione degli squilibri elettrolitici e dell'equilibrio acido-base e copertura antibiotica è utile per incrementare le possibilità di sopravvivenza e limitare le complicazioni associate alla sepsi presente nei casi più gravi (Conti-Patara et al., 2012).

La prevenzione di complicazioni intra- e postoperatorie dipende largamente da una corretta gestione e monitoraggio delle cagne (Dabrowski et al., 2007). Sono riportate complicazioni postoperatorie nel 25% delle cagne trattate con ovarioisterectomia (Jitpean et al., 2014 a) e tra le più importanti si annoverano sepsi e shock settico, infezioni batteriche disseminate, peritonite ed emorragie, oltre a infezioni del tratto urinario, difficoltà nella cicatrizzazione della ferita chirurgica, uveiti e aritmie cardiache (Dabrowski et al., 2009, Jitpean et al., 2014 a). La terapia chirurgica si associa generalmente ad una copertura antibiotica da proseguire nei 7-10 giorni successivi all'intervento (Bartoskova et al., 2007, Verstegen et al., 2008).

La terapia medica costituisce un'opzione riservata ai soggetti di cui si voglia preservare la fertilità e qualora la patologia si presenti in forma non grave, oppure a quegli animali in cui la chirurgia stessa o la procedura anestesiológica comporterebbero gravi rischi di complicazioni o morte (Jitpean, 2015); può inoltre essere tenuta in considerazione per tenere bassi i costi su richiesta del proprietario o messa in atto per migliorare lo stato generale del paziente in attesa della chirurgia (Fieni et al., 2014). Il trattamento medico è invece controindicato nei soggetti febbrili o ipotermici in cui si sospetti peritonite (Fieni et al., 2014).

La terapia medica prevede l'associazione di farmaci antibiotici ad altri principi attivi che inducano lo svuotamento dell'utero attraverso l'apertura della cervice e la stimolazione della motilità uterina; tali obiettivi possono essere raggiunti utilizzando da soli o in combinazione tra di loro prostaglandine naturali o di sintesi, come il *cloprostenolo*, antagonisti del progesterone, quali l'*aglepristone*, agonisti della dopamina, quali *bromocriptina* e *cabergolina* (Verstegen et al., 2008, Fieni et al., 2014, Jitpean, 2015). Ad oggi i trattamenti più utilizzati prevedono l'impiego di aglepristone da solo (Fieni, 2006, Fieni et al., 2014, Ros et al., 2014 Contri et al., 2015) o in combinazione con cloprostenolo (Fieni, 2006, Fieni et al., 2014). Gli effetti collaterali sono essenzialmente legati alle

prostaglandine che, alle dosi impiegate, possono indurre ipotermia, aumento della motilità intestinale e diarrea, salivazione e vomito, depressione o eccitazione con tremori; tali sintomi dipendono dall'azione del farmaco sulla muscolatura liscia e possono comparire risolvendosi poi spontaneamente nell'arco di un'ora dalla somministrazione (Fieni et al., 2014). La terapia medica risulta efficace nel 60-75% dei casi con l'impiego di solo aglepristone (Fieni, 2006, Ros et al., 2014); il tasso di successo cresce in seguito all'associazione con cloprostenolo a basse dosi arrivando all'84% circa (Fieni, 2006).

Il tasso di recidiva riportato in seguito a terapia medica è del 17-19% al primo o secondo ciclo successivo al trattamento (Trasch et al., 2003, Fieni, 2006, Contri et al., 2015); tuttavia, laddove sia stato possibile un più lungo *follow-up* delle cagne trattate, il tasso di recidiva riportato arriva al 48% (Ros et al., 2014).

CAPITOLO II

SIRS e sepsi

2.1 Definizioni, incidenza e *outcome*

L'espressione "Sindrome di Risposta Infiammatoria Sistemica", o *SIRS*, fu introdotta per la prima volta nel 1992 (ACCP/SVCC Conference) per definire la reazione infiammatoria sistemica scatenata in risposta ad un'infezione, fornendo però al contempo un quadro più ampio di applicazione della definizione stessa. Da allora il termine è entrato nel linguaggio medico comune per identificare la complessa serie di manifestazioni che risulta dall'attivazione sistemica della risposta immunitaria innata in seguito ad un insulto di varia natura, infettivo o non infettivo, traumatico, termico o neoplastico. Dal punto di vista clinico la *SIRS* è definita dalla presenza concomitante di due o più sintomi tra i seguenti: ipertermia o ipotermia, tachicardia, tachipnea, leucocitosi o leucopenia (Levy et al., 2003). La presenza contemporanea di infezione e di una risposta infiammatoria sistemica è definita *sepsi*; ne consegue che il termine *sepsi* identifichi la *SIRS* evocata da uno stimolo infettivo (primariamente di natura batterica, ma anche virale, fungina o protozoaria, come illustrato in Figura 2.1).

Si parla di *sepsi grave* in presenza di disfunzioni organiche, ipoperfusione o ipotensione, accompagnate da manifestazioni cliniche quali acidosi lattica, oliguria e alterazione dello stato mentale. Tale condizione può esitare in *shock settico*, qualora l'ipotensione determini un'insufficienza cardiocircolatoria persistente e non responsiva alla rianimazione mediante terapia fluida, e *sindrome di disfunzione organica (MODS, Multiple Organ Dysfunction syndrome)*. Quest'ultima si riferisce al deterioramento e allo squilibrio delle funzioni cardiovascolare, polmonare, renale, neurologica, emostatica, gastroenterica e/o epatica che si verifica secondariamente a *SIRS* o *sepsi*. Tali definizioni sono comunemente accettate sia in medicina umana (Levy et al., 2003) che veterinaria (Brady e Otto, 2001).

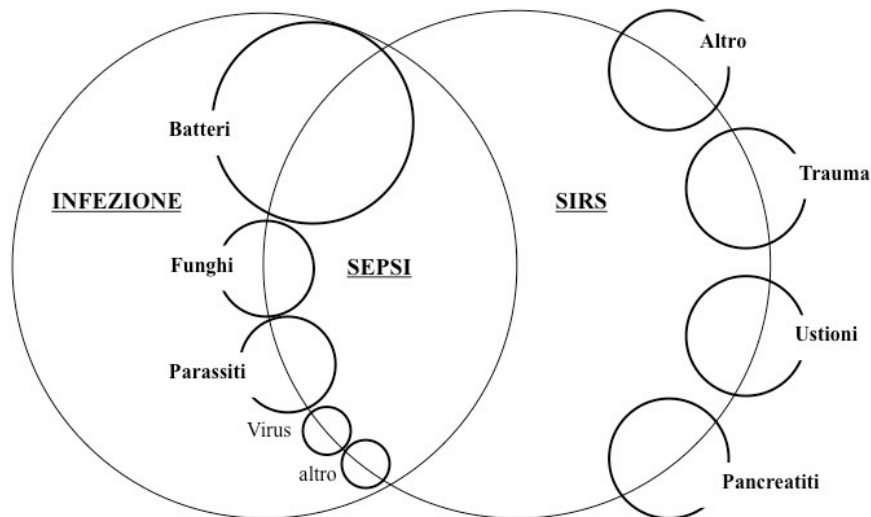


Figura XX. La relazione tra SIRS, sepsi e infezione (modificata da Bone et al., 1992).

L'esatta incidenza di sepsi tra gli animali domestici non è conosciuta, tuttavia un sondaggio svolto tra i membri di diverse società veterinarie americane la colloca tra il 6 e il 10% dei casi raccolti nella pratica clinica nell'arco di 5-10 anni (Otto, 2007). Il tasso di mortalità riportato nel cane varia tra il 20 e il 75% (Otto, 2007, Yu et al., 2010, Conti-Patara et al., 2012).

La suscettibilità dei pazienti settici a subire una progressione della patologia, fino allo sviluppo di shock e MODS, li pone ad elevato rischio di morte (Brady e Otto, 2001). Tale rischio aumenta proporzionalmente alla gravità della condizione: in umana si stima una mortalità del 10-20% per i casi di sepsi non aggravata da disfunzione organica o shock, ma sale al 20-50% in caso di sepsi grave fino al 40-80% in caso di shock settico (Martin, 2012).

2.2 Patogenesi della sepsi

In medicina veterinaria i batteri Gram-negativi sono descritti come la più comune causa di sepsi, in quanto responsabili di endotossiemia. L'endotossina batterica propria della parete dei Gram-negativi (lipopolisaccaride o LPS), infatti, rappresenta uno dei più potenti stimoli capaci di innescare la SIRS. Batteri Gram-positivi possono comunque causare sepsi,

mediata da esotossine solubili o da altre componenti della parete cellulare (Brady e Otto, 2001).

A prescindere dalla causa scatenante, la reazione è mediata da citochine prodotte inizialmente dall'attivazione dei macrofagi in risposta all'insulto, cui fa seguito una complessa interazione tra i macrofagi stessi, altri leucociti e cellule endoteliali, con produzione di ulteriori mediatori dell'infiammazione (tra cui eicosainoidi, prostaglandine, ossido nitrico, radicali liberi ed altre specie reattive dell'ossigeno, oltre alle citochine stesse) (Brady e Otto, 2001, Dabrowski et al., 2007). Una risposta bilanciata ed efficace è il prodotto dell'equilibrio tra reazione pro- ed anti-infiammatoria laddove lo squilibrio tra queste due controparti è alla base della risposta sproporzionata che caratterizza la SIRS. Tale situazione può derivare da un'eccessiva attività proinfiammatoria, da carenza di mediatori antinfiammatori o da paralisi immunitaria (ovvero eccesso di mediatori antinfiammatori) (Brady e Otto, 2001). Storicamente è riconosciuto, tra i mediatori proinfiammatori, il ruolo del Tumor Necrosis Factor (TNF) nella patogenesi di SIRS e shock settico, come confermato dal fatto che molti dei sintomi clinici associati alla sindrome della risposta infiammatoria sistemica possono essere riprodotti sperimentalmente con la somministrazione di questa citochina (Brady e Otto, 2001, Deutschman e Tracey, 2014). Oltre al TNF, l'interleuchina (IL)-1 e l'IL-6 sono classicamente annoverate tra i principali mediatori proinfiammatori, mentre IL-4 e IL-10 sono riconosciute come importanti citochine antinfiammatorie (Brady e Otto, 2001, DeClue et al., 2012). Sembra in effetti che l'infiammazione sistemica si articoli in due fasi, la prima caratterizzata da attività spiccatamente proinfiammatoria, cui fa seguito una tendenza verso la risposta antinfiammatoria e l'immunosoppressione; i pazienti in sepsi grave mostrano spesso sintomi tipici di uno stato di immunosoppressione, tra cui l'aumentata sensibilità ad infezioni nosocomiali. Ciò può essere spiegato da uno spostamento verso la produzione di citochine antinfiammatorie, dalla perdita della capacità delle cellule immunitarie di rispondere ad un antigene (*anergia*) e dalla perdita di cellule immunitarie dovuta ad aumento dell'apoptosi. (Hotchkiss e Karl, 2003). Oltre ai mediatori dell'infiammazione, anche la componente cellulare ha quindi un ruolo centrale nella patogenesi di SIRS. Come già accennato i macrofagi attivati sono fondamentali nell'innescare della risposta infiammatoria (Brady e Otto, 2001, Faldyna et al., 2001, Hotchkiss e Karl, 2003), tuttavia nei pazienti settici è frequente il reperto di

monociti/macrofagi “tolleranti”, ovvero incapaci di rispondere ai LPS ed altre molecole esogene ed endogene implicate nell’immunità naturale (Deutschman e Tracey, 2014). L’*anergia* coinvolge anche i linfociti: essi diventano resistenti all’attivazione e alla proliferazione (Hotchkiss e Karl, 2003, Deutschman e Tracey, 2014), come dimostrato anche in corso di piometra da Faldyna et al. (2001) in uno studio sull’immunosoppressione associata alla patologia, in cui si evidenziavano linfopenia e riduzione dell’attività dei linfociti misurata attraverso un test di proliferazione *in vitro*. Il calo dell’attività linfocitaria è inoltre legato all’apoptosi, un processo coinvolto nel fisiologico turnover delle cellule immunitarie, ma che accelera in maniera esagerata per linfociti e cellule dell’epitelio gastroenterico negli stati settici. (Remick, 2007, Deutschman e Tracey, 2014). Anche la capacità migratoria e la regolazione dell’attività dei neutrofili sono compromesse, risultando in una incapacità nel fagocitare e rimuovere l’agente patogeno; d’altro canto l’iperattività neutrofilica con eccessivo rilascio di ossidanti e proteasi da parte di queste cellule potrebbe essere coinvolta nel danneggiamento di tessuti e organi (Hotchkiss e Karl, 2003, Remick, 2007). Altre cellule coinvolte nella patofisiologia della risposta infiammatoria sistemica sono certamente le cellule endoteliali, il cui ruolo di interfaccia tra sangue e tessuti risulta compromesso con alterazioni della permeabilità che provocano perdita di mediatori e cellule dell’infiammazione nei tessuti (Deutschman e Tracey, 2014). La disfunzione endoteliale (legata sia all’effetto delle endotossine batteriche che dei mediatori dell’infiammazione) determina inoltre l’aumento dell’espressione di molecole di adesione e fattori procoagulanti sulla superficie cellulare, che causano squilibri nella coagulazione. Esistono prove di una stretta interazione reciproca tra sistema immunitario ed emostatico, entrambi coinvolti nel mantenimento dell’omeostasi: l’infiammazione grave determina un’attivazione sistemica della coagulazione (Coagulazione Intravasale Disseminata, CID) mentre alcuni dei fattori della coagulazione e le piastine sono dotati di attività proinfiammatoria (Brady e Otto, 2001, Remick, 2007, O’Brien, 2012). In corso di SIRS, inoltre, a livello endoteliale è stimolata la produzione di Ossido Nitrico; questo agisce a sua volta sui vasi inducendo un’intensa vasodilatazione arteriosa che è alla base dell’ipotensione refrattaria caratteristica dello shock settico. L’ipotensione arteriosa, la vasodilatazione sistemica ed il calo del ritorno venoso esitano in ipovolemia relativa, con compromissione della distribuzione di ossigeno ai tessuti. Tuttavia, in una prima fase (iperdinamica) dello shock settico, la vasodilatazione arteriosa attiva l’asse neuroumorale

(vasopressina) e diminuisce il postcarico determinando incremento dell'*output* cardiaco; successivamente (fase ipodinamica) i mediatori dell'inflammazione determinano depressione del miocardio, riduzione dell'*output*, aumento della permeabilità e perdita di controllo del tono vascolare, diminuzione del precarico, riduzione della secrezione di vasopressina e alterazioni del microcircolo. Questi meccanismi caratterizzano lo shock distributivo con ipoperfusione tissutale che contribuisce alla disfunzione organica (Conti-Patara et al., 2012).

Ulteriori e differenti ipotesi patogenetiche sono state formulate, negli ultimi anni, per spiegare la SIRS/sepsi e la sua progressione fino a shock e MODS.

Mentre lo shock settico, essendo legato ad un eccessivo rilascio di TNF, può essere considerato una patologia immunitaria (in quanto mediata direttamente dal sistema immunitario), sepsi grave e disfunzione organica sono piuttosto da considerare sindromi derivanti da un più generico *fallimento dell'omeostasi*, o meglio, da un'incapacità dell'organismo nel riportare l'omeostasi dopo che questa sia stata perturbata da un insulto. In una simile ottica, infatti, l'immunità fa parte di una risposta omeostatica atta a riportare l'equilibrio interno dell'organismo qualora alterato da uno stimolo avverso. Non solo l'innescò, quindi, ma anche la risoluzione della reazione infiammatoria sono fondamentali al mantenimento di un'omeostasi immunologica, cui collaborano i due maggiori sistemi regolatori dell'organismo: immunitario e neuroendocrino, grazie ad una serie di interazioni e feed-back. Più nel dettaglio, disfunzione organica e sepsi grave possono essere spiegate da due meccanismi patogenetici; secondo l'ipotesi dell'*incompetenza delle barriere*, in caso di sepsi grave si verifica un'insufficienza delle barriere intracellulari che regolano l'omeostasi stabilendo gradienti tra i vari compartimenti, cui consegue la comparsa di substrati cellulari nel circolo ematico (enzimi epatici, bile, creatinina ed altro) in assenza di segni apprezzabili di morte cellulare. Una seconda ipotesi patogenetica suggerisce che in corso di sepsi si verifichi una disfunzione mitocondriale, legata ad alterazioni nella catena di trasporto degli elettroni e delle membrane cellulari causata dalla produzione di radicali liberi, che provoca un'*alterazione della bioenergetica*; ciò porta all'esaurimento di ATP, cui le cellule dei diversi organi si adattano regredendo ad un più primitivo livello di attività ("*cellular hibernation theory*", Hotchkiss e Karl, 2003) e di conseguenza perdono le proprie peculiari funzioni (contrattilità nel caso dei miocardiociti, vasomotilità nel caso delle cellule endoteliali, sintesi e detossificazione per gli epatociti, riassorbimento da parte

delle cellule dei tubuli renali, e così via) portando alla disfunzione multiorganica (Deutschman e Tracey, 2014).

Secondo un approccio più tradizionale, la progressione da SIRS a MODS può essere spiegata dalla “*two-hit theory*”, secondo cui un insulto secondario in un paziente già colpito da infiammazione sistemica (ad esempio un secondo focolaio infettivo quale infezione a livello di sito del catetere venoso), causando una rinnovata stimolazione del sistema immunitario, sarebbe responsabile dell’amplificazione della risposta infiammatoria e quindi del deterioramento dei meccanismi omeostatici atti a regolarla (Saadia e Schein, 1999).

Risulta tuttavia riduttivo definire la risposta infiammatoria alla base delle manifestazioni cliniche di sepsi semplicemente come amplificata oppure ridotta, cercando di stabilire se si tratti di una reazione puramente iper- o ipo-infiammatoria; la risposta stessa è notevolmente complessa ed entrambi i meccanismi entrano in gioco in maniera soggettiva per ogni paziente (Remick, 2007). Fattori quali età, stato nutrizionale, malattie concomitanti, disfunzioni immunitarie preesistenti e fattori genetici potrebbero influenzare le caratteristiche della risposta immunitaria e la suscettibilità del singolo a sviluppare SIRS (Hotchkiss e Karl, 2003).

2.3 La sepsi: una sfida diagnostica

Dal punto di vista clinico le manifestazioni di SIRS sono multiformi e incostanti e non esiste un *gold standard* per identificare univocamente questa condizione. Tuttavia sono stati ideati criteri diagnostici basati su una serie di alterazioni clinicamente rilevabili, adattati e validati anche per i pazienti veterinari. Hauptman et al. (1997), modificando i criteri precedentemente proposti, ottennero un metodo che fornisse la massima sensibilità diagnostica (97% circa), se pur a discapito della specificità (64%), in modo da minimizzare il numero di falsi negativi, ovvero animali effettivamente settici ma non riconosciuti come tali e quindi soggetti a maggior rischio di morte. Considerarono SIRS positivo un animale che manifestasse due o più delle seguenti alterazioni cliniche:

- temperatura corporea $<38^{\circ}\text{C}$ o $>39^{\circ}\text{C}$;

- frequenza cardiaca >120 bpm;
- frequenza respiratoria >20 atti/minuto;
- conta leucocitaria (WBC) <6000 o >16000 cellule/ μ L, o percentuale di neutrofili a banda (PBN) >3% (Hauptman et al., 1997).

Tale sistema risulta ad oggi il più largamente impiegato per la diagnosi di SIRS nel cane (Fransson et al., 2007, Hagman et al., 2007, 2009 a, 2009 b, 2011, Pelander et al., 2008, Conti-Patara 2012, Karlsson et al. 2012, 2016, Sharif et al., 2013, Smith et al., 2014, Sant'Anna et al., 2014, Giunti et al., 2015).

Oltre a quelli sopra menzionati, altri segni possono essere indicatori di infiammazione sistemica e quindi contribuire alla diagnosi. Essi includono parametri generali (tra cui alterazione dello stato mentale, presenza di edemi e iperglicemia), parametri strettamente legati all'infiammazione (tra cui alcuni *marker* specifici, come le Proteine di Fase Acuta, di cui si parlerà più avanti in dettaglio), parametri emodinamici (che comprendono, come conseguenza degli squilibri emodinamici, parametri di disfunzione organica) e di perfusione tissutale (Tabella 1) (Levy et al., 2003). In presenza di concomitante infezione o sospetta infezione, si definisce il paziente settico.

Infezione	Confermata o sospetta, <i>oltre</i> a parte dei parametri a seguire:
Parametri generali	Febbre o ipotermia Tachicardia Tachipnea Stato mentale alterato Edema Iperglicemia
Parametri infiammatori	Leucocitosi o leucopenia WBC normale con >10% di forme immature Proteina C-Reattiva sopra i livelli normali Procalcitonina sopra i livelli normali
Parametri emodinamici	Ipotensione arteriosa Saturazione di ossigeno venoso misto <70% Parametri di disfunzione organica Ipossiemia arteriosa Oliguria acuta Aumento della creatinina Alterazioni emostatiche Ileo Trombocitopenia

Iperbilirubinemia	
Parametri di perfusione tissutale	Iperlattatemia Ridotto riempimento capillare o petecchie

Tabella 2.1. Possibili alterazioni e segni clinici suggeriti come criteri diagnostici di sepsi in medicina umana; è importante sottolineare che nessuno di essi è specifico per la sepsi (modificato da: Levy et al., 2003).

Un particolare accento viene posto sulla diagnosi di sepsi, rispetto alla SIRS non infettiva, in quanto un suo rapido ed efficace riconoscimento permette di impostare una terapia nei confronti dell'infezione stessa, trattando la causa della sindrome e non solo i sintomi; le terapie antibiotiche sono, poi, ampiamente e prontamente accessibili nella pratica clinica (Levy et al., 2003). Purtroppo non è sempre possibile confermare l'infezione sistemica: l'emocoltura, oltre a richiedere tempo, risulta diagnostica in meno del 50% dei casi negli stadi avanzati di sepsi e praticamente inefficace negli stadi precoci (Karlsson, 2015); la diagnosi rimane pertanto essenzialmente clinica (Lever e Mackenzie, 2007). Tuttavia, i criteri clinici da soli possono rivelarsi inefficaci nell'identificazione e nella stratificazione dei pazienti colpiti, motivo per cui vi si affianca la valutazione di un'ampia gamma di possibili *marker* (Giunti et al., 2015), come si vedrà in seguito. Rapidità e capacità di stabilire la gravità della condizione sono cruciali nell'iter diagnostico, in quanto permettono di mettere in atto quanto prima strategie salva-vita che limitino la progressione verso shock, disfunzione multiorganica e morte. Un buon criterio diagnostico dovrebbe pertanto essere facilmente disponibile, accessibile sia ai clinici che ai ricercatori durante la progettazione di studi prospettici, ampiamente applicabile, dotato di massima sensibilità in modo da consentire l'identificazione del maggior numero possibile di soggetti malati, riducendo al minimo l'inevitabile sacrificio di specificità (Levy et al., 2003) e correlato con la gravità del quadro clinico. D'altra parte una scarsa specificità conduce inevitabilmente ad un incremento nei falsi positivi cui consegue un abuso nella somministrazione di terapie antibiotiche; ciò contribuisce alla diffusione dell'antibiotico-resistenza, che, a lungo termine, potrebbe tradursi in un incremento complessivo della mortalità associata a sepsi (Karlsson et al., 2016).

2.4 Sepsi e piometra

La piometra, come già accennato, può determinare nella cagna un certo grado di coinvolgimento generale (Hardy e Osborne, 1974): ciò è dovuto alla progressione dell'infiammazione da una forma localizzata a una forma sistemica, principalmente ad opera delle endotossine batteriche liberate dal focolaio infettivo uterino. In base ai dati riportati in un certo numero di lavori, la SIRS, che in questo caso può essere definita sepsi, è presente in una percentuale variabile dal 57 all'82,5% dei casi di piometra (Fransson et al., 2007, Pelander et al., 2008, Hagman et al., 2009 a, Hagman, 2011, Karlsson et al., 2012, 2013, 2016, Sharif et al., 2013, Jitpean et al., 2014 c, Sant'Anna et al., 2014). Ciò comporta un incremento della morbilità e un peggioramento della prognosi delle cagne colpite (Fransson et al., 2007, Sant'Anna et al., 2014), sebbene alcuni Autori siano discordi e ritengano che la SIRS non si associ a un significativo aumento dei tempi di ospedalizzazione (Hagman et al., 2009 a, 2011). Sembra comunque che la patologia abbia scarsa tendenza alla progressione verso sepsi grave e MODS, come testimoniato dalla bassa mortalità rilevata tra le cagne affette da piometra e SIRS positive (circa il 3%) in confronto alla mortalità legata a sepsi in generale (Fransson et al., 2007).

In virtù dell'elevata incidenza della patologia e della frequenza con cui si manifesta una progressione verso l'infiammazione sistemica, la piometra rappresenta inoltre un ottimo modello di studio di sepsi spontanea nel cane (Conti-Patara et al., 2012). La sepsi, infatti, può essere prodotta sperimentalmente (Song et al., 2012, Floras et al., 2014 a) ma i modelli sperimentali hanno minor rilevanza clinica e potrebbero non riflettere adeguatamente la situazione che si verifica nei casi spontanei di infiammazione sistemica, a causa delle massicce quantità di endotossine utilizzate per indurla (Hotchkiss e Karl, 2003, Remick, 2007, Floras et al., 2014 a). La sepsi spontanea nel cane rappresenta anche un ottimo modello per lo studio della patologia nell'uomo, viste le numerose analogie presenti tra le due specie per quanto concerne patofisiologia e manifestazioni cliniche dell'infiammazione sistemica (Hagman et al., 2009 b).

CAPITOLO III

I biomarcatori

3.1 Definizione e caratteristiche

Il marcatore biologico, o *biomarker*, fu inizialmente definito come un'alterazione cellulare, biochimica o molecolare, misurabile in un substrato biologico quale tessuto, cellula o fluido corporeo. Il concetto è stato successivamente ampliato a comprendere una qualsiasi caratteristica oggettivamente misurabile che possa essere valutata come indicatore di normali processi biologici, processi patogenetici o risposte farmacologiche ad un intervento terapeutico (Naylor, 2003, Mayeux, 2004). L'impiego dei *biomarker* copre diversi campi della medicina, tra cui utilizzo e sviluppo di strumenti e tecnologie, sviluppo e monitoraggio di terapie farmacologiche, acquisizione di conoscenze riguardanti la previsione, le cause scatenanti, la progressione, la regressione, l'*outcome*, la diagnosi e il trattamento delle patologie (Naylor, 2003).

Il ruolo dei biomarcatori ha acquistato crescente interesse sia in medicina umana che veterinaria e numerose sono le patologie prese in esame allo scopo di identificare *marker* utili. Essi riconoscono tre principali impieghi in relazione al processo patologico: possono avere, infatti, un significato diagnostico, di monitoraggio o prognostico. I *marker* impiegati a scopo diagnostico sono quelli che consentono un'identificazione precoce della patologia e permettono di definirne la gravità; in questo caso un buon *marker* deve essere caratterizzato da un cambiamento rapido e facilmente misurabile, possibilmente proporzionato all'entità del processo in atto. Un *marker* utile nel monitoraggio, invece, deve garantire anche una rapida "normalizzazione" durante la ripresa del paziente in modo da poter valutare l'efficacia degli interventi terapeutici. Infine, i *marker* possono essere indicatori prognostici, correlabili quindi con l'*outcome* e/o con la risposta del paziente al trattamento (Jitpean, 2015).

Più in generale un buon marcatore deve essere facilmente e agevolmente misurabile e, nel contesto della pratica clinica, la valutazione dovrebbe poter essere eseguita *cage-side*; facendo riferimento a un *marker* da ricercare in un campione biologico, ad esempio, il campionamento deve essere agevole, la molecola stabile, le metodiche analitiche affidabili e rapide, il test economicamente vantaggioso (Jitpean, 2015).

Bisogna comunque tenere conto che ciascun marcatore risente di una certa variabilità, sia interindividuale, dovuta alle differenze tra soggetto e soggetto, che intraindividuale, legata invece a variazioni o errori nella misurazione su uno stesso soggetto; vi è poi una variabilità di gruppo, che spesso rappresenta una caratteristica voluta e sfruttata dallo studio (si pensi, ad esempio, alla misurazione di un *marker* in un gruppo di malati contrapposto ad un gruppo di sani) (Mayeux, 2004).

3.2 Biomarker in corso di piometra

Come già accennato, la piometra rappresenta una potenziale emergenza medico-chirurgica, associata a un concreto rischio di morte per l'animale se non adeguatamente trattata. Il corretto trattamento dipende da una corretta diagnosi, da un buon tempismo nell'effettuarla, dalla capacità di definire la gravità della condizione clinica del paziente e di scegliere la terapia migliore. Da questo punto di vista numerose variabili associate alla patologia possono essere impiegate come *marker* utili per indirizzare e supportare le scelte cliniche, ne sono prova i molteplici lavori che costituiscono la letteratura scientifica sull'argomento e i diversi gruppi che si dedicano allo studio della patologia sotto diversi aspetti (tra cui Fransson e collaboratori, Hagman e collaboratori, Dabrowski e collaboratori, Jitpean e collaboratori, Karlsson e collaboratori).

Gli indicatori presi in esame possono innanzitutto avere utilità diagnostica nel discriminare la piometra dalle altre patologie uterine, ugualmente caratterizzate da raccolta endoluminale e/o degenerazione dell'endometrio ma non associate a infezione, quali mucometra, idrometra e iperplasia endometriale cistica. Queste ultime sono contraddistinte dalla quasi totale assenza di segni clinici e non rappresentano una minaccia per la vita, pertanto sono soggette a un differente approccio terapeutico (Fransson et al., 2004, Hagman et al., 2006 b, Enginler et al., 2014, Hagman, 2014).

Sono utili nella diagnostica differenziale molti dei segni clinici associati alla ripercussione generale della patologia (come ad esempio le alterazioni dello stato mentale e delle grandi funzioni organiche) e alcuni dei parametri ematobiochimici di base (tra cui conta leucocitaria, forme granulocitarie immature, livello di colesterolo e albumina), oltre a *marker* di infiammazione e altri marcatori specifici (Fransson et al., 2004, Hagman et al., 2006 b). La semplice conta leucocitaria può aiutare a distinguere tra la piometra e le raccolte non infette, essendo mediamente più elevata nel primo caso (Enginler et al., 2014). Buoni livelli di sensibilità nella discriminazione tra piometra e mucometra sono stati raggiunti utilizzando la percentuale di neutrofili a banda (PBN) sia come unico parametro (Se 94%, con Sp 70%) che in combinazione con i livelli di Proteina C-Reattiva (CRP) (Se 97,7%, con Sp 75%) (Fransson et al., 2004). Combinando Fosfatasi Alcalina e PBN è possibile aumentare la specificità del criterio (7,8%) a scapito della sensibilità (Fransson, 2003).

La valutazione del PGM, un *marker* uterino specifico, permette un incremento della specificità (90,9%) se considerato da solo (con Se 96,6%), massimizzando la sensibilità quando usato come criterio in combinazione con la percentuale di neutrofili a banda (Se 100%, Sp 81,1%). Il PGM, o PGFM (15-keto-13,14-diidro- PGF_{2α}), è il principale metabolita circolante della prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), prodotta dal tessuto uterino durante l'infiammazione, specialmente in risposta alle endotossine batteriche (Hagman et al., 2006 a, 2006 b, Sharif et al., 2013). D'altra parte, uno studio più recente non ha rilevato differenze significative nei livelli di PGM circolante tra soggetti affetti da piometra e da IEC, ponendone in dubbio l'utilità quale *marker* diagnostico; gli Autori non escludono tuttavia che tale risultato potesse essere imputabile a differenze nella metodica usata per misurare il PGM e/o alla minor frequenza con cui *E.coli*, principale fonte di endotossine, fosse coinvolto nell'infezione uterina rispetto allo studio di Hagman et al. (Enginler et al., 2014).

Stabilire la gravità delle condizioni cliniche può essere fondamentale per un corretto approccio temporale alla terapia. In altre parole, laddove un caso grave viene trattato come un'emergenza programmando la chirurgia nel brevissimo tempo, un caso più lieve può andare incontro ad una chirurgia programmata. In condizioni di gravità ancora maggiore, con forte compromissione generale, si sceglie piuttosto di ritardare il trattamento chirurgico in favore di una stabilizzazione dell'animale, o addirittura di non procedere alla

chirurgia qualora lo stato del soggetto sia incompatibile con la procedura (Verstegen et al., 2008). In questo senso un *marker* associato alla gravità fornisce anche una misura dell'urgenza con cui approcciarsi al caso e influenza fortemente le scelte terapeutiche.

Molti dei *marker* presi in esame, sia con significato strettamente diagnostico che di stadiazione della patologia, sono associati alla risposta infiammatoria sistemica: la maggior parte dei soggetti colpiti da piometra, infatti, manifesta SIRS (Fransson et al., 2007, Pelander et al., 2008, Hagman et al., 2009 a, Hagman, 2011, Karlsson et al., 2012, 2013, 2016, Sharif et al., 2013, Jitpean et al., 2014 c, Sant'Anna et al., 2014). Essi comprendono *marker* infiammatori in senso stretto (tra cui Proteine di Fase Acuta e citochine), parametri ematobiochimici e clinici, parametri associati a ipossia tissutale quali la lattatemia e parametri associati al danno d'organo. Per quanto riguarda questi ultimi, si tratta in particolare di *marker* associati al danno renale che potenzialmente si verifica in conseguenza di un insulto settico (Keir e Kellum, 2015), come in corso di piometra (Heiene et al., 2001, 2007, Zaragoza et al., 2004, Maddens et al., 2010, 2011).

Tale ragionamento può essere esteso ai *marker* con significato prognostico in quanto le ripercussioni sistemiche della progressione a SIRS comportano un aggravamento del quadro clinico, che generalmente è associato ad una prognosi peggiore sia in termini di mortalità che di aumento dei tempi di recupero (Fransson et al., 2007, Sant'Anna et al., 2015).

Altri indicatori sono utili nel periodo postoperatorio per il monitoraggio del paziente, e forniscono anch'essi informazioni sull'*outcome* (Dabrowski et al., 2007, 2015 a, 2015 b, Jitpean et al., 2014 a, 2014 b).

È importante poi non dimenticare che la piometra, quale modello di sepsi spontanea, è anche target di lavori che prendono specificamente in esame *marker* di infiammazione a prescindere dalla patologia sottostante (de Laforcade et al., 2003, Nakamura et al., 2008, Kjelgaard-Hansen et al., 2007, Yu et al., 2010, Yuki et al., 2010, Conti-Patara et al., 2012, Karlsson et al., 2013, 2016, Haas et al., 2015, Torrente et al., 2015).

Volendo osservare la questione da due prospettive opposte, quindi, da una parte la piometra rappresenta un ottimo modello di sepsi che permette di studiarne gli specifici *marker* (Conti-Patara et al., 2012) in quanto patologia frequentemente associata a infiammazione sistemica, dall'altra, essendo la sepsi legata a un incremento della

mortalità, lo studio degli indicatori di SIRS in corso di piometra diventa importante ai fini del riconoscimento dei pazienti soggetti a maggior rischio di morte (Jitpean 2015).

3.2.1 Parametri ematobiochimici

Come accennato in precedenza, alcune alterazioni ematobiochimiche appaiono con una certa costanza nei soggetti colpiti da piometra e riflettono l'infiammazione e il coinvolgimento sistemico (Karlsson et al., 2016). In generale, l'entità delle alterazioni è correlata con la prognosi (Küplülü et al., 2009).

La più caratteristica tra le alterazioni ematologiche è una leucocitosi neutrofilica (da inserire nel quadro più ampio del leucogramma infiammatorio: neutrofilia, linfopenia e monocitosi) accompagnata da *left shift*, ovvero aumento delle forme immature rappresentate essenzialmente dai neutrofili a banda (Dow, 1959 a, Sandholm et al., 1975, Fransson et al., 1997, Faldyna et al., 2001, Fransson, 2003, Hagman et al., 2006 a, 2009, Plavec et al., 2006, Fransson et al., 2007, Bartoskova et al., 2007, Dabrowski et al., 2007, 2009, 2013, Küplülü et al., 2009, Sharif et al., 2013, Jitpean et al., 2014 c, 2015, Jitpean, 2015, Karlsson et al., 2016). L'aumento delle forme immature nel sangue può essere spiegato dalla *paralisi dei neutrofili* che si verifica in corso di sepsi, cui conseguirebbe un aumento della produzione e un rilascio precoce dei granulociti immaturi per far fronte alla ridotta funzionalità di quelli già in circolo (Hwang et al., 2015).

Lo spostamento a sinistra è tendenzialmente più marcato nei soggetti settici (Fransson, 2003), in accordo col fatto che la percentuale di neutrofili a banda (PBN) rientra tra i criteri per la diagnosi di SIRS (Hauptman et al., 1997); ciò nonostante non sempre sono rilevate differenze significative nella PBN tra soggetti SIRS-positivi e SIRS-negativi colpiti da piometra (Fransson et al. 2007). Sembra inoltre che il *left shift* sia maggiore nei soggetti in cui l'infezione è sostenuta da batteri Gram-negativi piuttosto che Gram-positivi, evidenziando il ruolo delle endotossine nella patogenesi dell'infiammazione sistemica (Fransson, 2003).

La percentuale di neutrofili a banda rappresenta comunque un buon *marker* prognostico, infatti una PBN >10% è stata significativamente associata a un incremento del rischio di morte (Küplülü et al., 2009).

Delta Neutrophil Index (DNI)

Recentemente, l'avvento di analizzatori ematologici automatizzati ha permesso l'individuazione di un parametro che fornisce la misura della frazione di granulociti immaturi nel sangue: il *Delta Neutrophil Index* o DNI (Nahm et al., 2008). I contacellule elettronici ADVIA (Siemens, USA), in particolare, eseguono il conteggio differenziale dei leucociti basandosi su due diversi sistemi: una reazione citochimica alla mieloperossidasi (MPO, enzima battericida contenuto nelle cellule mieloidi e in particolare nei granulociti neutrofili, Klenner et al., 2010) e la rifrazione di un raggio luminoso sulle lobularità del nucleo cellulare; quest'ultima individua la frazione di polimorfonucleati maturi, con nucleo polilobato. Il DNI è ricavato dalla differenza tra questi due parametri ed è stato proposto in medicina umana come *marker* di sepsi dotato di un potenziale significato prognostico, essendo associato a gravità del quadro clinico e mortalità (Nahm et al., 2008, Hwang et al., 2015). Il valore di DNI cresce proporzionalmente alla presenza di SIRS, sepsi grave e shock settico ed è correlato con la presenza di coagulazione intravasale disseminata, manifesta o non; si tratta inoltre di un *marker* precoce, la cui alterazione può essere rilevata prima che intervengano i segni clinici di insufficienza organica o circolatoria e quindi potenzialmente utile nell'individuare i pazienti a maggior rischio di progressione della patologia. Tuttavia, è un indicatore non specifico d'infezione, in quanto la quota circolante di granulociti immaturi può risultare aumentata anche in corso di patologie di diversa natura, quali malattie mieloproliferative, infiammazioni croniche, danno tissutale, emorragia acuta e neoplasia (Park et al., 2011).

La leucopenia è rilevata più raramente nei soggetti malati ma risulta associata con un significativo prolungamento dei tempi di ospedalizzazione; ciò suggerisce l'esistenza di una correlazione tra leucopenia e gravità della patologia, conferendo un significato prognostico a tale alterazione (Jitpean et al., 2014 b, Jitpean, 2015). Neutropenia e linfopenia sono associate ad un incremento della mortalità anche nei pazienti settici umani (Jiménez-Ibàñez et al., 2012, Drewry et al., 2014).

Analogamente, una conta leucocitaria nei *range* di riferimento è associata a maggior rischio di prolungata ospedalizzazione in quanto potrebbe riflettere una transizione da leucocitosi a leucopenia (intesa come neutropenia, oltre che linfopenia). Questo può

accadere come conseguenza della depressione midollare dovuta all'effetto delle endotossine durante la cronicizzazione dell'inflammatione e della perdita di globuli bianchi nel lume uterino (Jitpean et al., 2014 b).

La linfopenia, più costante della neutropenia in corso di piometra, è proporzionale con la gravità del quadro clinico e fornisce una misura dell'immunosoppressione associata alla patologia (Faldyna et al., 2001).

Altro comune riscontro è una lieve anemia, rispecchiata da un calo dei valori di ematocrito (HCT), emoglobina (Hb) e numero di eritrociti (RBC) (Fransson, 2003, Plavec et al., 2006, Hagman et al., 2006 a, Enginler et al., 2014, Jitpean et al., 2014 b, 2015, Dabrowski et al., 2015 a, Karlsson, 2015). L'anemia, normocitica normocromica e non rigenerativa, può essere conseguenza dell'effetto tossico delle endotossine sul midollo osseo eritropoietico, della ridotta sopravvivenza degli eritrociti e della perdita di queste cellule per diapedesi nel lume uterino. Inoltre, le patologie infiammatorie acute e croniche sono associate a un aumento dell'affinità per il ferro da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale (mediata dalla lattoferrina e da altre proteine di fase acuta prodotte durante l'inflammatione) e a ridotta capacità totale di legare il ferro (TIBC, *Total Iron Binding Capacity*); possono di conseguenza provocare carenza di questo elemento e quindi anemia (Fransson, 2003; Plavec et al., 2006, Hagman et al., 2009 a).

Il profilo biochimico può rivelare iperproteinemia, indice di produzione anticorpale e sintesi delle Proteine di Fase Acuta, associata ad ipoalbuminemia (Børresen e Skrede, 1980, Fransson, 2003, Hagman et al., 2009 a, Hagman, 2011, Maddens et al., 2011). L'ipoalbuminemia rientra nel quadro della risposta di fase acuta, essendo l'albumina una Proteina di Fase Acuta negativa, ma può essere aggravata dall'aumento della permeabilità vascolare che si verifica in corso di sepsi ed endotossiemia (Brady e Otto, 2001, Plavec et al., 2006) e dall'aumentata degradazione dell'Albumina a livello dei siti di inflammatione (Mazzaferro et al., 2002) oltre che dalla perdita attraverso il filtro glomerulare (Maddens et al., 2010).

La presenza di una leggera sofferenza epatica è rispecchiata dall'incremento di AST, ALP e livelli di colesterolo, mentre l'ALT risulta generalmente nei *range* (Plavec et al., 2006, Küplülü et al., 2009, Hagman et al., 2009 a) suggerendo l'assenza di un vero e proprio

danneggiamento degli epatociti; simili alterazioni riflettono piuttosto la colestasi intraepatica (Fransson, 2003, Hagman et al, 2006 a, 2009 a) che è stata descritta in corso di piometra (Børresen e Skrede, 1980), mentre la funzionalità del fegato rimane conservata (Fransson, 2003). Il moderato aumento degli enzimi epatici e l'iperbilirubinemia sono comuni negli stati di sepsi e sono spesso riportati in medicina veterinaria; l'iperbilirubinemia è dovuta, in parte, ad un effetto inibitorio delle endotossine batteriche sulle pompe di membrana che convogliano la bilirubina coniugata nei canalicoli biliari, in parte all'effetto dei mediatori dell'infiammazione sugli epatociti con depressione dei trasportatori di membrana per gli acidi biliari (Brady e Otto, 2001).

L'iperazotemia è un altro riscontro variabilmente associato alla piometra (presente nel 15-31% dei casi secondo quanto riportato da Fransson, 2003). Alcuni Autori sono concordi nel riportare aumento dei livelli di BUN (o Urea) e Creatinina nella maggior parte dei soggetti colpiti (Dabrowski et al., 2009, 2013, Sant'Anna et al., 2014, Jitpean, 2015), laddove in altri studi non sono state riscontrate differenze significative tra gli animali malati e i sani (Plavec et al., 2006, Hagman et al., 2006 a, 2009 a, Küplülü et al., 2009, Maddens et al., 2011) o, in presenza di differenze tra i due gruppi, i parametri rimanevano comunque entro i *range* di riferimento (Sharif et al., 2013, Jitpean et al., 2015). L'azoto ureico può addirittura essere ridotto rispetto ai soggetti sani (Fransson, 2003, Hagman et al., 2009 a) in conseguenza della poliuria, che ne aumenta l'escrezione, e della ridotta assunzione di cibo legata al calo di appetito nei soggetti compromessi. I livelli di BUN potrebbero inoltre risultare bassi a causa di insufficienza epatica, che tuttavia, come già riportato, si può escludere nelle cagne affette da piometra (Fransson, 2003).

In ogni modo un incremento marcato dell'azotemia può essere ritenuto un *marker* prognostico, in quanto elevati valori di Creatinina (Plavec et al., 2006, Jitpean 2015) e di BUN (Küplülü et al., 2009) sono risultati significativamente associati con aumento dei tempi di ospedalizzazione e/o morte.

Ipo- ed iperglicemia sono poco comuni nei soggetti con piometra (rispettivamente presenti nel 9 e 4% dei casi, Fransson, 2003) indipendentemente dalla presenza di infiammazione sistemica. In generale la sepsi può accompagnarsi ad iperglicemia, dovuta negli stadi iniziali a una stimolazione della glicogenolisi ad opera di ormoni quali epinefrina, GH e cortisolo (Bardy e Otto, 2001) e mantenuta dall'instaurarsi di uno stato di insulino-resistenza (cosiddetto diabete da stress) (Remick, 2007). Malgrado ciò, in medicina

veterinaria, i livelli di glucosio non sono considerati tra i *marker* di sepsi in quanto non sono riportate differenze significative tra soggetti SIRS-positivi e SIRS-negativi (Hauptman et al., 1997), anche nei soggetti affetti da piometra (Hagman et al., 2009 a). Nei pazienti ricoverati in terapia intensiva (ICU), tuttavia, l'iperglicemia da stress è di frequente riscontro e può essere associata con un incremento del rischio di morte, essendo l'*upregulation* dell'asse adrenocorticale e l'insulino-resistenza secondaria proporzionali alla gravità della patologia in atto (Hayes et al., 2010).

Anche l'ipoglicemia è stata associata con un peggioramento della prognosi in termini di prolungamento dei tempi di ospedalizzazione; risulta inoltre correlata con la presenza di complicazioni quali la peritonite nei soggetti affetti da piometra (Jitpean, 2015).

3.2.2 Parametri della coagulazione e piastrine

La sepsi è associata allo sviluppo di uno stato di ipercoagulabilità, legato al rilascio delle citochine proinfiammatorie e alla produzione di Fattore Tissutale che determinano attivazione della coagulazione; contemporaneamente si assiste all'inibizione del sistema fibrinolitico e riduzione o esaurimento dei principali anticoagulanti endogeni, di cui Antitrombina (AT) e Proteina C (PC) rappresentano i maggiori esponenti. Lo stato di ipercoagulabilità conduce successivamente allo sviluppo di Coagulazione Intravasale Disseminata (CID), che a sua volta determina esaurimento di piastrine e fattori della coagulazione. La CID, inoltre, contribuisce allo sviluppo di MODS nei pazienti settici (Brady e Otto, 2001, de Laforcade et al., 2003, Semeraro et al., 2010, O'Brien, 2012).

Una certa tendenza allo sviluppo di CID è stata osservata anche tra le cagne affette da piometra (de Laforcade et al., 2003, Plavec et al., 2006), come dimostrato dall'alterazione di alcuni dei parametri della coagulazione, in particolare: leggero prolungamento dell'aPTT (tempo di tromboplastina parziale attivata), iperfibrinogenemia e calo del TT (tempo di trombina), aumento dei D-dimeri e trombocitopenia (Plavec et al., 2006). L'iperfibrinogenemia è conseguenza della risposta di fase acuta, già osservata da Børresen e Skrede (1980) nella piometra e variazioni nel TT (tempo necessario per la formazione di fibrina dopo l'intervento della trombina) rispecchiano le alterazioni quali-quantitative della molecola di fibrinogeno; un aumento dei livelli ematici di questa proteina, inoltre, può essere fisiologicamente osservato nelle cagne durante il diestro, fase in cui la piometra è

solita manifestarsi (Gunzel-Apel et al., 1997, Plavec et al., 2006). La mancata alterazione del PT (tempo di protrombina) e la lieve alterazione dell'aPTT testimoniano, da un lato, l'assenza di un danno epatico tale da influenzare la produzione dei fattori della coagulazione, dall'altro, una mancata deplezione da consumo di questi ultimi; il consumo, infatti, interviene in uno stadio più avanzato ad opera della CID. Le alterazioni della coagulazione in corso di piometra, quindi, sono da ascrivere alla stimolazione delle vie della coagulazione legate all'endotossiemia e alla risposta infiammatoria e vengono generalmente rilevate prima che si verifichi consumo dei fattori legato all'iperattivazione della coagulazione. Tuttavia l'aumento dei D-dimeri, indicatori di fibrinolisi e *marker* sensibile e specifico per il rilevamento della CID, testimonia una tendenza a sviluppare coagulazione disseminata (Plavec et al., 2006). Questa tendenza trova conferma anche in uno studio riguardante le alterazioni emostatiche in un gruppo di cani colpiti da sepsi spontanea, in cui su cinque soggetti che presentavano CID due erano affetti da piometra (de Laforcade et al., 2003).

La sepsi è inoltre associata a diminuita attività dell'Antitrombina, legata al consumo della stessa in risposta all'iperattivazione della coagulazione, ma anche a una ridotta produzione a livello epatico e alla degradazione ad opera delle elastasi prodotte dai neutrofili attivati (de Laforcade et al., 2003, O'Brien, 2008). Il livello di Antitrombina (AT) e la sua attività (ATA) sono considerati indicatori prognostici nei cani con sepsi o infiammazione sistemica in generale (Bentley et al., 2013, Giunti et al., 2015). L'attività dell'Antitrombina è stata significativamente correlata alla presenza di SIRS ed è suggerita come indicatore utile nello stabilire la gravità del quadro clinico, oltre che nel prevederne l'*outcome*: valori elevati di questo parametro, infatti, sono associati a un ridotto rischio di morte nei pazienti SIRS-positivi (Giunti et al., 2015).

Nelle cagne affette da piometra la trombocitopenia può essere il risultato di un aumentato consumo, dovuto anche al sanguinamento endoteliale, di una ridotta produzione a livello midollare o della produzione di PAF (Fattore di Attivazione Piastrinica) stimolata dalle endotossine batteriche (Plavec et al., 2006). La piastrinopenia, infatti, è considerata *marker* di endotossiemia e CID, sia nell'uomo che nel cane (Yilmaz et al., 2008 a). Inoltre può essere ritenuta un indicatore prognostico, in quanto piastrinopenia e prolungamento dell'ACT (*Activated Clotting Time* o tempo di aggregazione piastrinica, la cui alterazione è

generalmente legata a trombocitopenia o trombocitopatie) sono associate ad un incremento del rischio di morte nei pazienti in terapia intensiva (Hayes et al., 2010).

Indici piastrinici

Durante le infezioni batteriche, soprattutto in presenza di endotossine, si assiste ad un'attivazione piastrinica stimolata dalla Trombina e dai mediatori proinfiammatori, che inducono cambiamenti nella forma, degranolazione e adesione. La massiva attivazione conduce ad esaurimento delle piastrine, comportando uno stato di disfunzionalità di queste ultime (Ferkau et al., 2003).

L'avvento di sistemi di analisi ematologica automatizzati ha permesso di studiare differenti parametri piastrinici che potrebbero essere variabilmente correlati con lo stato di sepsi. Essi comprendono, oltre alla conta piastrinica (Platelet count, PLT), il volume piastrinico medio (Mean Platelet Volume, MPV), l'ampiezza della distribuzione dei volumi piastrinici (Platelet Volume Distribution Width, PDW), la densità piastrinica media (Mean Platelet Component, MPC), l'ampiezza della distribuzione della densità piastrinica (Platelet Component Distribution Width, PCDW), la massa piastrinica media (Mean Platelet Mass, MPM), l'ampiezza di distribuzione della massa piastrinica (Platelet Mass Distribution Width, PMDW), il numero di macropiastrine (Large Platelets, LP) e di aggregati (Platelet clumps, PLT-clumps). Di particolare importanza, il MPC è considerato un *marker* di attivazione piastrinica: le piastrine attivate, infatti, vanno incontro a degranolazione, che comporta un calo della densità rispecchiato da calo del MPC (Moritz et al., 2004). La diminuzione del MPC non sembra associata in maniera specifica agli stati settici rispetto alle SIRS non infettive (Moritz et al., 2005), né alla SIRS rispetto ad altre patologie che comportano alterazioni piastriniche, suggerendo una scarsa utilità di questo parametro come *marker* di infiammazione nel cane (Smith et al., 2014). Tale parametro, tuttavia, risulta significativamente diminuito nei soggetti settici se comparati con un gruppo di sani (Agnoli et al., 2013). MPV e PDW appaiono aumentati in corso di sepsi spontanea (Moritz et al., 2005, Agnoli et al., 2013) e di endotossiemia indotta sperimentalmente (Yilmaz et al., 2008 a). Un aumento nel volume medio e nella distribuzione dei volumi piastrinici può essere interpretato come un disturbo di produzione a livello midollare indotto dalla sepsi, in termini di un abnorme rilascio di piastrine in risposta alla crescente domanda

dell'organismo (Moritz et al., 2005, Yilmaz et al., 2008 a, Agnoli et al., 2013). Anche MPM, PMDW, PCDW, LP e numero di aggregati risultano aumentati in corso di sepsi. Nessuno dei parametri piastrinici, tuttavia, ha mostrato una correlazione con *l'outcome* (Agnoli et al., 2013).

3.2.3 Lattatemia e altri *marker* di ipoperfusione tissutale

Il ruolo del lattato come biomarcatore nei pazienti in terapia intensiva è stato ampiamente indagato negli anni, sia in medicina umana che veterinaria, con particolare interesse in relazione alla sepsi (Stevenson et al., 2007, Allen e Holm, 2008, Pierrakos e Vincent, 2010, Garcia-Alvarez et al., 2014). La lattatemia è considerata un buon *marker* prognostico, utile nella determinazione della gravità dello stato patologico, nella valutazione della risposta al trattamento e nel monitoraggio dell'evoluzione clinica del paziente, oltre che associato con *l'outcome* (Garcia-Alvarez et al., 2014). La valutazione della variazione dei livelli ematici di lattato nel tempo, poi, accresce ulteriormente l'attendibilità e il significato prognostico di questo parametro (Stevenson et al., 2007, Allen e Holm, 2008). Il lattato ematico è inoltre un *marker* agevole da valutare nella pratica clinica, facilmente misurabile all'accettazione del paziente e anche per questo incluso tra i parametri presi in esame nei sistemi di stadiazione clinica (Hayes et al., 2010, Giunti et al., 2015).

Iperlattatemia e acidosi lattica sono per lo più legate a condizioni di ipoperfusione o ipossia tissutale, in cui le cellule sono costrette ad utilizzare la glicolisi anaerobia come risorsa per la produzione di energia; ciò comporta un incremento della produzione di lattato che, nelle condizioni sopracitate o in presenza di patologie sottostanti, eccede la capacità di metabolismo e quindi consumo dello stesso (Allen e Holm, 2008). Si è già accennato al fatto che in corso di sepsi grave la vasodilatazione sistemica, la riduzione del ritorno venoso e l'ipotensione arteriosa determinano una condizione di ipovolemia relativa che comporta ipoperfusione e ipossia tissutale (Conti- Patara et al., 2012), tuttavia questo non sembra l'unico meccanismo coinvolto nel produrre iperlattatemia nei pazienti settici. Altre ipotesi patogenetiche includono una disfunzione mitocondriale, con un difetto nell'utilizzo di ossigeno anche in presenza di elevata pressione parziale dello stesso, una disfunzione dell'enzima Piruvato-deidrogenasi (PDH), coinvolto nel metabolismo aerobio del Piruvato, e un'aumentata domanda da parte dei tessuti legata ad un aumento del

metabolismo indotto dallo stato infiammatorio. Tutti questi meccanismi potrebbero concorrere allo sviluppo della *sepsis associated hyperlactatemia* (SAHL) (Garcia-Alvarez et al., 2014).

I dati relativi allo studio della lattatemia in corso di piometra sono piuttosto contrastanti, il che potrebbe rispecchiare la variabilità del quadro clinico associato alla patologia. L'iperlattatemia può essere rilevata (Volpato et al., 2012, Sant'Anna et al., 2014) o meno (Hagman et al., 2009 a) nei soggetti colpiti e qualora presente potrebbe essere legata alla presenza di sepsi, ipoperfusione e shock (Hagman et al., 2009 a). I livelli ematici di lattato, tuttavia, non sembrano associati alla presenza di SIRS, né ad un aumento dei tempi di ospedalizzazione (Hagman et al., 2009 a) o alla mortalità delle cagne con piometra (Sant'Anna et al., 2014).

In presenza di sepsi grave e shock settico il lattato si rivela uno scarso indicatore di perfusione tissutale, se paragonato con altri *marker*, e perde il suo significato prognostico se inserito in una valutazione multi-variabile. E' un indicatore caratterizzato da una risposta lenta, che si rende evidente qualora l'ipoperfusione si sia protratta nel tempo, conferendogli scarsa utilità nell'identificazione precoce della sepsi o dei disturbi di ossigenazione dei tessuti (Conti-Patara et al., 2012).

Al contrario, Jitpean (2015) include l'iperlattatemia tra i parametri associati ad un incremento dei tempi di ospedalizzazione nelle cagne con piometra, confermandone il significato prognostico (Jitpean et al., 2014 a, Jitpean, 2015) in disaccordo con gli altri Autori.

D'altra parte, una lattatemia bassa si rivela un dato comunque importante ai fini dell'iter terapeutico, in quanto rispecchia la non necessità di procedere con rianimazione fluida o cure intensive ed è associata ad un ridotto rischio anestesilogico durante il trattamento chirurgico (Hagman et al., 2009 a).

Il *base deficit* (ovvero un *base excess* con valore negativo) è un altro *marker* di ipoperfusione tissutale e può fornire una misura indiretta dell'acidosi lattica in corso di piometra (Hagman et al., 2009 a, Conti-Patara et al., 2012). La saturazione dell'ossigeno venoso centrale (ScvO₂) riflette invece il rapporto tra ossigeno fornito ai tessuti e ossigeno consumato e può ridursi per uno squilibrio tra i due fattori, legato al ridotto rifornimento e/o all'aumentata richiesta da parte dei tessuti che potrebbero verificarsi in corso di sepsi

grave. Base deficit e ScvO₂ sono significativamente associati all'*outcome* nei pazienti in terapia intensiva e sono considerati buoni indicatori prognostici in cagne affette da piometra e sepsi grave/shock settico (Conti-Patara et al., 2012).

3.2.4 Proteine di Fase Acuta

Le Proteine di Fase Acuta rappresentano nel loro insieme uno dei principali *marker* di infiammazione utilizzati in medicina umana e veterinaria (Ceròn et al., 2005, Pierrakos e Vincent, 2010).

La fase iniziale dell'infiammazione sistemica si accompagna alla cosiddetta Risposta di Fase Acuta, che identifica tutta la serie di reazioni, complesse e aspecifiche, messe rapidamente in atto dall'organismo per ristabilire l'omeostasi perturbata da un insulto. Una delle alterazioni che caratterizzano la Risposta di Fase Acuta è la variazione dei livelli plasmatici di alcune proteine, dette appunto Proteine di Fase Acuta (*Acute Phase Proteins*, APP), coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria e dell'infiammazione, nella difesa contro gli agenti infettivi e nella riparazione dei tessuti danneggiati. Alcune di esse subiscono un incremento durante l'infiammazione e sono dette APP positive (tra queste: Proteina C-reattiva o CRP, Siero Amiloide A o SAA, Aptoglobina o Hp, glicoproteina acida alfa-1 o AGP, Ceruloplasmina o Cp e Fibrinogeno), altre subiscono un calo e sono dette APP negative (tra cui Albumina, Transferrina e Antitrombina). Molte delle APP positive sono glicoproteine prodotte a livello epatico (se pure non esclusivamente), la cui sintesi è stimolata dai mediatori proinfiammatori come le Interleuchine 6 e 1 e il Tumor Necrosis Factor α . In base all'entità della loro risposta sono distinte in reagenti "maggiori" e "moderate" e possono fornire informazioni sul corso della risposta infiammatoria. Le prime sono caratterizzate da un incremento precoce e importante seguito da un rapido declino (principalmente CRP e SAA nel cane), le seconde presentano un aumento moderato e più lento e un declino graduale (Hp, AGP, Cp) (Ceròn et al., 2005).

Altra proteina che rientra tra le APP maggiori è la Procalcitonina (PCT), utilizzata in maniera estensiva come *marker* di sepsi in medicina umana (Pierrakos e Vincent, 2010) ma scarsamente studiata in veterinaria, essenzialmente a causa della mancanza di una valida metodica analitica (Floras et al., 2014 b). Nel cane è documentato un aumento dei

livelli di questa proteina in corso di endotossiemia sperimentalmente indotta (Yilmaz et al., 2008 b) e SIRS spontanea (Giunti et al., 2010).

Sebbene la Risposta di Fase Acuta sia per definizione rapida e transitoria, possono instaurarsi meccanismi aberranti che portano al perpetuarsi della stessa contribuendo al danno tissutale e all'insorgenza di complicazioni; in questi casi è possibile rilevare livelli elevati delle APP positive anche in corso di un'inflammatione cronica (Ceròn et al., 2005), quale la piometra.

Le Proteine di Fase Acuta sono dotate di maggior sensibilità diagnostica rispetto ad altri *marker* classici di infiammazione come il WBC, infatti mostrano una risposta più rapida all'insorgere dell'inflammatione e non risentono della mielosoppressione; tuttavia presentano scarsa specificità nell'identificarne la causa, il che ne limita le potenzialità diagnostiche. Sono utili nel monitoraggio dell'evoluzione clinica del paziente e nella valutazione della risposta al trattamento, tuttavia la loro correlazione con l'*outcome* è controversa (Ceròn et al., 2005, Nakamura et al., 2008) e, in particolare, il significato prognostico delle APP positive è scarso (Giunti et al., 2015).

Molte delle APP sono state studiate come marcatori nei soggetti colpiti da piometra (Fransson, 2003, Fransson et al., 2004, 2007, Plavec et al., 2006, Dabrowski et al., 2007, 2009, 2013, 2015 a, Nakamura et al., 2008, Karlsson et al., 2013, Enginler et al., 2014, Jitpean et al., 2014 b, 2014 c, Jitpean, 2015, Torrente et al., 2015).

Proteina C-reattiva (CRP)

La Proteina C-reattiva o CRP fu la prima tra le APP ad essere identificata e rappresenta al momento la più diffusamente utilizzata come *marker* di infiammazione, sebbene un suo incremento possa essere riscontrato in corso di molteplici patologie (Ceròn et al., 2005, Nakamura et al., 2008, Christensen et al., 2014). Le sue funzioni biologiche includono la capacità di legare componenti batteriche attivando il complemento, di stimolare la produzione di citochine e modulare l'attività dei neutrofili (Ceròn et al., 2005). È considerata un buon *marker* di SIRS/sepsi nel cane, correlata inoltre con la gravità e l'estensione del processo patologico ed è spesso impiegata come riferimento nella valutazione di altri indicatori (Torrente et al., 2015, Jitpean et al., 2015, Karlsson et al., 2013, 2016).

L'utilità diagnostica della CRP nell'individuazione della piometra fu proposta per la prima volta da Fransson et al. (2004) e successivamente confermata da altri Autori (Dabrowski et al., 2007, Enginler et al., 2014). La piometra è generalmente associata a un aumento dei livelli di CRP (Fransson et al., 2004, 2007, Dabrowski et al., 2007, 2015 a, Nakamura et al., 2008, Sharif et al., 2013, Enginler et al., 2014, Jitpean et al., 2014 b, 2015, Karlsson et al., 2013, 2016) che sembrano inoltre rispecchiare la gravità del quadro clinico e l'intensità dell'infiammazione, infatti l'incremento è maggiore nei casi con cervice chiusa (Dabrowski et al., 2007, 2013, Enginler et al., 2014).

Tuttavia, l'efficacia di questo *marker* nel discriminare i soggetti settici dai non settici tra quelli affetti dalla patologia è piuttosto dibattuta, così come lo è la sua utilità prognostica. L'associazione tra CRP e SIRS in corso di piometra, che emerge da alcuni Lavori (Fransson, 2003, Fransson et al., 2007, Karlsson et al., 2013), è smentita da altri in cui la proteina non mostra una differenza significativa tra cagne SIRS-positive e SIRS-negative (Sharif et al., 2013, Jitpean et al., 2014 b, Karlsson et al., 2016). Analogamente la correlazione tra CRP e *outcome* riportata da Fransson et al. (2004 e 2007), secondo cui livelli più elevati sono associati a prolungata ospedalizzazione, non trova conferma nello studio di Jitpean et al. (2014 b). I livelli CRP non mostrano associazione con l'*outcome*, in termini di sopravvivenza o morte, anche prendendo in considerazione gruppi di animali settici colpiti da patologie eterogenee (Torrente et al., 2015).

La Proteina C-reattiva può comunque rivelarsi utile nel monitoraggio delle cagne trattate chirurgicamente: i livelli circolanti, infatti, subiscono un ulteriore incremento in seguito al trauma chirurgico per poi calare progressivamente nell'arco dei successivi 10-17 giorni (Dabrowski et al., 2007, Yuki et al., 2009) e una mancata riduzione può essere spia dell'insorgenza di complicazioni postoperatorie (Dabrowski et al., 2013).

Siero Amiloide A (SAA)

La Siero Amiloide A o SAA rappresenta, insieme alla CRP, una delle APP positive "maggiori", impiegata in medicina umana e veterinaria come *marker* di infiammazione e dotata di buona sensibilità e specificità nell'individuazione dell'infiammazione sistemica nel cane. Nella pratica veterinaria il suo utilizzo è rimasto più limitato rispetto a quello della Proteina C-reattiva a causa della maggior difficoltà di analisi, tuttavia sembra dotata

di una maggiore sensibilità diagnostica e quindi di un maggior potenziale nell'impiego clinico rispetto alla CRP (Christensen et al., 2014, Jitpean et al., 2014 b). Le sue funzioni biologiche comprendono l'attività chemiotattica di richiamo ai siti d'inflammazione e la *downregulation* del processo infiammatorio con inibizione del rilascio di mieloperossidasi e della proliferazione linfocitaria (Ceròn et al., 2005).

In corso di piometra, i livelli di Siero Amiloide A subiscono un incremento evidente (Dabrowski et al., 2007, Hagman et al., 2009 b, Jitpean et al., 2014 b) e sono correlati con la gravità dell'inflammazione (Dabrowski et al., 2007, 2013). La SAA, al contrario della Proteina C-reattiva, mostra una significativa associazione con la presenza di SIRS nelle cagne affette da piometra, dimostrandosi un valido *marker* di sepsi con una sensibilità del 74% nell'identificazione della condizione (Jitpean et al., 2014 c). Non presenta invece associazione con l'*outcome* in termini di durata dell'ospedalizzazione (Jitpean et al., 2014 b, 2014 c) ma, analogamente alla CRP, può essere utile nel monitoraggio dei soggetti sottoposti a chirurgia e nell'individuazione della comparsa di complicazioni postoperatorie (Dabrowski et al., 2009).

Sembra inoltre che l'utero, durante l'infezione, contribuisca in maniera importante alla produzione di SAA (Hagman et al., 2009 b).

Aptoglobina (Hp)

L'Aptoglobina o Hp è una delle APP "minori" ed è coinvolta nella difesa dell'organismo, grazie alla capacità di legare l'emoglobina limitando la disponibilità di ferro per la crescita batterica, e nella modulazione della risposta infiammatoria, inibendo la chemiotassi e l'attività fagocitaria dei granulociti (Ceròn et al. 2005).

I livelli ematici di questa proteina possono essere elevati nei soggetti con piometra (Dabrowski et al., 2013), anche se non sempre in maniera significativa (Dabrowski et al., 2007, 2009). Insieme a CRP e SAA è un *marker* utile nel monitoraggio postoperatorio degli animali sottoposti a ovarioisterectomia: mostra un incremento molto graduale in seguito alla chirurgia, con un picco a cinque giorni, e un calo progressivo più lento rispetto alle APP maggiori (Dabrowski et al., 2007). La persistenza di livelli elevati in circolo può essere indice di complicazioni (Dabrowski et al., 2009).

Glicoproteina Acida Alfa-1 (AGP)

Dotata di attività antinfiammatoria e immunomodulatrice (Ceròn et al., 2005) e coinvolta nella riparazione tissutale, la Glicoproteina Acida Alfa-1 (AGP) mostra un aumento dei livelli circolanti in corso di numerose patologie infiammatorie e non, soprattutto a carattere acuto (Yuki et al., 2008). L'AGP aumenta anche in corso di piometra (Yuki et al., 2008, Hagman, 2011) ed è associata alla gravità della patologia misurata in termini di tempi di ospedalizzazione (Hagman, 2011). Tuttavia non rappresenta un indicatore di sepsi, non essendo stata individuata un'associazione tra AGP e SIRS nei soggetti colpiti (Hagman, 2011). Inoltre è un parametro di dubbia affidabilità poiché potenzialmente influenzato da età, razza e fattori ambientali (Yuki et al., 2008).

Fibrinogeno

Pur essendo annoverato tra le Proteine di Fase Acuta, il Fibrinogeno è scarsamente utilizzato nella routine come *marker* d'infiammazione e il suo interesse clinico nei piccoli animali è legato prevalentemente alla diagnosi dei disturbi della coagulazione. È infatti un indicatore dotato di scarsa specificità nei confronti dell'infiammazione e il suo incremento è lento e modesto (circa 2-3 volte i livelli normali). Il fibrinogeno è un marcatore in grado di discriminare tra soggetti sani e malati ma non tra infiammazione sistemica e localizzata e i suoi livelli ematici sono associati alla presenza di infiammazione ma non alla gravità ed estensione del processo, né all'*outcome* (Torrente et al., 2015). Tuttavia, esaminato insieme ad altri *marker* come la CRP, può essere considerato indicatore della presenza di una risposta di fase acuta all'ammissione in terapia intensiva (Giunti et al., 2015).

La piometra può indurre iperfibrinogenemia, da ascrivere alla risposta di fase acuta piuttosto che alla cronicizzazione della CID cui di solito si associa (Plavec et al., 2006).

Proteine di Fase acuta negative: Albumina e Transferrina

Durante uno stress acuto la produzione delle Proteine di Fase Acuta cosiddette "negative", a livello epatico, diventa secondaria e subisce un calo transitorio in favore della sintesi di

altre proteine coinvolte direttamente nella risposta infiammatoria. Le principali tra esse sono Albumina, Transferrina (Ceròn et al., 2005) e Antitrombina, quest'ultima implicata nei meccanismi emostatici (vedi parametri della coagulazione).

L'ipoalbuminemia è un tratto tipico degli stati di infiammazione sistemica ed è legata in primo luogo alla Risposta di Fase Acuta. L'aumento della permeabilità capillare che si verifica in corso di SIRS, inoltre, comporta perdita di albumina negli spazi extravascolari, determinando un calo dei livelli circolanti. A ciò si somma un'augmentata degradazione della proteina a livello dei siti d'infiammazione, dovuto sia alla denaturazione legata alle variazioni di pH e temperatura, sia al legame con radicali liberi, tossine batteriche ed altri elementi tossici (Brady e Otto, 2001, Mazzaferro et al., 2002, Plavec et al., 2006). L'albumina è considerata un *marker* di infiammazione, sebbene poco specifico, ed i suoi livelli ematici sono inversamente correlati con la gravità del quadro clinico; rappresenta inoltre un *marker* prognostico, in quanto una marcata ipoalbuminemia è associata con aumento di morbilità e mortalità nei pazienti settici (Hayes et al., 2010, Torrente et al., 2015, Giunti et al., 2015).

Nei soggetti affetti da piometra l'ipoalbuminemia è un reperto frequente, come già discusso in precedenza, (Børresen e Skrede, 1980, Fransson, 2003, Hagman et al., 2009 a, Hagman, 2011, Maddens et al., 2011, Jitpean et al., 2014 b) tuttavia non si dimostra un parametro utile per distinguere i soggetti SIRS-positivi dai SIRS-negativi, rivelandosi un cattivo *marker* di sepsi nelle cagne colpite (Jitpean et al., 2014 c).

La Transferrina è una proteina strettamente associata al metabolismo del Ferro, essendo addetta al trasporto di questo elemento nel sangue e quindi responsabile della capacità totale di legare il ferro (o TIBC, *Total Iron Binding Capacity*) del siero. I suoi livelli ematici possono essere misurati direttamente o, più spesso, indirettamente, attraverso la TIBC (Mandel, 1959, Ceròn et al., 2005), parametro utilizzato insieme a sideremia (SI, corrispondente alla quantità di ferro non emoglobinico presente nel sangue, legato alla Transferrina, Mandel, 1959) e UIBC (*Unsaturated Iron Binding Capacity* o capacità di riserva della transferrina) anche per la valutazione del metabolismo del ferro nei piccoli animali (Tasca, 2008). Gli stati infiammatori sono caratterizzati da un calo della Transferrina legato alla risposta di fase acuta (Mandel, 1959, Ceròn et al., 2005, Torrente et al., 2015), oltre che da ipoferremia (Nairz et al., 2014, Torrente et al., 2015).

Il calo della concentrazione ematica del ferro è mediato dall'Epcidina, una proteina prodotta dal fegato sotto lo stimolo di alcune citochine durante la risposta infiammatoria e responsabile dell'internalizzazione di questo elemento a livello di tessuti di deposito e cellule reticolo-endoteliali, oltre che di una riduzione dell'assorbimento intestinale. Tale meccanismo, noto come *pseudoipoferremia*, limita la quantità di ferro disponibile per la crescita batterica e fa parte della risposta di difesa dell'organismo nei confronti degli agenti patogeni (Tasca, 2008, Nairz et al., 2014).

Il ferro ematico può essere utilizzato come *marker* di sepsi, essendosi rivelato un parametro efficace nel discriminare tra soggetti con SIRS e con infiammazione localizzata in particolare se valutato in combinazione con altre variabili quali l'albuminemia e la CRP. L'andamento della sideremia nel tempo sembra inoltre riflettere la progressione del processo infiammatorio e assume un significato prognostico essendo associato con l'*outcome* nei pazienti settici (Torrente et al., 2015).

L'iposideremia è stata riscontrata anche in corso di piometra, sebbene sia un parametro con scarso valore diagnostico nei confronti della patologia, e presenta una correlazione con i livelli di SAA nelle cagne colpite (Jitpean et al., 2014 b).

Insulin-like Growth Factor-1 (IGF-1)

Altra molecola inclusa nel gruppo delle proteine di fase acuta negative è l'*Insulin-like Growth Factor-1* o IGF-1, un polipeptide prodotto a livello epatico e coinvolto nella regolazione della risposta immunitaria. Si tratta di uno degli effettori dell'ormone della crescita (*growth hormone*, GH), principalmente implicato nello sviluppo dell'organismo, nel controllo dell'attività di replicazione e morte cellulare e nel metabolismo proteico. L'IGF-1 è in grado di influenzare l'immunità modulando la proliferazione e la differenziazione delle cellule mieloidi e la linfopoiesi, influenzando inoltre la responsività delle cellule mature nei confronti degli antigeni e l'attività linfocitaria anche grazie alla sua attività antiapoptotica; è dotato inoltre di un effetto vasodilatatorio stimolando la produzione di ossido nitrico a livello endoteliale (Heemskerk et al., 1999).

In corso di infezione o infiammazione sistemica i livelli ematici di IGF-1 calano in risposta all'endotossinemia e alla produzione di citochine proinfiammatorie quali TNF α e IL-1; ciò

contribuisce all'instaurarsi di uno stato catabolico e alla progressione verso shock settico e MODS (Heemskerk et al., 1999).

Un calo della concentrazione ematica di IGF-1 è stato dimostrato anche in corso di piometra, sebbene l'infiammazione non sembri l'unico meccanismo implicato (Jitpean et al., 2014 b). L'IGF-1 infatti, oltre ad essere influenzato da peso corporeo (correlazione positiva) ed età (correlazione negativa), risente di fattori metabolico-nutrizionali: i bassi livelli ematici misurati nelle cagne affette da piometra potrebbero essere il risultato del ridotto apporto di nutrienti legato alla disoressia/anoressia spesso associate alla patologia (Jitpean et al, 2014 b, Dabrowski et al., 2015 a). Simili osservazioni suggeriscono uno scarso significato diagnostico per questo *marker*, in particolare se impiegato nell'ambito di gruppi eterogenei per età o stato di nutrizione e sviluppo corporeo; potrebbe invece rappresentare un utile indicatore per il monitoraggio del singolo individuo nel periodo postoperatorio, in quanto l'insulto chirurgico è sempre associato ad un calo dei valori di IGF-1 (Dabrowski et al., 2015 a).

3.2.5 Citochine

Le citochine, in qualità di mediatori dell'infiammazione e pertanto strettamente coinvolte nella patogenesi della reazione infiammatoria, costituiscono un gruppo di molecole le cui potenzialità di *marker* sono state ampiamente indagate in medicina umana e veterinaria e, in particolare, in modelli sperimentali o di sepsi spontanea nel cane (Kjelgaard-Hansen et al., 2007, Pierrakos e Vincent, 2010, DeClue et al., 2012, Song et al., 2012, Floras et al., 2014 a, Karlsson et al., 2016).

Lo studio dei livelli circolanti di citochine e della loro dinamica nel tempo può fornire dati utili sull'estensione del processo (sepsi o infiammazione non settica) e sulla fase dell'infiammazione (proinfiammatoria o immunosoppressiva), con importanti implicazioni diagnostiche, terapeutiche e prognostiche (Floras et al., 2014 a, Karlsson, 2015, Karlsson et al., 2016). Citochine quali IL-10, IL-6 e TNF α sono associate alla risposta innata e quindi alla prima fase dell'infiammazione, mentre IL-2, IL-7, IL-15, IL-18, IFN γ (interferone γ) e GM-CSF (*granulocyte macrophage-colony stimulating factor*) partecipano all'immunità adattativa responsabile dell'eliminazione dei patogeni in una fase tardiva (Floras et al., 2014 a). L'erraticità dei livelli ematici di mediatori si rivela d'altra

parte svantaggioso (Pierrakos et Vincent, 2010); lo studio del TNF α , caratterizzato da una produzione molto precoce e da un'emivita breve (Song et al., 2012, Floras et al., 2014 a) ad esempio, potrebbe rivelarsi fuorviante qualora il campionamento avvenga in una fase più tardiva dell'infiammazione (Hagman et al., 2009 b)

Inoltre, considerando la sepsi e la progressione a MODS come risultanti di uno squilibrio tra fattori pro- ed anti-infiammatori, il rapporto tra differenti tipologie di citochine può essere interpretato come *marker* associato alla gravità del quadro clinico e alla mortalità (Kjelgaard-Hansen et al., 2007, DeClue et al., 2010, Yu et al., 2008). In altri termini, un'elevata produzione di citochine proinfiammatorie quali TNF α , IL-6 e HMGB1 (*High Mobility Group Box 1*, un polipeptide intranucleare che agisce come attivatore tardivo della cascata proinfiammatoria, Yu et al., 2008), non compensata da un'adeguata risposta antinfiammatoria, rispecchiata principalmente da un incremento dell'IL-10, è suggerita come *marker* predittivo di una prognosi sfavorevole nel cane durante la SIRS (Kjelgaard-Hansen et al., 2007, Rau et al., 2007, DeClue et al., 2010, Yu et al., 2008, Song et al., 2012).

La cinetica di numerose citochine è stata studiata nelle cagne affette da piometra, valutandone le implicazioni diagnostiche e prognostiche in relazione alla malattia (Fransson et al., 2007, Hagman et al., 2009 b, Karlsson et al., 2012, Maciel et al., 2014, Dabrowski et al., 2015 b), o utilizzandola come modello di sepsi spontanea nel cane (Hagman et al., 2009 b, Karlsson et al., 2013, 2016, Haas et al., 2015).

La reazione immunitaria in corso di piometra appare mediata principalmente da TNF α (Fransson et al., 2007, Karlsson et al., 2012), IL-6 (Fransson et al., 2007, Hagman et al., 2009 b, Dabrowski et al., 2015 b) e IL-10 (Maciel et al., 2014, Dabrowski et al., 2015 b), *marker* precoci rispetto agli indicatori legati alla Risposta di Fase Acuta (Fransson et al., 2007). La produzione di IL-6, in particolare, appare amplificata rispetto ad altre citochine, evidenziando il ruolo di questo mediatore nella risposta primaria (Fransson et al., 2007, Dabrowski et al., 2015 b), sebbene l'interleuchina in questione non sia sempre misurabile nei soggetti malati (Karlsson et al., 2012, 2016).

Durante la piometra, il continuo o intermittente rilascio di endotossine o altre componenti batteriche dall'utero potrebbe determinare una stimolazione proinfiammatoria protratta nel tempo, suggerita dalla persistenza dei livelli ematici di TNF α a dispetto della sua breve emivita, che permette l'identificazione di questa ed altre citochine anche a distanza rispetto

all'insorgenza dell'infezione (Fransson et al. 2007). L'espressione del TNF α , comunque, potrebbe non essere rilevata negli stadi più tardivi dell'infezione (Hagman et al., 2009 b). Sebbene l'IL-6 sia ritenuta un *marker* associato a morbidità e mortalità in corso di sepsi spontanea nel cane (Rau et al., 2007), TNF α e IL-6 non permettono di discriminare tra SIRS e infezione localizzata nei soggetti con piometra e non mostrano quindi un'associazione significativa con la gravità del quadro clinico (Fransson et al., 2007). Al contrario IL-7, insieme alle IL-15 e IL-18 cui è correlata (Karlsson et al., 2012), e KC-like (una citochina simile alla *keratinocyte derived CXC chemokine* murina, Karlsson et al., 2016) sono suggeriti come potenziali *marker* di SIRS, associati anche all'entità del processo patologico e alla durata dell'ospedalizzazione, rispettivamente (Karlsson et al. 2012, 2016). L'HMGB1, pur non essendo correlato alla presenza di SIRS, è suggerito come *marker* precoce di infiammazione se paragonato a CRP o WBC, indice della presenza piuttosto che dell'estensione del processo infiammatorio (Karlsson et al., 2013). La citochina CXCL-8 (o IL-8) è espressa nei soggetti con piometra, ma in misura maggiore negli animali con sintomatologia più blanda e caratterizzati da valori normali di WBC e CRP. Un simile comportamento potrebbe essere spiegato dalla transitorietà del picco di IL-8 rispetto all'incremento più lento di leucociti e CRP, oppure dalla deplezione immunitaria che caratterizza gli stadi più gravi della patologia (Haas et al., 2015). Più in generale, l'immunosoppressione associata alla piometra (Faldyna et al., 2001) potrebbe influenzare la risposta adattativa e con essa l'assetto e il profilo delle citochine espresse. Gli elevati livelli di IL-10 e IL-4 nei soggetti malati confermano la dominanza di un pattern antinfiammatorio, supportando l'ipotesi dell'immunosoppressione (Maciel et al., 2014).

3.2.6 Biomarker urinari associati a danno renale

La disfunzione renale è una complicazione di comune riscontro in corso di patologie infettive (Maddens et al., 2010) e può evolvere, nel quadro più ampio della sindrome da disfunzione multiorganica (MODS), in insufficienza renale acuta indotta da sepsi. L'insorgenza di danno renale acuto è documentata nel 12% dei cani settici e ne influenza fortemente la mortalità (Keir e Kellum, 2015).

La piometra è frequentemente associata a reperti clinici quali azotemia (Küplülü et al., 2009, Dabrowski et al., 2013, Sant'Anna et al., 2014, Jitpean, 2015) e proteinuria (Heiene

et al., 2001, 2007, Maddens et al., 2010, 2011, Zaragoza et al., 2014) che suggeriscono la presenza di risentimento renale, oltre a sintomi quali poliuria e polidipsia (Fransson et al., 2004, Küplülü et al., 2009, Maddens et al., 2011, Dabrowski et al., 2013, 2015 b, Enginler et al., 2014, Jitpean et al., 2014 a, 2014 c); la natura per lo più transitoria di questi ultimi, caratterizzati generalmente da regressione in seguito alla terapia, suggerisce inoltre la transitorietà del danno renale stesso (Heiene et al., 2007) confermata da diversi studi (Heiene et al., 2007, Maddens et al., 2010).

Tradizionalmente, la disfunzione renale secondaria alla piometra fu imputata ad una glomerulonefrite immunomediata legata alla deposizione di complessi immuni (Sandholm et al., 1975). La stimolazione cronica del sistema immunitario ad opera delle endotossine prodotte a livello uterino, infatti, induce la formazione di immunocomplessi circolanti (ICC) (Faldyna et al., 2001, Hagman et al., 2006 a) con possibile deposizione a livello di glomeruli renali. L'ipotesi di una glomerulopatia è senz'altro supportata dal riscontro di proteinuria, *marker* di alterazione del filtro glomerulare; la proteinuria, tuttavia potrebbe essere influenzata dalla presenza di infezioni urinarie concomitanti (Heiene et al., 2007, Maddens et al., 2010). Heiene et al. (2007) riportano la presenza di sclerosi e fibrosi glomerulare nelle cagne colpite, variamente associata a nefrite interstiziale (reperto confermato successivamente da Maddens et al., 2011); avanzano inoltre l'ipotesi che la glomerulopatia sia legata all'età piuttosto che secondaria alla piometra, come suggerito dal riscontro di alterazioni istopatologiche simili in un gruppo di animali sani di età comparabile (Heiene et al., 2007). Le lesioni glomerulari potrebbero inoltre essere legate a patologie concomitanti, quali leishmania o ipertensione e resta da chiarire se la piometra sia in grado di esacerbare un danno glomerulare eventualmente preesistente (Maddens et al., 2011).

L'utilizzo di *biomarker* urinari ha permesso di indagare più approfonditamente la natura del danno renale associato alla piometra; la glomerulopatia, di cui sono indicatori l'albumina e le immunoglobuline urinarie, è risultata concomitante ad un danno tubulare, supportato dalla presenza nelle urine di *marker* specificamente associati a questo tratto del nefrone: *retinol-binding protein* (RBP) e N-acetil- β -D-glucosaminidasi (NAG) (Maddens et al., 2010, 2011).

I livelli di *biomarker* urinari e la proteinuria, inoltre, risultano correlati con l'entità delle lesioni istopatologiche e quindi con l'entità del danno renale (Maddens et al., 2011). In una

simile ottica la proteinuria può essere considerata un importante indicatore prognostico, come suggerito in generale in corso di sepsi (Giunti et al., 2015). In particolare una proteinuria persistente, associata anche a persistenti poliuria e polidipsia nei soggetti trattati chirurgicamente, può preannunciare lo sviluppo di insufficienza renale, potenzialmente fatale (Maddens et al., 2011).

3.2.7 Altri biomarcatori indagati in corso di piometra

Cromogranina A (CgA)

La Cromogranina A (CgA) è un pro-ormone con funzioni neuroendocrine rilasciato insieme alle catecolamine a livello di midollare delle ghiandole surrenali e di gangli terminali simpatici; in medicina umana rappresenta un *marker* di stress con valore diagnostico e prognostico nei confronti di diverse patologie: un aumento dei livelli in circolo è associato alla presenza di SIRS e a un peggioramento dell'*outcome* nei pazienti intensivi (Zhang et al., 2009).

In medicina veterinaria la CgA viene misurata indirettamente attraverso i livelli di Catestatina (Cst) e Vasostatina (Vs), peptidi attivi di cui è precursore. Contrariamente a quanto atteso, uno studio condotto su soggetti colpiti da piometra ha rilevato livelli di Cst inferiori e valori di Vs invariati rispetto ad un gruppo di animali sani; una simile situazione potrebbe essere legata al carattere cronico della piometra, in cui si verrebbe ad instaurare un meccanismo a *feedback* negativo ad opera della Cst, con inibizione del rilascio di catecolamine e CgA, oppure a sistemi specie-specifici di *downregulation* della CgA durante l'infiammazione. I valori di Cst e Vs, inoltre, non hanno mostrato variazioni in seguito alla chirurgia nei soggetti trattati e non sono stati correlati con la gravità del quadro clinico o con la durata dell'ospedalizzazione. Basandosi su simili risultati è evidente che il significato della CgA come *marker* diagnostico e prognostico nel cane in sepsi sia ancora dubbio, sebbene gli Autori non escludono possa rivelarsi un indicatore utile qualora valutato insieme ad altri parametri (Jitpean et al., 2015).

Timidina Chinasi 1 (TK1)

La Timidina chinasi 1 (TK1) è un enzima coinvolto nella sintesi di DNA e quindi nella replicazione cellulare, utilizzato in medicina umana come *marker* di proliferazione nei pazienti oncologici; l'attività sierica della TK1 è inoltre elevata in corso di infezioni virali e in presenza di leucocitosi. Uno studio condotto su un gruppo di cagne colpite da piometra ha rilevato un aumento dell'attività di questo enzima anche in corso di tale patologia, seguito da un calo successivo al trattamento chirurgico, annoverando le infezioni batteriche tra le possibili cause d'incremento dell'attività di TK1. Il parametro, tuttavia, non risulta correlato con la presenza di SIRS, né con altre variabili ematobiochimiche o con la gravità del quadro clinico (Sharif et al., 2013).

Troponina Cardiaca I (cTnI)

La Troponina cardiaca I (cTnI) è un *marker* sensibile e specifico di danno miocardiale nel cane e può essere rilevata in circolo in corso di piometra. Una percentuale variabile tra il 12 e il 28% dei soggetti colpiti mostra infatti un aumento dei livelli ematici di cTnI, potenzialmente utile per l'identificazione dei pazienti a rischio di sviluppare cardiomiopatia anche in assenza di sintomi specifici (Hagman et al., 2007, Pelander et al., 2008). Il danno cardiaco in corso di piometra è legato a un effetto diretto delle endotossine batteriche sui miocardiociti e alla SIRS, oltre che a possibili complicazioni della patologia quali ipossia tissutale, coagulopatie, insufficienza renale che comporta danno uremico sui miocardiociti e miocarditi secondarie (Hagman et al., 2007); può inoltre essere aggravato da condizioni di ipossia perioperatorie legate alla procedura anestesiológica durante il trattamento chirurgico (Pelander et al., 2008).

I livelli di cTnI, alterati in maniera lieve nella maggior parte dei casi di piometra, sembrano rispecchiare l'entità del danno miocardico rivelandosi indicatori di utilità prognostica: pur non essendo stati associati con la durata dell'ospedalizzazione, infatti, valori elevati tendono a mostrare una correlazione con una più elevata mortalità (Hagman et al., 2007). Per quanto riguarda la sepsi, il marcatore non è stato associato con la presenza di SIRS o con altri *marker* d'infiammazione sistemica, confutando l'ipotesi che i soggetti

cl clinicamente più gravi (SIRS-positivi) siano maggiormente esposti a rischio di sviluppare patologia cardiaca (Hagman et al, 2007, Pelander et al., 2008).

Occorre infine tenere presente che l'alterata funzionalità renale spesso associata alla piometra potrebbe contribuire all'incremento dei valori ematici di cTnI attraverso una riduzione della *clearance* di questa molecola, fuorviando l'interpretazione dei risultati (Hagman et al., 2007, Pelander et al., 2008).

Endotossine batteriche

L'endotossiemia che si verifica in corso di piometra è ritenuta responsabile delle manifestazioni sistemiche della patologia e della progressione verso sepsi e shock. Nella maggior parte dei soggetti colpiti dall'infezione uterina, infatti, è possibile misurare elevati livelli di endotossine circolanti (Okano et al., 1998, Hagman et al., 2006 a) che calano in seguito ad asportazione dell'utero infetto (Okano et al., 1998).

In condizioni fisiologiche una piccola quota di endotossine viene normalmente assorbita a livello intestinale e arriva al fegato, responsabile della loro neutralizzazione ed eliminazione; quando, durante un'infezione, la quantità di tossine batteriche in circolo supera la capacità epatica di detossificazione, si verifica endotossiemia (Hagman et al., 2006 a). I livelli di endotossine nel torrente ematico, quindi, possono essere considerati un *marker* legato non solo alla presenza ma anche alla gravità dell'infezione in atto; rappresentano inoltre un indicatore prognostico in quanto valori elevati sono associati a una prognosi peggiore (Okano et al., 1998). L'entità dell'endotossiemia sembra essere influenzata anche dalla durata della patologia e dalla quantità di pus presente in utero, come dimostrato dal fatto che la concentrazione ematica di tossine batteriche è generalmente più bassa nei soggetti con cervice aperta (Okano et al., 1998).

I livelli di endotossine circolanti sono stati inoltre associati con i valori di Creatinina ematica nelle cagne con piometra, sostenendo il possibile ruolo delle endotossine nella patogenesi del danno renale (Okano et al., 1998, Faldyna et al., 2001).

CAPITOLO IV

Prostatite e accesso prostatico

L'infiammazione della prostata, o prostatite, è una condizione relativamente comune nel cane intero sessualmente maturo e può assumere decorso acuto o cronico. La patologia riconosce un'eziologia batterica ed è prodotta nella maggior parte dei casi da un'infezione ascendente attraverso l'uretra, sebbene siano riconosciute anche l'infezione per via ematogena (nel caso, ad esempio, di patologie a carattere setticemico) e la disseminazione a partire da altri organi della sfera urogenitale (Dorfman e Barsanti, 1998, Paclikova et al., 2006). I microrganismi responsabili sono queglii stessi patogeni opportunisti che possono causare infezioni urogenitali ascendenti nelle cagne (Memon, 2007).

La specie batterica più frequentemente coinvolta è *Escherichia coli*, con minor frequenza possono essere isolati anche *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Mycoplasma canis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter* spp., *Streptococcus* spp., *Pasteurella* spp., *Haemophilus* spp. o persino *Brucella canis* (Johnston et al., 2000, Paclikova et al., 2006). Gli stessi microrganismi possono essere isolati anche dalle urine nella maggior parte dei soggetti con prostatite, confermando l'ipotesi di un'infezione ascendente (Barsanti e Finco, 1984). In condizioni normali alcuni meccanismi di difesa aspecifici contrastano la colonizzazione batterica: il flusso di urina e la presenza di un gradiente pressorio in uretra, le proprietà battericide del secreto prostatico, la produzione locale di immunoglobuline A. Al contrario, tutte le condizioni che favoriscono la crescita batterica in uretra, come infezioni del tratto urinario inferiore, traumi, urolitiasi e neoplasie, o che alterano la normale secrezione del fluido prostatico, come iperplasia o metaplasia squamosa, predispongono ad infezione della prostata (Dorfman e Barsanti, 1998).

L'accesso prostatico si sviluppa come conseguenza di una prostatite cronica, spesso secondariamente all'infezione di cisti o in associazione con stadi precoci di neoplasia (Barsanti e Finco, 1984, Dorfman e Barsanti, 1998, Paclikova et al., 2006); l'infezione, a

carattere suppurativo, comporta la formazione di microascessi nel parenchima che poi convergono a formare cavità di maggiori dimensioni, spesso lobulate e racchiuse da una spessa capsula (White, 2000).

L'incidenza di prostatite cronica in sé non è nota nel cane in quanto spesso mancano segni clinici specifici che permettano la localizzazione del processo patologico; i soggetti colpiti, inoltre, non mostrano compromissione sistemica (Dorfman e Barsanti, 1998).

L'ascesso prostatico, al contrario, è spesso associato a disturbi sistemici legati alla diffusione di batteri o endotossine dal focolaio infettivo, che possono determinare peritonite e sepsi (Dorfman e Barsanti, 1998). I segni clinici variano in funzione delle dimensioni dell'ascesso e dell'estensione del processo infiammatorio (locale o sistemico); uno scolo uretrale continuo o intermittente a carattere purulento o purulento-emorragico è il sintomo più comune (Barsanti e Finco, 1984, Dorfman e Barsanti, 1998, Smith, 2008), accompagnato da infertilità (Memon, 2007) e occasionalmente dolore alla palpazione addominale (White, 2000, Freitag et al., 2007). Ascessi di grosse dimensioni possono provocare tenesmo, stranguria e disuria per compressione sul retto e sull'uretra (Dorfman e Barsanti, 1998). Gli animali in cui endotossiemia e sepsi determinano coinvolgimento sistemico presentano febbre, anoressia, abbattimento (Freitag et al., 2007), poliuria e polidipsia analogamente ai soggetti colpiti da piometra (Hardie et al., 1984), fino a mostrare segni di shock settico (Hardie et al., 1984, Johnston et al., 2000). Gli esami ematobiochimici evidenziano generalmente un leucogramma infiammatorio con leucocitosi neutrofilica e left shift (Barsanti e Finco, 1984, Johnston et al., 2000, Paclikova et al., 2006, Freitag et al., 2007) e solo occasionalmente leucopenia (Johnston et al., 2000); possono inoltre mostrare elevate concentrazioni di fosfatasi alcalina (White, 2000), segni di risentimento epatico (Hardie et al., 1984) e ipoglicemia nei soggetti in sepsi grave (Freitag et al., 2007). Le alterazioni sono più marcate in presenza di peritonite settica secondaria alla rottura di un ascesso. Possono infine essere presenti proteinuria, ematuria, leucocituria e batteriuria, generalmente assenti nel caso in cui l'ascesso sia bene incapsulato (Paclikova et al., 2006).

Analogamente alla piometra, l'ascesso prostatico è considerato un'emergenza medico-chirurgica a causa della potenziale progressione a setticemia, endotossiemia e peritonite; la condizione presenta elevata mortalità legata a complicazioni quali setticemia, CID e ipoalbuminemia e richiede un rapido intervento di stabilizzazione del paziente, volto a

trattare sepsi e shock, seguito dal drenaggio chirurgico dell'ascesso (Wallace, 2001). L'antibioticoterapia da sola è considerata inefficace in quanto la barriera emato-prostatica, che può risultare distrutta in corso di prostatite acuta, resta intatta in presenza di infiammazioni croniche e ascessi ghiandolari ostacolando la diffusione dell'antibiotico dal torrente ematico e impedendo di raggiungere concentrazioni adeguate nel parenchima ghiandolare; inoltre la penetrazione del principio attivo nell'ascesso è spesso ostacolata dall'ischemia (Freitag et al., 2007).

La terapia chirurgica è d'elezione e consiste nel drenaggio e omentalizzazione della cavità ascessuale, laddove non sia possibile la completa resezione (White e Williams, 1995, White, 2000). L'omentalizzazione, rispetto a tecniche impiegate in precedenza quali drenaggio, marsupializzazione e prostatectomia (Hardie et al., 1984) esita in un minor tasso di recidiva, minor mortalità e minor insorgenza di complicazioni postoperatorie quali incontinenza urinaria (White, 2000), infezioni urinarie croniche e ricorrenti, oliguria e shock (Hardie et al., 1984).

PARTE SPERIMENTALE

CAPITOLO V

Obiettivi

La piometra e la prostatite associata ad ascesso prostatico, tra le patologie dell'apparato riproduttore nel cane, rappresentano potenziali emergenze medico-chirurgiche in quanto frequentemente associate a coinvolgimento sistemico legato all'instaurarsi di sepsi nei soggetti colpiti (Dorfman e Barsanti, 1998, Fransson et al., 2007). La sepsi, a sua volta dovuta alla diffusione di batteri o loro tossine dal focolaio infettivo primario (l'utero o la prostata, nel caso delle due patologie in esame), determina ripercussioni gravi e potenzialmente mortali, in quanto si accompagna ad alterazioni cliniche, emodinamiche (shock settico) e disfunzioni organiche (MODS) di varia entità che contribuiscono ad aumentare la mortalità negli animali colpiti (Brady e Otto, 2001).

L'elevata incidenza (se non altro caratteristica della piometra), associata alla frequente progressione sistemica delle patologie in esame ha accresciuto l'interesse verso lo studio di marker potenzialmente utili per la diagnosi, in particolare per il riconoscimento dei soggetti settici, per la stadiazione clinica con definizione della gravità del caso e per la previsione dell'*outcome*. Di particolare interesse sono quegli indicatori che, valutati all'ammissione del soggetto, agevolino l'esecuzione delle corrette scelte terapeutiche, indirizzando l'animale verso la chirurgia d'urgenza o verso la stabilizzazione preoperatoria o la terapia intensiva.

Scopo della tesi è la valutazione di potenziali indicatori associati all'*outcome* in un gruppo di cani affetti da piometra o prostatite/ascesso prostatico, sia esso inteso come sopravvivenza vs. morte degli animali malati ma anche come necessità dell'ospedalizzazione o del ricovero in terapia intensiva e durata di queste; in particolare sono stati esaminati alcuni *marker* di sepsi, tra cui alcune APP positive e negative oltre a parametri clinici ed ematobiochimici di base, valutandone le correlazioni al fine di attribuire ai diversi elementi un possibile significato prognostico.

Il lavoro prende inoltre in esame alcuni indici ematologici derivati dall'analizzatore automatico ADVIA 2120 (Siemens, USA) e in particolare un indice leucocitario di recente definizione, il *Delta Neutrophil Index* (DNI) (Nahm et al. 2008), allo scopo di valutarne l'eventuale correlazione con la presenza di patologia, con l'*outcome* e con gli altri parametri clinici ed ematobiochimici. Attualmente non esistono fonti bibliografiche riguardanti l'analisi del DNI nella specie canina.

CAPITOLO VI

Materiali e metodi

6.1 Selezione della popolazione

Sono stati inclusi nella popolazione in esame cani di sesso femminile e maschile a fronte di una diagnosi di Iperplasia Endometriale Cistica/Piometra o di Prostatite/Ascesso Prostatico, rispettivamente.

I soggetti, afferenti in regime ordinario al Servizio di Riproduzione o in regime di pronto soccorso al Servizio dedicato dell'Ospedale Didattico Veterinario, sono stati riferiti al Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, nel periodo compreso tra Gennaio 2013 e Dicembre 2015.

La diagnosi si è basata su dati anamnestici, clinici e clinicopatologici, diagnostica per immagini e, ove possibile, esami citologici specifici e batteriologici.

In particolare, una diagnosi presuntiva di piometra è stata formulata di fronte a cagne intere sessualmente mature aventi in anamnesi un estro recente (trascorso da meno di due-tre mesi) e/o sintomi tipici quali scolo vulvare, disoressia, poliuria/polidipsia, episodi di vomito, abbattimento. In assenza di dati relativi al calore o di sintomi che permettessero la localizzazione specifica del problema a livello genitale, sono stati ritenuti sufficienti sintomi aspecifici di risentimento generale in animali non castrati. La diagnosi di sede è stata poi confermata attraverso l'esame ultrasonografico del tratto genitale, laddove sia stato possibile evidenziare una raccolta endoluminale uterina, variabilmente associata alla presenza di iperplasia endometriale, semplice o cistica, oppure di assottigliamento delle pareti uterine legato all'accumulo di abbondante materiale nel lume.

Il sospetto diagnostico è stato infine confermato in base ai dati ematobiochimici, all'esame colpocitologico (compatibile con fase di diestro o anestro) e all'esame macroscopico dell'utero e del suo contenuto nei soggetti sottoposti a chirurgia.

Il sospetto di ascesso prostatico è stato formulato di fronte a cani maschi interi recanti in anamnesi sintomi tipici quali tenesmo, scolo uretrale, leucospermia, leucocituria o disturbi della deambulazione oppure sintomi aspecifici di compromissione generale quali abbattimento, disoressia, poliuria/polidipsia. L'esame ultrasonografico, eseguito specificamente per la valutazione andrologica o nel più ampio contesto di un'ecografia addominale di controllo, ha permesso la localizzazione prostatica della patologia, evidenziando la presenza di formazioni cistiche a contenuto ipo- o anecogeno all'interno del parenchima prostatico. La conferma diagnostica è stata ottenuta attraverso gli esami citologico e batteriologico del materiale contenuto nelle lesioni, campionato mediante tecnica di agoaspirazione ecoguidata, oltre che in base ai risultati degli esami ematobiochimici.

Criteri di esclusione

Sono stati esclusi dalla popolazione di studio:

- soggetti con patologie uterine a carattere di raccolta non compatibili con una diagnosi di piometra (soggetti in estro, soggetti asintomatici);
- soggetti con patologie prostatiche a carattere non infettivo (Iperplasia Prostatica con cisti di grosse dimensioni, cisti paraprostatiche);
- animali di cui fosse nota al momento della diagnosi di piometra o ascesso prostatico la presenza di importanti patologie preesistenti, quali ad esempio soggetti nefropatici e diabetici (non sono stati esclusi tuttavia i soggetti in cui si sia pervenuti successivamente alla diagnosi di patologie concomitanti);
- soggetti per i quali la raccolta dei dati clinici o il campionamento delle matrici biologiche da analizzare fossero fortemente incompleti.

Non sono stati esclusi i soggetti che riportavano in anamnesi un trattamento medico, eseguito o iniziato dal Veterinario curante prima di riferire il paziente al Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna; la scelta è stata dettata dal numero non trascurabile di animali che presentavano questa caratteristica e dal fatto che nella maggior parte dei casi il trattamento era stato iniziato da non più di un giorno.

Gruppo di controllo

Un certo numero di soggetti sani è stato incluso in un gruppo di controllo, formato da cani maschi e femmine sottoposti ad esame clinico ed esami del sangue di *routine* in vista dell'intervento di orchietomia o ovariectomia elettive; tali soggetti sono stati giudicati sani sulla base dell'esame clinico e degli esami ematobiochimici.

Per lo studio del DNI il gruppo di controllo è stato ampliato a comprendere un numero superiore di soggetti, includendo un gruppo di cani donatori di sangue, ugualmente giudicati sani sulla base degli esami clinici ed ematobiochimici.

6.2 Gestione dei pazienti, prelievo e processazione dei campioni

Tutti i soggetti sono stati sottoposti all'arrivo a raccolta anamnestica, esame clinico generale ed esame particolare dell'apparato riproduttore, il quale comprendeva l'esame ultrasonografico del tratto genitale (tranne che nei soggetti sani appartenenti al gruppo di controllo).

Nella stessa sede sono stati eseguiti prelievi di sangue finalizzati all'esecuzione degli esami ematobiochimici di base e del profilo coagulativo ristretto in vista della terapia chirurgica. Nel caso in cui i soggetti non richiedessero l'esecuzione immediata delle suddette determinazioni, i campioni sono stati ugualmente prelevati e processati per la conservazione in modo da essere sottoposti a valutazioni successive.

Sono state raccolte:

- un'aliquota di sangue in provetta con K₃-EDTA;
- un'aliquota di sangue in provetta senza anticoagulante, con gel separatore, per ottenere il siero;
- un'aliquota di sangue in provetta con Na-citrato.

Dove possibile le suddette aliquote sono state raddoppiate in modo da ottenere campioni da conservare e sottoporre a valutazioni successive. Le aliquote destinate alla conservazione sono state sottoposte a centrifugazione (3000 x g per 10 minuti) che ha permesso la separazione di siero e plasma dalla componente corpuscolata; i campioni di plasma-EDTA, siero e plasma-citrato così ottenuti sono stati stoccati in freezer a -80°C, fino al momento

delle analisi. Laddove le condizioni dei soggetti non permettessero di prelevare volumi maggiori di sangue, le aliquote per la conservazione sono state ricavate dai volumi residui dopo l'esecuzione delle analisi richieste al tempo zero.

Tutti i prelievi sono stati eseguiti nel rispetto dello stato del paziente, tenendo conto di fattori quali scarso peso corporeo e condizioni cliniche particolarmente compromesse, che avrebbero potuto precludere un adeguato campionamento o rendere lo stesso dannoso per l'animale.

I campioni di sangue intero per l'esame emocromocitometrico sono stati raccolti in K₃-EDTA con provette VACUTEST[®] (Kima) e processati entro un'ora dal prelievo; l'analisi è stata condotta utilizzando il sistema automatizzato per ematologia *Automated Hematology System ADVIA[®] 2120*, (Siemens, USA), dopo aver sottoposto i campioni ad agitazione tramite Vortex (Reamix 2789). La morfologia cellulare è stata inoltre valutata attraverso l'allestimento di strisci ematici successivamente letti al microscopio.

Il plasma ottenuto in seguito alla separazione mediante centrifugazione di una delle aliquote raccolte in K₃-EDTA è stato inviato presso il Laboratorio di Biochimica Clinica dell'A.O.U. Città della Salute e della Scienza di Torino per la determinazione della Procalcitonina.

Il campione di sangue senza anticoagulante è stato raccolto in provette VACUTEST[®] (Kima) con *Gel and clot activator*, poste immediatamente in termoblocco (THERMOBLOC, FALC) a 37°C per 30 minuti e successivamente centrifugate a 3000 x g per 10 minuti per ottenere la separazione del siero. Quest'ultimo è stato utilizzato per eseguire un'analisi biochimica di base, successivamente ampliata a comprendere alcuni dei parametri oggetto di studio, grazie all'utilizzo delle aliquote di siero conservate.

Il sangue in Na-citrato è stato raccolto in provette VACUTEST[®] (Kima, allestite con Na-citrato in soluzione 0.11 mol/l, rapporto Na-citrato/sangue di 1 + 9) e processato in laboratorio entro 2 ore dal prelievo. Il campione è stato sottoposto a centrifugazione per 10 minuti a 3000 x g ottenendo la separazione del plasma-citrato; il surnatante è stato quindi prelevato con pipette monouso, evitando lo strato eritrocitario sottostante, al fine di ottenere un campione di plasma povero di piastrine. Su questa matrice sono stati eseguiti

un profilo coagulativo ristretto e, in un secondo momento, la determinazione di Fibrinogeno e Antitrombina.

Oltre ai prelievi ematici, tutti i soggetti all'arrivo sono stati sottoposti a stadiazione clinica mediante il sistema multivariabile APPLE_{fast} proposto da Hayes et al. (2010). Tale modello prende in esame glicemia, albuminemia, lattatemia, conta piastrinica e stato mentale valutati nel paziente al momento dell'ammissione, assegnando un punteggio in base al valore di ciascuna variabile per un totale che va da 0 a 50 punti (vedi Figura 6.1).

Allo stato mentale è stato attribuito un valore secondo i criteri riportati in Tabella 6.1 che hanno successivamente permesso di assegnare un punteggio al parametro in esame.

Glicemia e lattatemia sono state misurate mediante l'impiego di analizzatori portatili con strisce reattive ad inserimento manuale, validati per la specie canina (Abbott Diabetes Care Optimum Xceed e Lactate-Scout Analyzer, rispettivamente).

7	8	9	10	Glucosio (mg/dl)				
<84	84-102	103-164	165-273	>273				
	8	7	6	Albumina (g/dl)	2			
	<2,6	2,6-3,0	3,1-3,2	3,3-3,5	>3,5			
				Lattato (mmol/l)	4	8	12	
				<2	2-8	8-10	>10	
5	6	3		Piastrine (10³/mm³)	1			
<151	151-200	201-260		261-420	>420			
				Stato mentale	4	6	7	14
				0	1	2	3	4

Figura 6.1. Sistema di stadiazione clinica APPLE_{fast} (modificato, da Hayes et al., 2010); ai valori riportati nella colonna centrale è assegnato punteggio 0.

Stato mentale – valutato al momento dell’ammissione e prima della somministrazione di sedativi o analgesici:
0 Normale;
1 Depresso, ma in grado di mantenere la stazione;
2 Depresso, in grado di mantenere la stazione se assistito ma responsivo agli stimoli;
3 Incapace di mantenere la stazione ma responsivo agli stimoli;
4 Incapace di mantenere la stazione e di rispondere agli stimoli esterni.

Tabella 6.1. Valutazione dello stato mentale e attribuzione di un punteggio da utilizzare nella stadiazione clinica secondo il metodo APPLE fast (modificata da Hayes et al., 2010).

6.3 Determinazioni e metodiche analitiche

Per tutti i soggetti della popolazione in esame e del gruppo di controllo sono stati eseguiti:

- un esame emocromocitometrico, comprendente Ematocrito (Hct %), Emoglobina (Hb gr%), Eritrociti (RBC/mm³), volume corpuscolare medio (MCV fL), Emoglobina corpuscolare media (MCH %), concentrazione corpuscolare media di Emoglobina (MCHC %), ampiezza della distribuzione degli Eritrociti (RDW %), Reticolociti (per mm³), Piastrine (PLT/mm³), volume piastrinico medio (MPV fL), Leucociti totali (WBC/mm³) e conta differenziale (Neutrofili, Linfociti, Monociti e Basofili per mm³), *Delta Neutrophil index* (DNI %) e indici piastrinici: ampiezza della distribuzione dei volumi piastrinici (PDW %), densità piastrinica media (MPC gr%), ampiezza della distribuzione della densità piastrinica (PCDW %), massa piastrinica media (MPM pg), ampiezza di distribuzione della massa piastrinica (PMDW %), numero di macropiastrine (LP/mm³) e di aggregati (PLT-clumps/mm³).

- un profilo biochimico di base comprendente: Aspartato-Aminotrasferasi (AST U/l), Alanina-Aminotrasferasi (ALT U/l), Fosfatasi Alcalina (AP U/l), Creatinina (mg/dl), Urea (mg/dl), Glucosio (mg/dl), Bilirubina totale (mg/dl), Colesterolo (mg/dl), Gammaglutamiltraferasi (GGT U/l), proteine totali (g/dl), Albumina (g/dl), rapporto Albumina/Globuline (A/G), Calcio totale (Ca mg/dl), Fosforo (P mg/dl), Sodio (Na mEq/l), Potassio (K mEq/l) e Cloro (Cl mEq/l).

- un profilo coagulativo ristretto, comprendente il Tempo di Protrombina (PT) e il tempo di Tromboplastina Parziale attivata (aPTT).

Sono inoltre stati determinati i seguenti parametri: sideremia (su siero), comprendente Ferro totale (Fe $\mu\text{g}/\text{dl}$), Transferrina (capacità totale di legare il Ferro, TIBC $\mu\text{g}/\text{dl}$), capacità di riserva della Transferrina (UIBC $\mu\text{g}/\text{dl}$), Saturazione della Transferrina (%); Proteina C-reattiva (CRP mg/dl) (su siero); Procalcitonina (PCT) (su plasma-EDTA); Fibrinogeno (g/l) e attività dell'Antitrombina (ATIII %) (su plasma-citrato).

L'esame emocromocitometrico è stato eseguito utilizzando il sistema per ematologia automatizzato *Automated Hematology System ADVIA*[®] 2120, (Siemens, USA), oltre alla lettura al microscopio di strisci ematici allestiti a fresco e colorati con colorazioni apposite per ematologia.

Le determinazioni su siero e plasma-citrato sono state eseguite grazie all'applicazione metodiche installate sull'analizzatore automatico OLYMPUS 400.

Tutte le determinazioni (ad eccezione della Procalcitonina, valutata presso un laboratorio esterno) sono state eseguite presso il Laboratorio del Servizio di Patologia Clinica (CLINLAB) del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna.

Calcio Totale:

La determinazione quantitativa di calcio totale nel siero è stata eseguita mediante l'uso di un test colorimetrico fotometrico (Calcium Arsenazo OSR60117).

Principio del test: il test si basa sulla reazione degli ioni Calcio con Arsenazo III, che forma un composto di colore viola intenso. L'assorbanza del complesso Calcio-Arsenazo III, a pH 6,9, viene misurata bicromaticamente a 660/700 nm; l'aumento dell'assorbanza nella miscela di reazione è direttamente proporzionale alla concentrazione di calcio nel campione.

Reagenti:

Imidazolo (pH 6,9)

Arsenazo III (0,1-0,2%)

Conservante

Conservazione:

Il reagente rimane stabile in confezione integra a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata.
Una volta aperto resta stabile per 90 giorni.

Linearità: il test è lineare all'interno di un intervallo di concentrazione pari a 4-20 mg/dl (1-5mmol/l) per il siero. Il test è lineare all'interno di un range di concentrazione di 0-40 mg/dl (0-10 mmol/l) per l'urina.

Interferenze:

Ittero - interferenza inferiore al 3% fino a 40mg/dl di bilirubina;

Emolisi - interferenza inferiore al 3% fino a 5g/l di emoglobina;

Lipemia - interferenza inferiore al 10% fino a 1000 mg/l di Intralipid;

Magnesio - interferenza inferiore al 10% fino a 4 mmol/l di magnesio.

Albumina:

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

Principio del test:

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

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione:

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

Reagente R1	Soluz. Tampone succinato (pH 4,2) 100 mmol/l	Conservazione: 2-25° a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Controllo	Controlli Olympus Cat.-N° ODC0003, ODC0004	Conservazione: 2-8°C fino a 7 gg 15-25°C a 2 gg

Tabella 6.2. Reagenti, Controllo di qualità e Calibrazioni per la determinazione dell'Albumina.

Linearità e sensibilità analitica:

Il metodo è lineare per concentrazioni comprese tra 1,5-6,0 g/dl; il livello minimo rilevabile si stima essere 0,07g/l

Interferenze:

Bilirubina- interferenze inferiori al 10% fino a 40mg/dl o 684 µmol/l di bilirubina

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

Lipemia- interferenze inferiori al 10% fino a 8000 mg/dl di Intralipid

CRP:

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

Reagenti, 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 6.3. Reagenti, Controllo di qualità e Calibrazioni per la CRP.

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

Linearità: il metodo è lineare per concentrazioni comprese nell'intervallo di 0,01-10 mg/dl.

Interferenze:

Bilirubina - nessuna interferenza significativa fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta;

Emolisi - concentrazioni di emolisato aggiunto di 500 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 10%;

Lipidi - concentrazioni di lipidi aggiunti di 1000 mg/dl portano ad un'interferenza significativa del 20%.

Transferrina:

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

Ferro totale:

Il ferro totale del campione di siero è stato misurato attraverso la metodica colorimetrica di Olympus (Olympus System Reagent – IRON, EO50SR61235). Il metodo quantitativo si avvale di un substrato cromogeno (TPTZ) che reagisce con lo ione ferroso per formare un complesso di colore blu con massima assorbanza a 600/800 nm.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione:

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 6.4. Reagenti, Controllo di qualità e Calibrazioni per la determinazione del Ferro.

Principio del test:

Transferrina $2(\text{Fe}^{3+}) \rightarrow 2(\text{Fe}^{3+}) + \text{Apo transferrina}$

$2(\text{Fe}^{3+}) + \text{Acido ascorbico} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2(\text{Fe}^{2+}) + \text{Acido deidroascorbico} + 2\text{H}_3\text{O}^+$

$\text{Fe}^{2+} + \text{TPTZ} \rightarrow \text{Complesso di Ferro di colore Blu}$

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- interferenza 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%.

UIBC:

La “capacità ferro- legante insaturata” o UIBC è stata valutata mediante un test colorimetrico di tipo quantitativo (Olympus System Reagent – UIBC, OSR 61205).

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 6.5. Reagenti, Controllo di qualità e Calibrazioni per la determinazione dell'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%.

Fibrinogeno:

Per la determinazione del Fibrinogeno è stata utilizzata una metodica di tipo turbidimetrico, validata nel nostro laboratorio per il cane.

Reagenti, Controllo di Qualità e Calibrazione:

Fibrinogeno Reagente R1	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°
Fibrinogeno Reagente R2	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°
Fibrinogeno Standard	Fibrinogeno umano liofilizzato 2 g/l	Conservazione: 2-6°C Stabilità 7 gg
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 7 gg

Fibrinogeno Controllo, livello basso	Fibrinogeno umano liofilizzato 1 g/l	Conservazione: 2-6°C Stabilità 7 gg
---	---	--

Tabella 6.6. Reagenti, Controllo di qualità e Calibrazioni per la determinazione del Fibrinogeno.

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

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

Altri dati: Temperatura 25°C, Lunghezza d'onda 340 nm.

Antitrombina:

La determinazione quantitativa dell'attività di AT nel plasma citrato è stata ottenuta mediante un test colorimetrico (Antitrombin III, Cobas), impiegando analizzatori automatici di chimica clinica di Roche (11930028 216 Roche/Hitachi).

Reagenti, Conservazione e Stabilità:

Reagente R1	Reattivi di trombina Tampone TRIS/HCl: 100 mmol/L, pH8,1; eparina (mucosa porcina): 2U/mL; aprotinina (polmone bovino): 6,5U/mL; NaCl: 270 mmol/L; trombina (plasma bovino): 0,38 U/mL	Conservazione: integro a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata; 28 giorni aperto e refrigerato sull'analizzatore
-------------	---	--

Reagente R2	Substrato (reattivo starter) MeOCO-gli-pro-arg-pNA . AcOH: 1,8mmol/L	Conservazione: integro a 2-8°C fino alla data di scadenza indicata; 28 giorni aperto e refrigerato sull'analizzatore
-------------	--	--

Tabella 6.7. Reagenti, Controllo di qualità e Calibrazioni per la determinazione dell'Antitrombina.

Principio del metodo: al campione si aggiungono eparina e una quantità predefinita di trombina in eccesso. Tutta l'AT presente viene legata e forma un complesso inattivo. La trombina non inibita rilascia p-nitroanilina dal substrato cromogeno MeOCO-gli-pro-arg-pNA. Poichè la quota residua di trombina è inversamente proporzionale all'attività dell'AT nel campione, l'aumento dell'estinzione ad una lunghezza d'onda di 405 nm ci consente di calcolare tale parametro.

Interferenze:

Ittero - nessuna interferenza significativa fino a concentrazioni di bilirubina coniugata e non coniugata di 29mg/dl;

Emolisi - nessuna interferenza significativa fino ad una concentrazione di emoglobina di circa 1000mg/dl;

Lipemia - nessuna interferenza significativa fino ad una concentrazione di trigliceridi di circa 2500 mg/dl.

L'irudina, un potente inibitore della trombina, interferisce nei test per la ricerca di AT che impiegano trombina. Concentrazioni di irudina di 1microg/ml provocano valori di AT falsamente alti.

Procalcitonina:

La Procalcitonina è stata determinata attraverso un test in elettrochemiluminescenza (ECLIA) disponibile per gli analizzatori automatici Roche Elecsys, Cobas e Roche Modular E170,

6.4 Analisi statistica

Per l'analisi statistica e la creazione di grafici è stato utilizzato il software per statistica medica MedCalc® versione 15.11.4 disponibile online (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2015).

I dati nella statistica descrittiva sono stati espressi come mediana e *range* o, nel caso di parametri caratterizzati da distribuzione normale (es. APPLE_{fast} score), come media \pm deviazione standard; la normalità è stata valutata con il test D'Agostino-Pearson. Il confronto tra i diversi gruppi è stato effettuato utilizzando il test U di Mann-Whitney e il test di Kruskal-Wallis (non parametrici) o il t-test per campioni indipendenti (parametrico). I risultati sono stati ritenuti statisticamente significativi per $P < 0,05$.

La regressione logistica univariata è stata utilizzata per analizzare l'associazione delle variabili cliniche e clinicopatologiche con l'*outcome*; i parametri che abbiano mostrato associazione con l'*outcome* all'analisi univariata sono poi stati inclusi in modelli multivariabili (*Stepwise selection*, escludendo i fattori con $P > 0,1$). I risultati della regressione logistica binaria sono presentati come Odds Ratio e Intervallo di Confidenza al 95%. L'attendibilità generale dei modelli è stata valutata stimando la percentuale di casi correttamente classificati attraverso l'analisi delle curve ROC e valutando la significatività del test di Hosmer-Lemeshow ($P > 0,05$). Le curve ROC sono state utilizzate per individuare il valore di *cut-off* ideale per alcune delle variabili associate alla prognosi e per il calcolo dell'AUC.

Per il confronto tra variabili categoriche è stato inoltre impiegato il test di Fisher.

Le diverse variabili, infine, sono state paragonate tra di loro attraverso correlazioni lineari utilizzando i coefficienti di correlazione di Pearson o di Spearman per dati non parametrici.

CAPITOLO VII

Risultati

7.1 Descrizione della popolazione di studio

La popolazione di studio comprende un totale di 75 cani, selezionati in base ai criteri sopra riportati, con caratteristiche eterogenee per età, peso corporeo e razza.

7.1.1 Segnalamento

All'interno della popolazione, 66 soggetti erano di sesso femminile e risultavano affetti da piometra, 7 soggetti erano di sesso maschile e risultavano affetti da prostatite e ascesso prostatico e 2 animali rispondevano alla definizione di maschi pseudoermafroditi (Christensen, 2012), affetti da infiammazione con raccolta a carico di una struttura vestigiale simil-uterina compatibile con residuo del Dotto di Müller. Tali soggetti, pur risultando fenotipicamente maschi, sono stati inclusi nel gruppo degli animali colpiti da piometra a causa della localizzazione della patologia; l'utero vestigiale, infatti, risultava istologicamente costituito da mucosa simil-endometriale colpita da iperplasia cistica e infiammazione cronica.

Gli animali nel loro insieme presentavano un peso corporeo variabile tra 2,7 e 65,5 kg (peso medio \pm deviazione standard: $22,5 \pm 14,4$ kg) e un'età compresa tra i 9 mesi e i 16 anni (età media \pm dev.st.: $9,5 \pm 3,5$ anni, età mediana 10 anni)

Di seguito sono riportate l'età media e mediana al momento della diagnosi nelle diverse taglie all'interno della popolazione (Tabella 7.1) e in relazione alla patologia (Tabella 7.2).

	Età mediana (anni) (min-max)
Piccola (< 10 kg) (N = 19)	11 (4-16)
Media (11-25 kg) (N = 24)	11.5 (0,75-16)
Grande e gigante (> 26 kg) (N = 29)	8 (4-13)

Tabella 7.1. Distribuzione dell'età a seconda della taglia (piccola, media o grande/gigante) nei soggetti malati, espressa come mediana e range.

	Taglia	Età mediana (anni) (min-max)
Piometra (N = 64)	Piccola (< 10 kg) (N = 18)	11 (4-16)
	Media (11-25 kg) (N = 21)	12 (0,75-16)
	Grande e gigante (> 26 kg) (N = 25)	8 (4-13)
Prostatite/Ascesso Prostatico (N = 6)	Media (11-25 kg) (N = 3)	9 (7-14)
	Grande e gigante (> 26 kg) (N = 3)	8 (4-12)
Soggetti maschi pseudoermafroditi con "piometra" (N = 2)	Piccola (< 10 kg) (N = 1)	
	Grande e gigante (> 26 kg) (N = 1)	

Tabella 7.2. Distribuzione dell'età a seconda della patologia (piometra o prostatite/ascesso prostatico) e della taglia (piccola, media o grande/gigante), espressa come mediana e range. Sono considerati parte i due soggetti maschi pseudoermafroditi con infezione a carico del residuo del Dotto di Müller.

Le razze maggiormente rappresentate includevano Pastore Tedesco (9,3 %), Barboncino, Golden Retriever e Rottweiler (4,0 % ciascuno), Bulldog Francese, Cavalier King Charles Spaniel, Cocker Spaniel, Dobermann, Labrador, Pit Bull, Setter Inglese e Yorkshire Terrier

(2,6 % ciascuno), mentre il 30,6 % della popolazione era costituito da meticci e il restante 26,6 % da razze differenti (Figura 7.1).

I due maschi pseudoermafroditi appartenevano alle razze Schnauzer nano e Basset Hound,

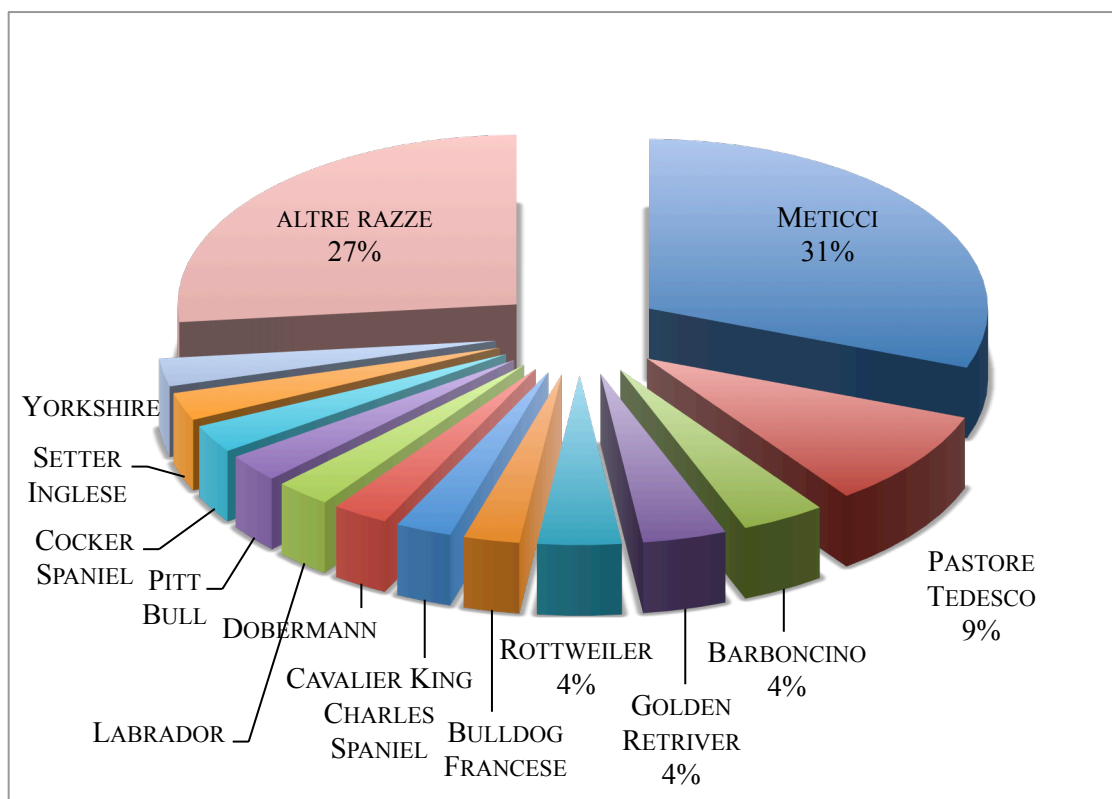


Figura 7.1. Distribuzione delle razze nella popolazione di studio.

7.1.2 Sintomatologia clinica

I sintomi clinici riportati al momento della diagnosi includevano la presenza di perdite, vulvari o uretrali nel caso dei maschi, (presenti nel 56% dei soggetti), variabilmente associate a sintomi di coinvolgimento sistemico quali: alterazione dello stato mentale (51%), inappetenza o anoressia (71%), polidipsia (41%) e poliuria (25%), episodi di vomito (24%) o diarrea (5%), dimagrimento (5%); sono stati riportati inoltre aumento di volume dell'addome (11%) e addome acuto o dolorabilità addominale (4%). Il tenesmo era presente in 2 su 7 soggetti maschi (29%). Segni clinici meno frequenti comprendevano difficoltà nella deambulazione, infertilità, pollachiuria e pigmenturia. Iper- e ipotermia erano presenti, rispettivamente nel 53% e nell'8% dei casi.

La distribuzione dei segni clinici nella popolazione di studio e nel gruppo dei soggetti affetti da piometra sono riportate nelle Figure 7.2 e 7.3.

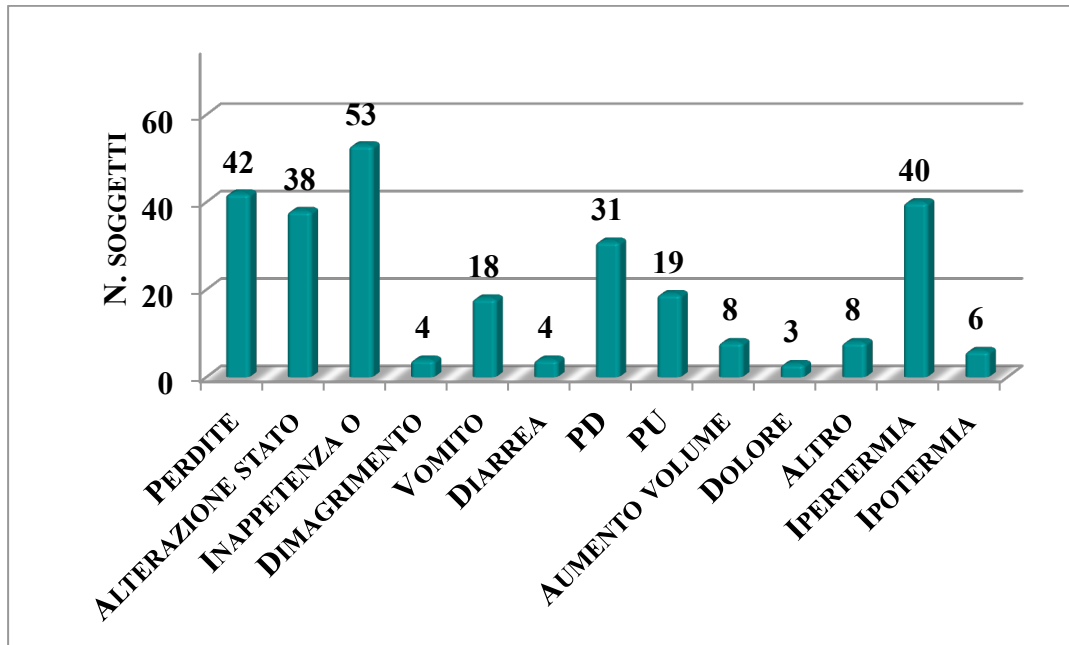


Figura 7.2. Principali sintomi clinici presentati dalla popolazione in esame, riferiti dai proprietari al momento dell'ammissione. Sono riportati inoltre i risultati relativi alla rilevazione di iper- o ipotermia all'ammissione.

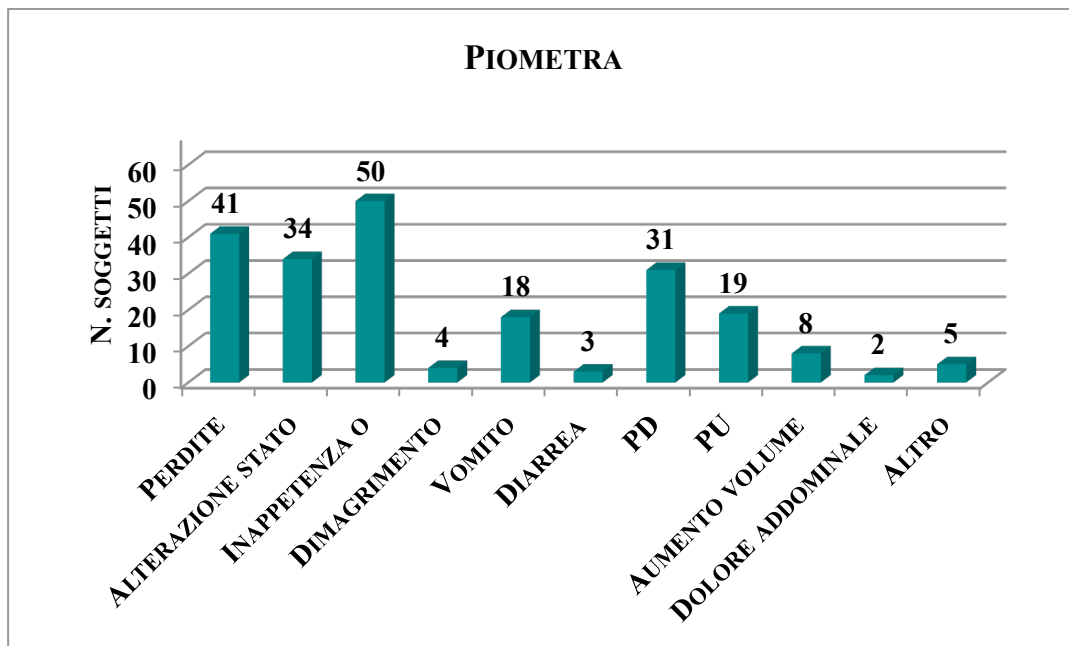


Figura 7.3. Principali sintomi clinici presentati dai soggetti con Piometra (N = 68), riferiti dai proprietari al momento dell'ammissione.

La sintomatologia era presente da un lasso di tempo variabile tra 1 e 90 giorni al momento della diagnosi (media $9,2 \pm 13,8$ giorni, mediana 4 giorni), come riportato in Figura 7.4.

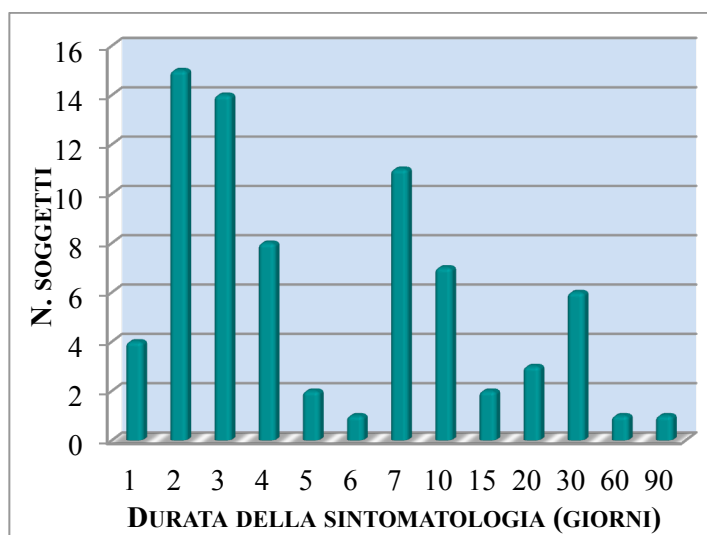


Figura 7.4. Durata della sintomatologia nella popolazione di studio, come riferito dai proprietari al momento dell'ammissione.

Temperatura, frequenza cardiaca e frequenza respiratoria, misurate all'ammissione, sono riportate nella Tabella 7.3.

		Mediana [min – max]
T (°C)	(N = 71)	39,1 [34,5 – 41,1]
FC (bpm)	(N = 57)	120 [50 – 240]
FR (atti/min)	(N = 28)	36 [12 – 200]

Tabella 7.3. Temperatura, frequenza cardiaca (FC) e frequenza respiratoria (FR) misurate nei soggetti della popolazione di studio all'ammissione (esprese come mediana, valore minimo e valore massimo).

7.1.3 Stadiazione clinica, trattamento e *outcome*

All'ammissione gli animali presentavano un APPLE_{fast} score variabile tra 7 e 38 punti (media \pm dev.st.: $19,76 \pm 5,55$ punti, N = 72); i valori in relazione alle diverse patologie sono presentati in Tabella 7.4.

APPLE _{fast} score	
Media \pm dev.st.	
Piometra (N = 62)	$19,84 \pm 5,60$
Prostatite/ascesso prostatico (N = 7)	$17,33 \pm 4,46$

Tabella 7.4. *APPLEfast score presentato all'ammissione dai soggetti colpiti, rispettivamente, da piometra o prostatite/ascesso prostatico (espresso come media \pm deviazione standard).*

Dei 75 soggetti inclusi, 70 sono stati sottoposti a trattamento chirurgico per la risoluzione della piometra o dell'ascesso prostatico e un soggetto è stato trattato con protocollo medico per la piometra; dei restanti 4 animali non trattati chirurgicamente, 3 sono stati sottoposti ad eutanasia per complicazioni insorte durante il ricovero in terapia intensiva o durante la stabilizzazione in attesa della chirurgia e uno è stato soppresso all'ammissione a causa della condizioni cliniche scadenti.

Per 49 soggetti su 75 (65%) è stata necessaria un'ospedalizzazione perioperatoria, di durata variabile tra 1 e 12 giorni (media $2,8 \pm 2,2$ giorni, mediana 2 giorni). Per 15 animali si è reso necessario il ricovero in terapia intensiva (tali soggetti rappresentano il 31% dei ricoverati e 20% della popolazione totale). Di questi, 12 cani si trovavano in sepsi grave (16% dei malati) e, tra essi, 4 erano in shock settico (5,3% dei malati).

Nel complesso 67 animali sono sopravvissuti (89%) e 8 sono deceduti (11%): oltre ai quattro sopra menzionati, un soggetto è deceduto durante la chirurgia e tre durante il ricovero postoperatorio.

7.2 Analisi statistica dei risultati

La popolazione di studio è stata esaminata nel suo insieme e in confronto con il gruppo di controllo (“malati” vs “sani”). Il gruppo dei malati, inoltre è stato studiato in funzione dell’*outcome* (“vivi” vs “morti”) e della gravità delle manifestazioni cliniche (“sepsi” vs “sepsi grave” vs “shock settico”); si sono valutate inoltre correlazioni con l’ospedalizzazione (durata del ricovero nei soggetti ospedalizzati) e con la necessità di ricovero in terapia intensiva (ICU).

Ciascuna variabile esaminata all’interno della popolazione di studio è stata valutata in funzione dei valori di riferimento ritenuti normali per quel parametro nel cane ed è stata oggetto dell’analisi comparativa tra le diverse sottocategorie create.

7.2.1 Statistica descrittiva

I diagrammi che seguono mostrano la distribuzione dei valori delle principali variabili misurate nella popolazione di studio, rispetto ai valori di riferimento: nella rappresentazione grafica tipo *box-and-whisker*, il box comprende i valori dal 25° al 75° percentile, la linea entro il box indica il valore mediano, i punti terminali della linea verticale mostrano i valori minimo e massimo misurati, escludendo gli *outliers*.

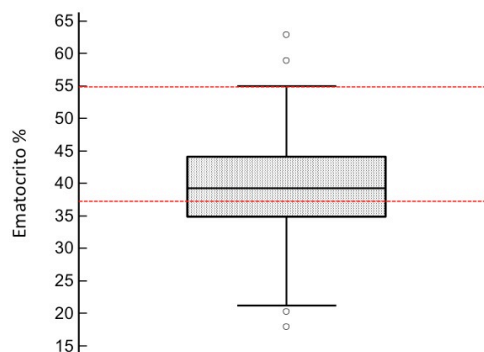


Figura 7.5. Distribuzione dei valori di Ematocrito (%) all’interno della popolazione di studio (17,9-62,9, valore mediano 39,25). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l’Ematocrito nel cane (37,0-55,0).

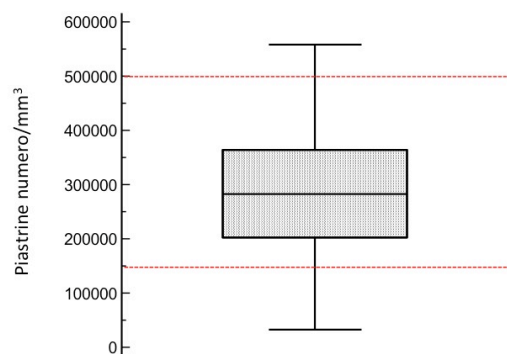


Figura 7.6. Distribuzione dei valori di Piastrine (cellule/mm³) all'interno della popolazione di studio (33000-558000, valore mediano 282000). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per la conta piastrinica nel cane (150000-500000).

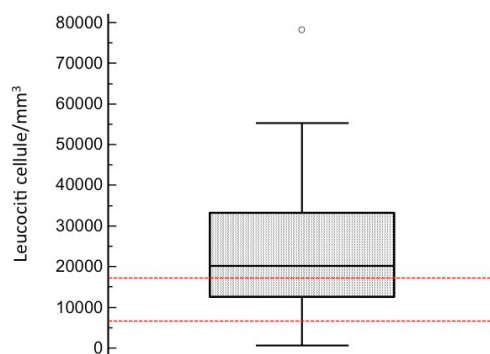


Figura 7.7. Distribuzione dei valori di Leucociti (cellule/mm³) all'interno della popolazione di studio (621-78190, valore mediano 20145). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per i Leucociti nel cane (6000-17000).

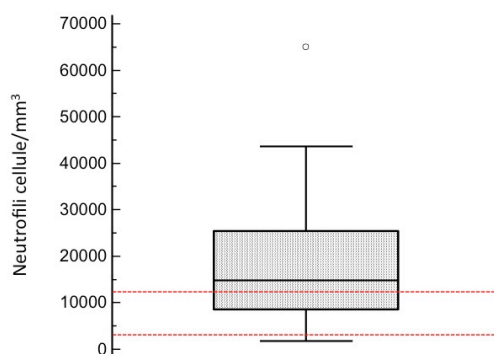


Figura 7.8 Distribuzione dei valori di Neutrofili (cellule/mm³) all'interno della popolazione di studio (1720-65000, valore mediano 14925). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per i Neutrofili nel cane (3000-12000).

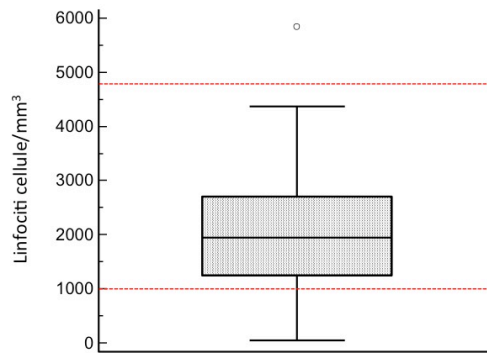


Figura 7.9 Distribuzione dei valori di Linfociti (cellule/mm³) all'interno della popolazione di studio (50-5840, valore mediano 1950). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per i Linfociti nel cane (1000-4800).

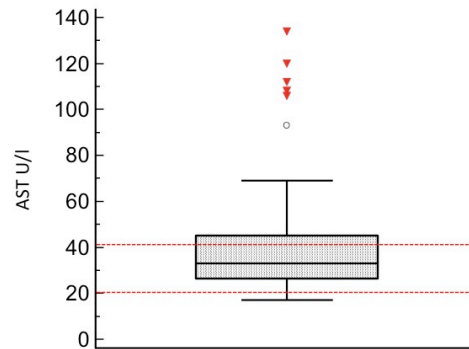


Figura 7.10. Distribuzione dei valori di AST (U/l) all'interno della popolazione di studio (17-1517, valore mediano 33). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l'AST nel cane (20-42).

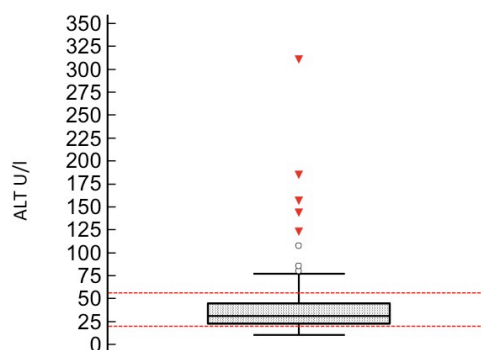


Figura 7.11. Distribuzione dei valori di ALT (U/l) all'interno della popolazione di studio (10-311, valore mediano 31). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l'ALT nel cane (20-55).

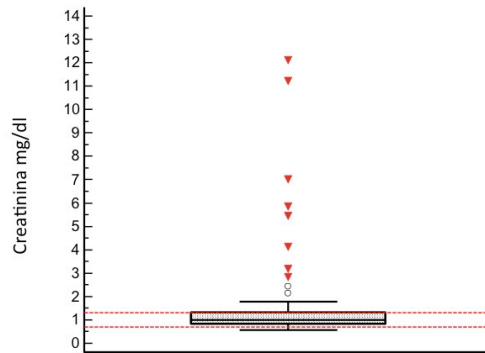


Figura 7.12. Distribuzione dei valori di Creatinina (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (0,57-12,1, valore mediano 0,99). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per la Creatinina nel cane (0,65-1,35).

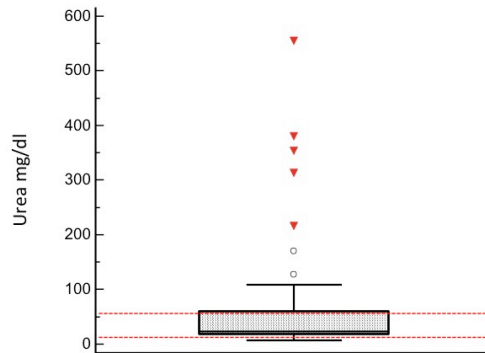


Figura 7.13. Distribuzione dei valori di Urea (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (6,52-555,28, valore mediano 23,00). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l'Urea nel cane (18-55).

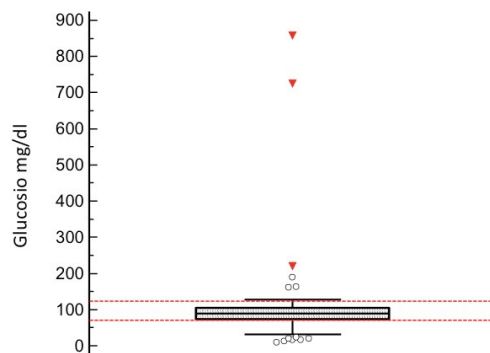


Figura 7.14. Distribuzione dei valori di Glucosio (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (8-858, valore mediano 89). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per la Glicemia nel cane (70-125).

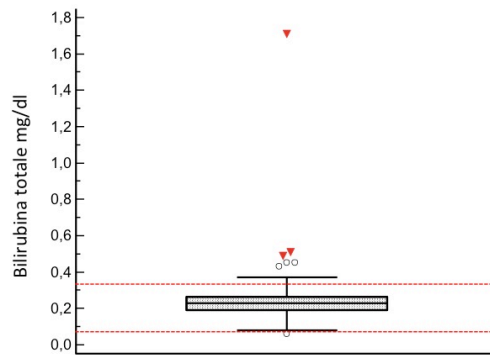


Figura 7.15. Distribuzione dei valori di Bilirubina totale (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (0,06-1,71, valore mediano 0,23). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per la Bilirubina totale nel cane (0,07-0,34).

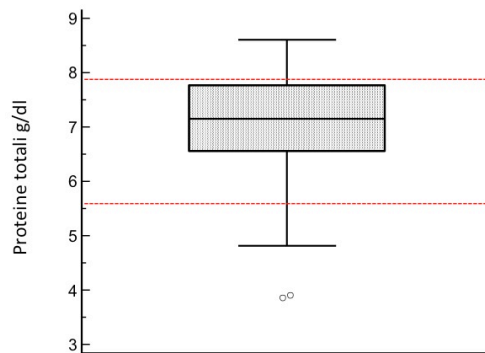


Figura 7.16. Distribuzione dei valori di Proteine totali (g/dl) all'interno della popolazione di studio (3,85-8,61, valore mediano 7,15). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per le Proteine totali nel cane (5,6-7,9).

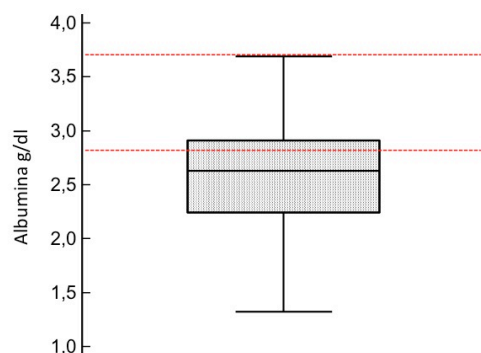


Figura 7.17. Distribuzione dei valori di Albumina (g/dl) all'interno della popolazione di studio (1,32-3,69, valore mediano 2,63). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l'Albumina nel cane (2,8-3,7).

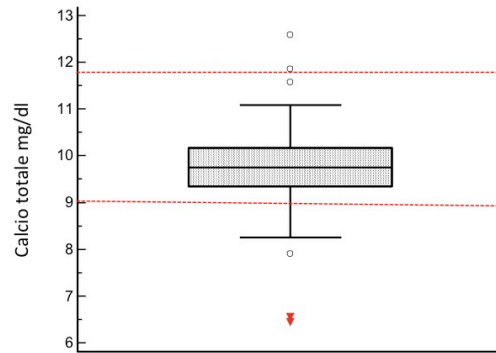


Figura 7.18. Distribuzione dei valori di Calcio totale (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (0,09-12,58, valore mediano 9,75). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l'ALT nel cane (9,0-11,8).

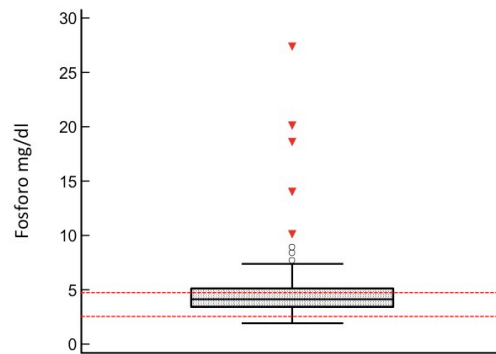


Figura 7.19. Distribuzione dei valori di Fosforo (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (1,9-27,4, valore mediano 4,1). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il Fosforo nel cane (2,6-4,9).

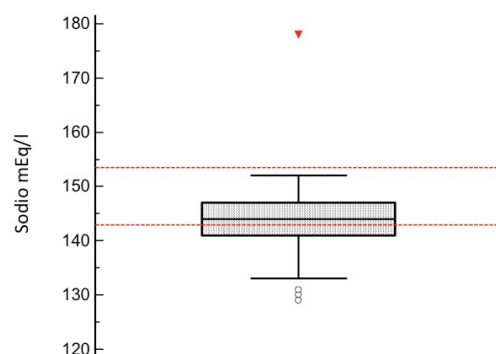


Figura 7.20. Distribuzione dei valori di Sodio (mEq/l) all'interno della popolazione di studio (129-178, valore mediano 144). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il Sodio nel cane (143-154).

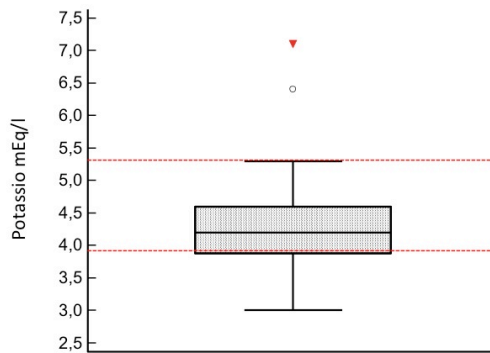


Figura 7.21. Distribuzione dei valori di Potassio (mEq/l) all'interno della popolazione di studio (3,0-7,1, valore mediano 4,2). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il Potassio nel cane (3,9-5,3).

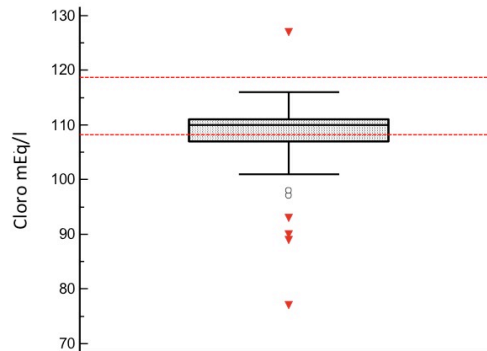


Figura 7.22. Distribuzione dei valori di Cloro (mEq/l) all'interno della popolazione di studio (77-127, valore mediano 110). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il Cloro nel cane (108-118).

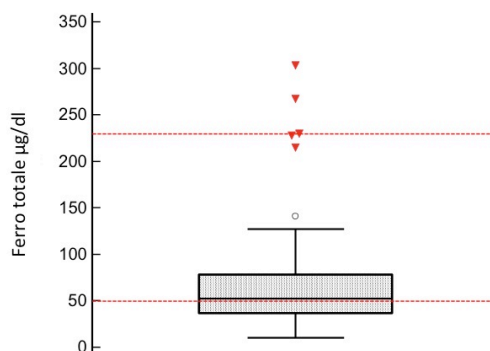


Figura 7.23. Distribuzione dei valori di Ferro totale (µg/dl) all'interno della popolazione di studio (10-303, valore mediano 52,5). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il Ferro nel cane (50-230).

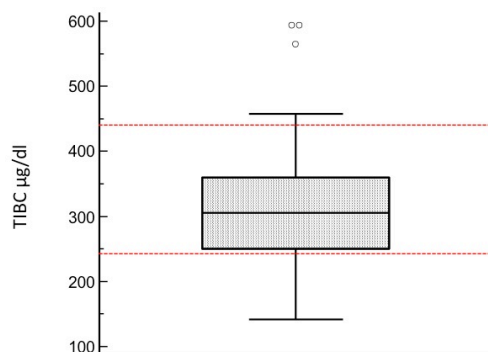


Figura 7.24. Distribuzione dei valori di TIBC ($\mu\text{g/dl}$) all'interno della popolazione di studio (142-593, valore mediano 305,5). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per la TIBC nel cane (240-440).

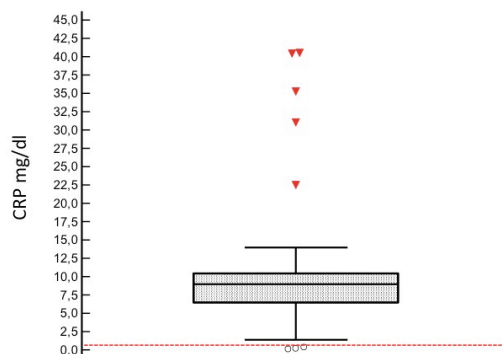


Figura 7.25. Distribuzione dei valori di CRP (mg/dl) all'interno della popolazione di studio (0,11-40,54, valore mediano 9,00). La linea rossa tratteggiata indica il limite massimo considerato normali per la CRP nel cane (0,5 mg/dl).

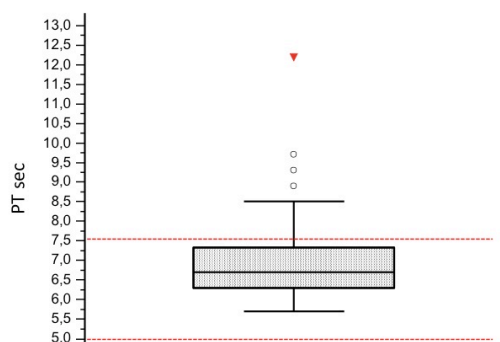


Figura 7.26. Distribuzione dei valori di PT (sec) all'interno della popolazione di studio (5,7-12,2, valore mediano 6,7). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il PT nel cane (5,0-7,5).

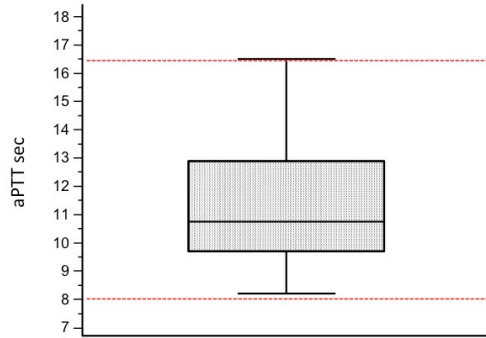


Figura 7.27. Distribuzione dei valori di aPTT (sec) all'interno della popolazione di studio (8,2-16,5, valore mediano 10,75). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per l'aPTT nel cane (8,0-16,5).

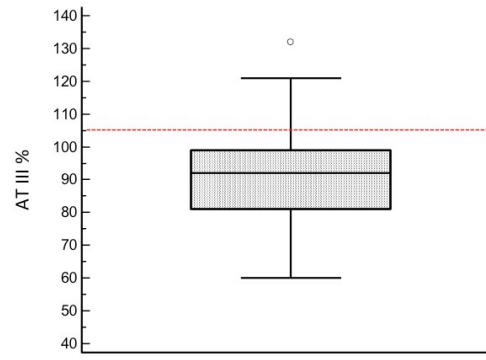


Figura 7.28. Distribuzione dei valori di AT III (%) all'interno della popolazione di studio (60-132, valore mediano 92). La linea rossa tratteggiata indica il limite minimo considerato normale per l'AT III nel cane (range 105-166).

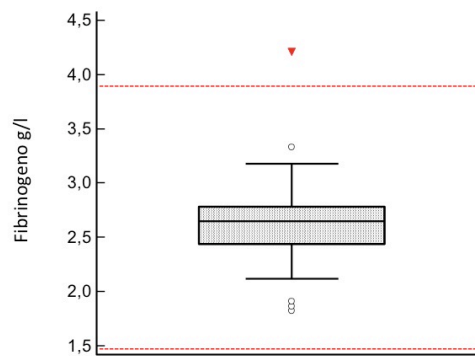


Figura 7.29. Distribuzione dei valori di Fibrinogeno (g/l) all'interno della popolazione di studio (1,82-4,21, valore mediano 2,65). Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per il Ferro nel cane (1,45-3,85).

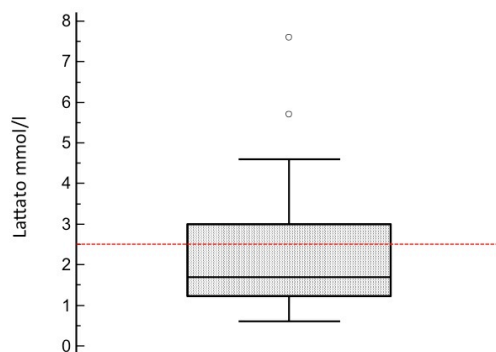


Figura 7.30. Distribuzione dei valori di Lattato (mmol/l) all'interno della popolazione di studio (0,6-7,6, valore mediano 1,7). La linea rossa tratteggiata indica il limite massimo considerato normale per la Lattatemia nel cane (2,5 mmol/l).

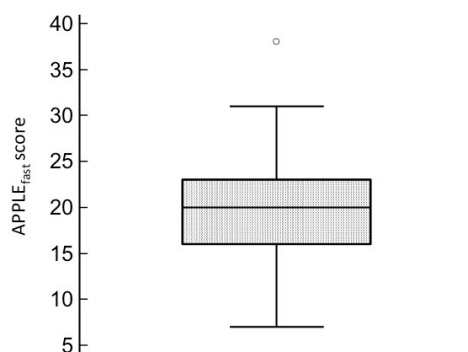


Figura 7.31. Distribuzione dei valori di Applefast score all'interno della popolazione di studio (7-38, valore mediano 20).

7.2.2 Confronto tra malati e sani

Le tabelle a seguire riportano il confronto tra il gruppo di studio (“malati”) ed il gruppo di controllo (“sani”), relativamente alle variabili studiate; qualora esistenti, le differenze tra i due gruppi sono state considerate statisticamente significative per un valore di $P < 0,05$.

Laddove mancassero i dati relativi alla popolazione di controllo in relazione ad uno o più dei parametri presi in esame, sono riportati i valori di riferimento considerati normali nel cane.

L’analisi comparativa effettuata tra i due gruppi ha rivelato differenze statisticamente significative per le seguenti variabili: Ematocrito, Leucociti totali, Neutrofili, DNI, Albumina sierica, rapporto Albumina/Globuline, Proteine totali, ALT e punteggio APPLE_{fast}. I risultati sono mostrati nelle Tabelle 7.5-7.8 .

Variabile	N	Malati	N	Sani	Intervalli di riferimento	P
Hb (gr%)	70	13,8 [3,8 – 20,5]	13	16,3 [14,7 - 20,5]	12 ... 18	NS
Hct (%)	70	39,25 [17,9 - 62,9]	14	48,15 [43,5 - 57,6]	37,0 ... 55,0	< 0,0001
Eritrociti (10 ³ /mm ³)	70	6100 [2770 – 8820]	14	7170 [6530 – 8560]	5500 ... 8500	NS
Piastrine (10 ³ /mm ³)	70	282,5 [33 – 558]	14	269 [184 – 453]	160 ... 500	NS
Leucociti (cellule/mm ³)	70	20145 [621 – 78190]	14	9765 [6700- 14770]	6000 ... 17000	0,0002
MCV (fL)	70	66,15 [58,4 – 73,6]	14	67,5 [62,1 – 72,4]	60,0 ... 77,0	NS
MCH (pgr)	69	23 [19,9 – 32,0]	13	23,7 [20,9 – 25,2]	19,5 ... 24,5	NS
MCHC (gr%)	69	34,3 [0,0 – 49,4]	14	34,8 [33,7 – 35,9]	32,0 ... 38,0	NS
RDW (%)	70	13 [9,7 – 20,2]	14	12,6 [11,8 – 20,2]	13,0 ... 15,7	NS
Linfociti (cellule/mm ³)	57	1950 [50 – 5840]	14	2205 [1710 – 4270]	1000 ... 4800	NS

Variabile	N	Malati	N	Sani	Intervalli di riferimento	P
Monociti (cellule/mm ³)	57	1520 [100 -7860]	14	500 [150 - 910]	100 ... 1400	0,0001
Neutrofili (cellule/mm ³)	56	14925 [1720–65000]	14	6505 [4060–10320]	3000 ... 12000	0,0002
Eosinofili (cellule/mm ³)	54	195 [0 – 1380]	14	620 [100 – 1710]	0 ... 750	NS
Basofili (cellule/mm ³)	48	60 [0 -1350]	14	55 [20 – 100]	0 ... 180	NS
Neutrofili banda (cellule/mm ³)	12	1557 [277 – 5110]	0	-	0 ... 300	-
DNI (%)	50	6,1 [0,00 – 76,10]	92	2,4 [0 – 9,4]	-	0,0002

Tabella 7.5. Risultati degli esami emocromocitometrici e del DNI nel gruppo dei malati e dei sani, espressi come mediana [valore minimo - valore massimo]. Sono inoltre riportati gli intervalli di riferimento considerati normali per ciascun parametro nel cane.

È indicato il valore di P qualora sia presente una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra il gruppo dei malati e dei sani, relativamente a ciascun parametro. NS, differenza non significativa.

Variabile	N	Malati	N	Sani	Intervalli di riferimento	P
AST (U/l)	73	33 [17 – 1517]	14	38 [25 – 50]	20 ... 42	NS
ALT (U/l)	73	31 [10 – 311]	14	48 [30 – 78]	20 ... 55	0,0095
Fosfatasi Alcalina (U/l)	73	388 [67 – 2358]	14	118 [46 – 348]	42 ... 180	NS
Creatinina (mg/dl)	73	0,99 [0,57 – 12,1]	14	1,015 [0,72 – 1,38]	0,65 ... 1,35	NS
Urea (mg/dl)	73	23,00 [6,52– 555,28]	14	31,195 [18,5 – 60,71]	18 ... 55	NS
Glucosio (mg/dl)	73	89 [8 – 858]	14	92 [76 – 119]	70 ... 125	NS
Bilirubina totale (mg/dl)	72	0,23 [0,06 – 1,71]	0	-	0,07 ... 0,34	-
Colesterolo totale (mg/dl)	67	318 [112 – 811]	0	-	140 ... 350	-

Variabile	N Malati		N Sani		Intervalli di riferimento	P
	N	Valore [minimo - massimo]	N	Valore [minimo - massimo]		
GGT (U/l)	67	2,8 [0,1 – 52,1]	0	-	0 ... 5,8	-
Proteine totali (g/dl)	73	7,15 [3,85 – 8,61]	14	6,765 [5,68 – 7,57]	5,6 ... 7,9	0,0360
Albumina (g/dl)	73	2,63 [1,32- 3,69]	14	3,415 [2,86 – 3, 64]	2,8 ... 3,7	< 0,0001
A/G	73	0,58 [0,32 – 1,13]	14	1,005 [0,71 -1,24]	0,60 ... 1,30	< 0,0001
Calcio (mg/dl)	72	9,745 [0,09 – 12,58]	0	-	9,0 ... 11,8	-
Fosforo (mg/dl)	72	4,1 [1,9 – 27,4]	0	-	2,6 ... 4,9	-
Sodio (mEq/l)	73	144 [129 – 178]	14	146 [143 – 149]	143 ... 154	NS
Potassio (mEq/l)	73	4,2 [3,0 – 7,1]	14	4,5 [3,9 – 5,1]	3,9 ... 5,3	NS
Cloro (mEq/l)	66	110 [77 – 127]	0	-	108 ... 118	NS
Magnesio (mEq/l)	26	1,985 [1,23 – 4,28]	0	-	1,60 ... 3,20	-
Ferro totale (µg/dl)	68	52,5 [10 – 303]	0	-	50 ... 230	-
TIBC (µg/dl)	68	305,5 [142 – 593]	0	-	240 ... 440	-
Saturazione (%)	68	18 [2 – 84]	0	-	30 ... 68	-
CRP (mg/dl)	72	8,995 [0,11 – 40,54]	0	-	0 ... 0,5	-

Tabella 7.6. Risultati degli esami biochimici nel gruppo dei malati e dei sani, espressi come mediana [valore minimo - valore massimo]. Sono inoltre riportati gli intervalli di riferimento considerati normali per ciascun parametro nel cane.

È indicato il valore di P qualora sia presente una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra il gruppo dei malati e dei sani, relativamente a ciascun parametro. NS, differenza non significativa.

Variabile	N Malati		N Sani		Intervalli di riferimento	P
PT (sec)	65	6,7 [5,7 – 12,2]	16	7,6 [6,8 – 9,9]	5 ... 7,5	NS
aPTT (sec)	66	10,75 [8,2 – 16,5]	16	9,5 [8,6 – 79,8]	8,0 ... 16,5	NS
ATIII (%)	67	92 [60 – 132]	0	-	105 ... 166	-
Fibrinogeno (g/l)	66	2,65 [1,82–4,21]	0	-	1,45 ... 3,85	-

Tabella 7.7. Risultati del profilo coagulativo ristretto e degli esami di ATIII e Fibrinogeno nel gruppo dei malati e dei sani, espressi come mediana [valore minimo - valore massimo]. Sono inoltre riportati gli intervalli di riferimento considerati normali per ciascun parametro nel cane. È indicato il valore di P qualora sia presente una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra il gruppo dei malati e dei sani, relativamente a ciascun parametro. NS, differenza non significativa.

Variabile	N	Malati	N	Sani.	P
Apple _{fast} score	66	19,76 ± 5,55	16	10,19 ± 5,15	< 0,0001

Tabella 7.8. Risultati della valutazione dell' Applefast score nel gruppo dei malati e dei sani, espressi come media ± deviazione standard. Il valore di P indica la presenza di una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra il gruppo dei malati e dei sani.

7.2.3 Confronto tra sopravvissuti e non sopravvissuti: correlazioni con l'outcome

L'analisi comparativa effettuata ha rivelato differenze statisticamente significative tra soggetti sopravvissuti e i non sopravvissuti per quanto riguarda i valori di AST, Bilirubina totale, Creatinina, Urea, Fosforo, Potassio, Cloro, aPTT e Lattatemia. I risultati sono mostrati nelle Tabella 7.9-10 e nelle Figure 7.32-41.

Variabile	N	Vivi	N	Morti	P
AST (U/l)	65	33 [17 – 134]	8	87,5 [31 – 1517]	0,0008
Creatinina (mg/dl)	65	0,97 [0,57 – 5,85]	8	4,14 [0,86 – 12,10]	0,0005
Urea (mg/dl)	65	22,58 [6,52 – 313,14]	8	101,45 [13,36 – 555,28]	0,0016
Bilirubina totale (mg/dl)	64	0,23 [0,06 – 0,51]	8	0,28 [0,16 – 1,71]	0,0291
Fosforo (mg/dl)	64	4,0 [1,9 – 8,9]	8	12,05 [3,0 – 27,4]	0,0007
Potassio (mEq/l)	65	4,2 [3,0 – 5,3]	8	5,05 [4,1 – 7,1]	0,0034
Cloro (mEq/l)	60	110 [89 – 127]	6	100,5 [77 – 108]	0,0012
aPTT (sec)	59	10,4 [8,2 – 16,5]	7	13,8 [10,1 – 16,4]	0,0336
Lattatemia (mmol/l)	46	1,7 [0,6 – 4,1]	5	4,6 [0,9 – 7,6]	0,0324

Tabella 7.9. Risultati del confronto tra il gruppo dei sopravvissuti e dei non sopravvissuti; la tabella riporta le variabili per le quali è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra i due gruppi. I valori sono espressi come mediana [valore minimo - valore massimo].

Variabile	N	Vivi	N	Morti	P
APPLE _{fast} score	66	19,19 ± 4,96	16	26,60 ± 8,26	0,0034

Tabella 7.10. Confronto tra l' APPLEfast score misurato nel gruppo dei sopravvissuti e dei non sopravvissuti. I valori sono espressi come media ± deviazione standard. È indicato il valore di P in quanto presente una differenza statisticamente significativa ($P < 0,05$) tra il gruppo dei malati e dei sani.

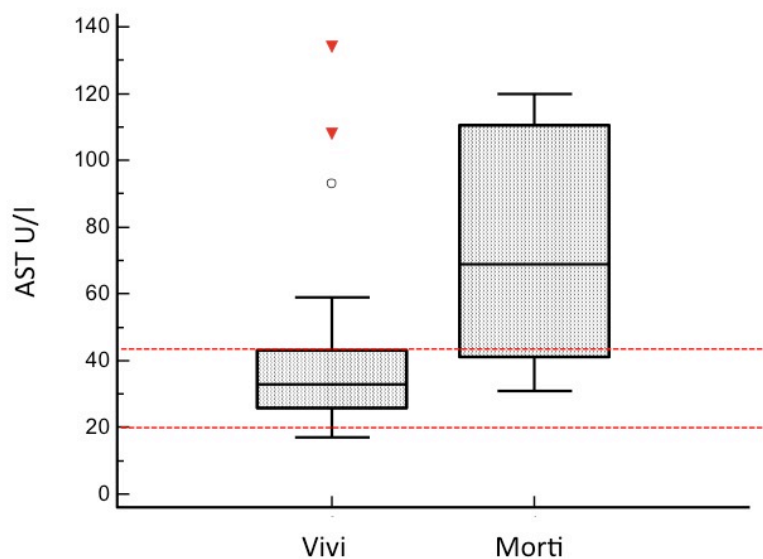


Figura 7.32. Distribuzione dei valori di AST (U/l) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (20-42).

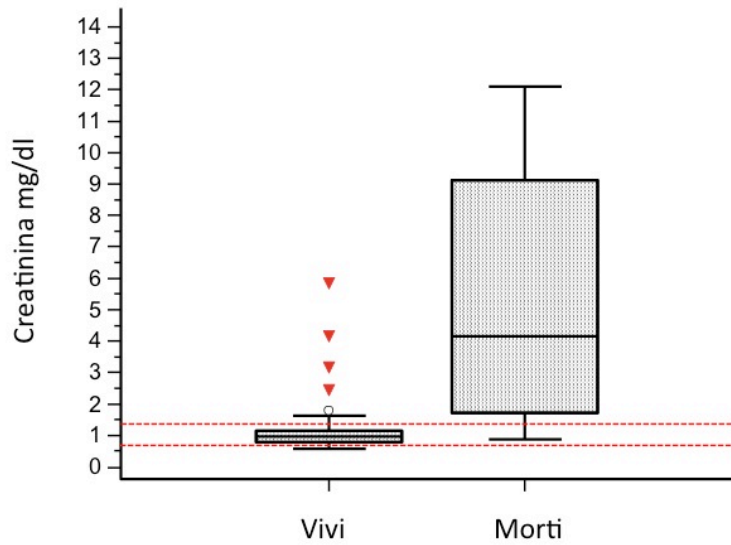


Figura 7.33. Distribuzione dei valori di Creatinina (mg/dl) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (0,65-1,35).

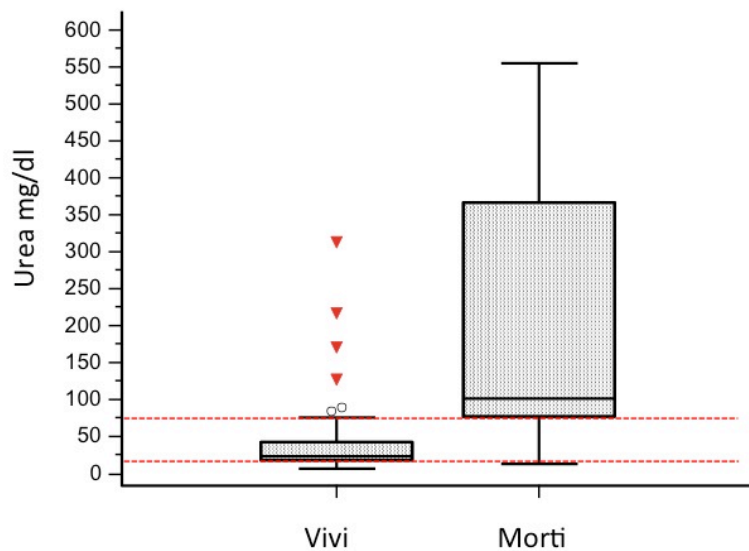


Figura 7.34. Distribuzione dei valori di Urea (mg/dl) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (18-55).

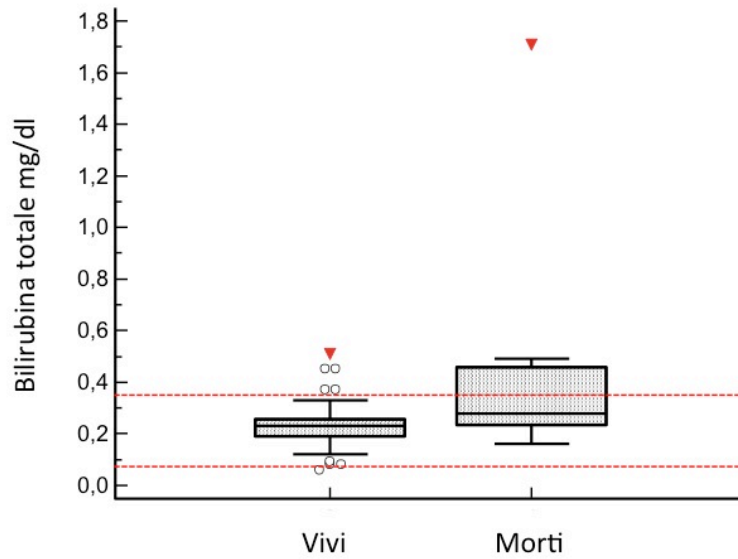


Figura 7.35. Distribuzione dei valori di *Bilirubina totale* (mg/dl) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (0,07-0,34).

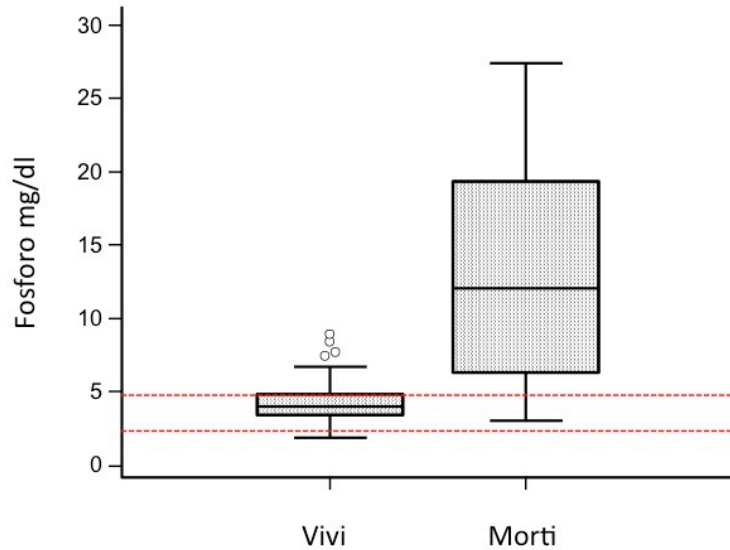


Figura 7.36. Distribuzione dei valori di *Fosforo* (mg/dl) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (2,6-4,9).

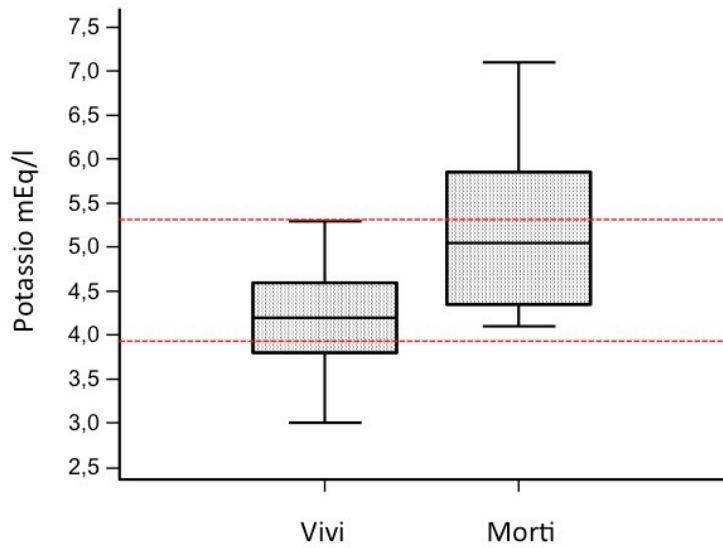


Figura 7.37. Distribuzione dei valori di Potassio (mEq/l) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (3,9-5,3).

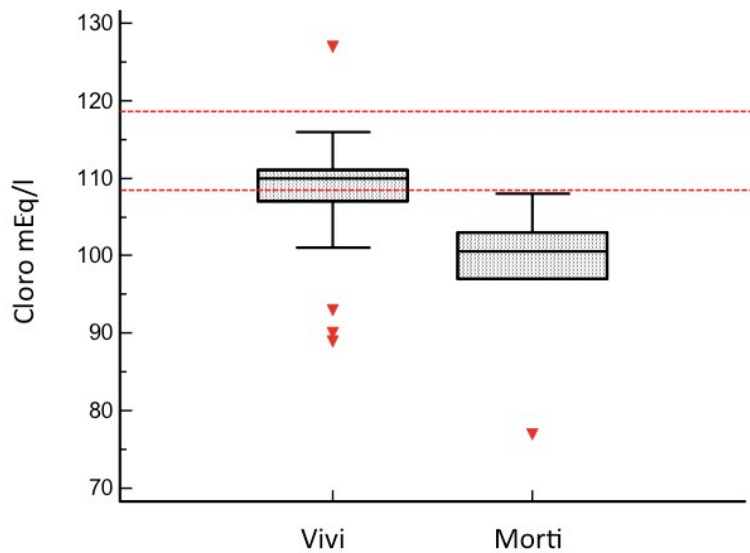


Figura 7.38. Distribuzione dei valori di Cloro (mEq/l) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (108-118).

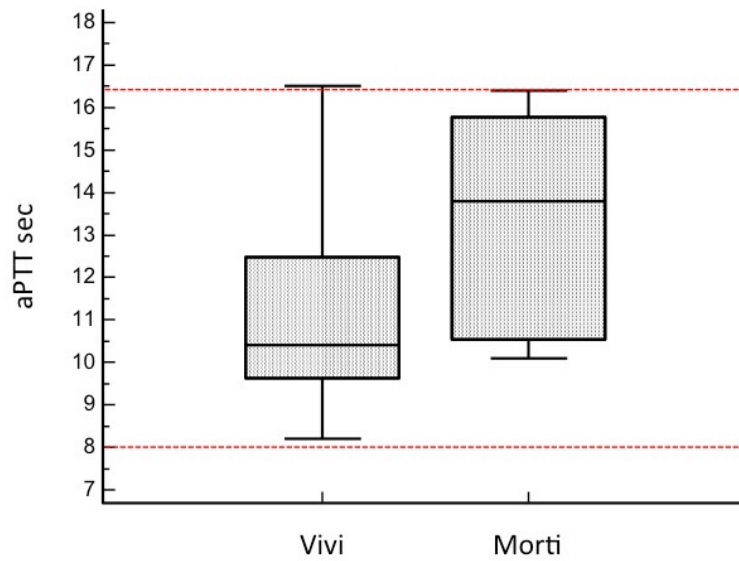


Figura 7.39. Distribuzione dei valori di aPTT (sec) nel gruppo dei vivi e dei morti. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (8,0-16,5).

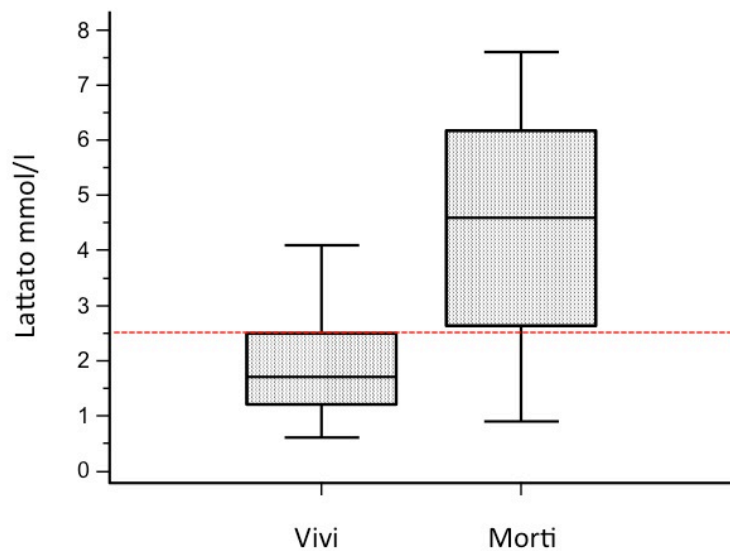


Figura 7.40. Distribuzione dei valori di Lattato (mmol/l) nel gruppo dei vivi e dei morti. La linea rossa tratteggiata indica il limite massimo considerato normale per questo parametro nel cane (0-2,5).

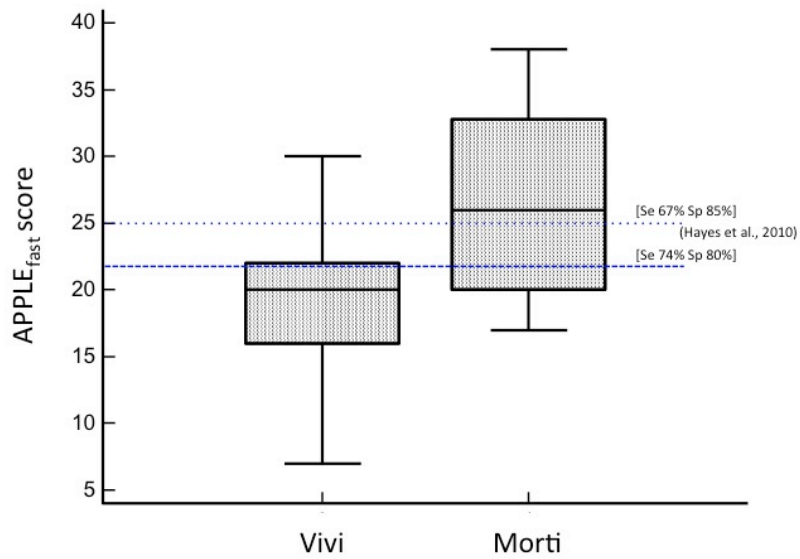


Figura 7.41. Distribuzione dei valori di $APPLE_{fast}$ score nel gruppo dei vivi e dei morti. Le due linee tratteggiate in blu indicano i due valori di cut-off proposti da Hayes et al. (2010) utilizzati per la previsione di morte (Se 74% e Sp 80% per punteggio >22, Se 67% e Sp 85% per punteggio >25).

Di seguito sono riportati i risultati della regressione logistica univariata e dell'analisi della Curva ROC per le variabili associate con l'*outcome* (Tabelle 7.11-12).

Variabile	Regressione logistica binaria univariata				Curva ROC	
	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95% CI]	P	AUC [95% CI]	SE
AST (U/l)	0,0403	0,0130	1,0411 [1,0150 – 1,0680]	0,0001	0,863 [0,763 – 0,933]	0,0692
Creatinina (mg/dl)	0,8054	0,2689	2,2376 [1,3211 – 3,7899]	<0,0001	0,879 [0,781 – 0,944]	0,0759
Urea (mg/dl)	0,0127	0,0042	1,0128 [1,0045 – 1,0213]	0,0001	0,844 [0,740 – 0,919]	0,105
Bilirubina totale (mg/dl)	0,78107*	0,39471*	2,1838* [1,0075 – 4,7337]	0,0040	0,737 [0,620 – 0,834]	0,104

Variabile	Regressione logistica binaria univariata				Curva ROC	
	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95% CI]	P	AUC [95% CI]	SE
Fosforo (mg/dl)	0,6316	0,2320	1,8805 [1,1934 – 2,9633]	<0,0001	0,871 [0,771 – 0,938]	0,0993
Potassio (mEq/l)	2,3681	0,8690	10,6766 [1,9449 – 58,6084]	0,0001	0,818 [0,711 – 0,899]	0,0791
Cloro (mEq/l)	-0,1657	0,0598	0,8472 [0,7536 – 0,9525]	0,0014	0,901 [0,803 – 0,961]	0,0492
aPTT (sec)	0,3878	0,1768	1,4737 [1,0422 – 2,0839]	0,0236	0,747 [0,625 – 0,846]	0,0928
Lattatemia (mmol/l)	1,1633	0,4619	3,2006 [1,2945 – 7,9133]	0,0006	0,793 [0,657 – 0,894]	0,152
APPLE _{fast} Score	0,2347	0,0959	1,2645 [1,0478 – 1,5261]	0,0054	0,787 [0,669 – 0,878]	0,117
Utilizzo di emocomponenti	2,5495	0,9393	12,8000 [2,0308 – 80,6792]	0,0095	0,665 [0,574 – 0,770]	0,119
Presenza di shock settico	3,5711	0,9393	35,5556 [5,6410 – 224,1089]	0,0001	0,790 [0,681 – 0,876]	<0,0001

Tabella 7.11. Risultati della regressione logistica univariata e dell'analisi della curva ROC relativamente alle variabili associate con l'outcome (sopravvissuti vs non sopravvissuti). Sono riportate in tabella le sole variabili per le quali $P < 0,05$. SE, errore standard, CI, intervalli di confidenza.

** per l'analisi della Bilirubina tutti i valori misurati nella popolazione di studio sono stati moltiplicati per un coefficiente fisso ($\times 10$) calcolando in tal modo l'odds ratio su un incremento della variabile pari a 0,1 unità (anziché 1 unità come di norma) in modo da adattarsi meglio agli intervalli di riferimento del parametro in esame.*

	Curva ROC		
Variabile	AUC [95% CI]	SE	P
APPLE _{fast} Score	0,787 [0,669 – 0,878]	0,129	0,0257

Tabella 7.12. *Analisi della curva ROC per l'APPLEfast Score in funzione dell'outcome. SE, errore standard, CI, intervalli di confidenza.*

Considerando il criterio APPLEfast score > 25/50 punti, si ottengono sensibilità pari al 60,0% e specificità pari al 90,2% nella previsione di una prognosi infausta.

Nell'analisi multivariabile, risultano significativi modelli che comprendono, rispettivamente: Creatinina, Potassio e Lattatemia, Creatinina, Potassio e Fosforo, Potassio, Bilirubina e aPTT, come illustrato nelle Tabelle 7.13-15.

Variabile	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95 % CI]	P
Lattatemia (mmol/l)	2,0102	1,0060	7,4649 [1,0392 – 53,6203]	0,0457
Potassio (mg/dl)	4,0201	1,7044	55,7094 [1,9731 – 1572,9096]	0,0183

Tabella 7.13. *Regressione logistica multivariabile in un modello che include Creatinina, Potassio, Lattatemia in relazione all'outcome. P complessiva < 0,0001. Sono riportate in tabella le variabili per le quali P < 0,05. SE, errore standard.*

Variabile	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95 % CI]	P
Creatinina (mg/dl)	0,8017	0,2686	2,2292 [1,3169 – 3,7736]	0,0028

Tabella 7.14. *Regressione logistica multivariabile in un modello che include Creatinina, Potassio, Fosforo in relazione all'outcome. P complessiva < 0,0001. Sono riportate in tabella le variabili per le quali P < 0,05. SE, errore standard.*

Variabile	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95 % CI]	P
Potassio (mEq/l)	2,5307	0,9799	12,5619 [1,8406 – 85,7349]	0,0098

Tabella 7.15. Regressione logistica multivariabile in un modello che include Potassio, aPTT, Bilirubina totale in relazione all'outcome. P complessiva = 0,0002. Sono riportate in tabella le variabili per le quali P < 0,05. SE, errore standard.

La presenza di sepsi grave, di shock settico e l'utilizzo di emocomponenti, inoltre, hanno mostrato una correlazione significativa con l'outcome (rispettivamente, P = 0,0031, P < 0,0001 e P = 0,0141), sebbene la regressione logistica univariata non abbia confermato la significatività dell'associazione tra sepsi grave e morte.

Tra le variabili associate all'outcome, APPLE_{fast} score e Potassio sono state analizzate con il test di Kruskal-Wallis per l'analisi comparativa tra le popolazioni di vivi, morti e controlli sani, come illustrato nella Tabella 7.16.

Variabile	Vivi (*)	Morti (§)	Sani (v)	P
APPLE _{fast} score	20 [7 - 30] §*	26 [17 - 38] * v	10,5 [0 - 18] *§	<0,0001
Potassio (mEq/l)	4,2 [3,0 - 5,3] §*	5,05 [4,1 - 7,1] *	4,5 [3,9 - 5,1] *	0,0023

Tabella 7.16. Risultati del test di Kruskal-Wallis per l'analisi comparativa tra i gruppi dei sopravvissuti, dei non sopravvissuti e dei controlli sani, relativamente alle variabili APPLE score e Potassio sierico. I risultati sono espressi come Mediana e range [min - max]. * indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo dei vivi (P < 0,05), § indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo dei morti (P < 0,05), v indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo dei sani (P < 0,05).

Analisi statistica dei risultati nella popolazione “Piometra”:

Analizzando separatamente il gruppo dei soggetti con piometra (N = 68), risultano significativamente associati con l’*outcome* i seguenti parametri: AST, Creatinina, Urea, Potassio, Fosforo e Cloro, come illustrato nelle Tabella 7.17-18.

Variabile	N	Vivi	N	Morti	P
AST (U/l)	60	33 [17 – 134]	6	59,5 [31 - 112]	0,0100
Creatinina (mg/dl)	60	0,97 [0,57 – 5,85]	6	4,92 [0,86 – 12,10]	0,0043
Urea (mg/dl)	60	22,19 [6,52 – 313,14]	6	231,37 [13,36 – 555,28]	0,0117
Fosforo (mg/dl)	60	3,95 [1,9 – 8,9]	6	16,03 [3,0 – 27,4]	0,0040
Potassio (mEq/l)	60	4,2 [3,0 – 5,2]	6	5,05 [4,1 – 7,1]	0,0079
Cloro (mEq/l)	56	110 [89 – 127]	4	97,5 [77 – 108]	0,0080

Tabella 7.17. Risultati del confronto tra il gruppo dei sopravvissuti e dei non sopravvissuti nella popolazione costituita dai soli soggetti affetti da piometra; la tabella riporta le variabili per le quali è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa (P < 0,05) tra i due gruppi. I valori sono espressi come mediana [valore minimo - valore massimo].

Variabile	Regressione logistica binaria univariata				ROC Curve	
	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95% CI]	P	AUC [95% CI]	SE
AST (U/l)	0,0349	0,0139	1,0355 [1,0081 – 1,0636]	0,0115	0,821 [0,707 – 0,904]	0,0852
Creatinina (mg/dl)	0,6900	0,2594	1,9973 [1,1991 – 3,3150]	0,0001	0,856 [0,747 – 0,930]	0,0955
Urea (mg/dl)	0,0128	0,0042	1,0129 [1,0046 – 1,0213]	0,0002	0,814 [0,699 – 0,899]	0,1360

Variabile	Regressione logistica binaria univariata				ROC Curve	
	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95% CI]	P	AUC [95% CI]	SE
Fosforo (mg/dl)	0,6519	0,2572	1,9191 [1,1592 – 3,1771]	< 0,0001	0,858 [0,751 – 0,923]	0,0130
Potassio (mEq/l)	2,5481	1,0580	12,7824 [1,6070 – 101,6717]	0,0002	0,831 [0,718 – 0,912]	0,0919
Cloro (mEq/l)	-0,1692	0,0647	0,8444 [0,7438 – 0,9585]	0,0027	0,897 [0,792 – 0,961]	0,0656

Tabella 7.18. Risultati della regressione logistica univariata e dell'analisi della curva ROC relativamente alle variabili associate con l'outcome (sopravvissuti vs non sopravvissuti) nella popolazione costituita dai soli soggetti affetti da piometra. Sono riportate in tabella le sole variabili per le quali $P < 0,05$. SE, errore standard, CI, intervalli di confidenza.

Nell'analisi multivariabile, risultano significativi modelli che comprendono, rispettivamente: AST, Cloro e Potassio, come riportato in Tabella 7.19.

Variabile	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95 % CI]	P
AST (U/l)	0,0404	0,0199	1,0412 [1,0015 – 1,0826]	0,0419
Cloro (mEq/l)	-0,2046	0,0812	0,8150 [0,6951 – 0,9556]	0,0118

Tabella 7.19. Regressione logistica multivariabile in un modello che include AST, Cloro e Potassio in relazione all'outcome nella popolazione costituita dai soli soggetti affetti da piometra. P complessiva = 0,0013. Sono riportate in tabella le variabili per le quali $P < 0,05$. SE, errore standard.

L'utilizzo di emocomponenti e la presenza di sepsi grave risultano significativamente associate con una prognosi infausta negli animali con piometra (rispettivamente: $P = 0,0071$ e $P < 0,0001$).

7.2.4 Ricovero in terapia intensiva (ICU)

Nell'analisi comparativa tra i soggetti per cui si è reso necessario il ricovero in terapia intensiva e quelli non ricoverati in ICU, le variabili per cui si sono riscontrate differenze statisticamente significative sono state DNI e ATIII.

La regressione logistica mostra un aumento del rischio relativo di ricovero in ICU di circa 1,1 volte all'aumentare di una unità del DNI ($P = 0,0140$, odds ratio: 1,1182) e un aumento del rischio di circa 0,9 volte all'aumentare di una unità dell'ATIII ($P = 0,0088$, odds ratio: 0,9241).

7.2.5 Delta Neutrophil Index

L'analisi comparativa del DNI in categorie differenti di soggetti, oltre a evidenziare una correlazione con la presenza di malattia ($P = 0,0002$), come già riportato e come illustrato in Figura 7.42, ha mostrato nella popolazione di studio un'associazione significativa con la presenza di shock settico ($P = 0,0046$) ma non con la presenza di sepsi grave (Tabella 7.20). Il gruppo che comprende animali con sepsi grave, infatti, mostra differenze statisticamente significative dal gruppo dei sani, ma non dal gruppo degli animali settici in senso lato, come illustrato nelle Tabelle 7.21-22 e in Figura 7.43.

L'analisi della curva ROC ha permesso di definire un valore di *cut-off* che distingue i soggetti in shock settico dai soggetti con sepsi o sepsi grave: valori di DNI $> 16,6$ sono associati con la presenza di shock settico, permettendo di riconoscere questa condizione con una sensibilità del 100% e una specificità del 91,3% (Tabella 7.23).

Differenziando la popolazione di studio in base alla patologia, l'analisi del DNI mostra differenze statisticamente significative tra soggetti sani e soggetti affetti da piometra ($P = 0,0008$) e tra soggetti sani e affetti da prostatite/ascenso prostatico, sebbene il numero esiguo di questi ultimi non renda particolarmente significativo il dato. Il DNI tra i due gruppi di malati non differisce significativamente. Considerando i soli soggetti affetti da piometra, la differenza tra soggetti malati e soggetti con sepsi grave e/o shock settico non risulta statisticamente significativa.

Non è stata riscontrata una correlazione significativa tra DNI e *outcome*, sebbene siano state evidenziate differenze statisticamente significative tra soggetti ricoverati e non in terapia intensiva (ICU) (come già illustrato e come evidenziato in Tabella 7.24).

Nel gruppo dei malati, il DNI è risultato significativamente associato con i seguenti parametri: Sodio ($P = 0,0252$), Calcio ($P = 0,0276$), aPTT ($P = 0,0391$), Fibrinogeno ($P = 0,0350$).

I risultati dell'analisi relativa al DNI sono riportati nelle Tabelle e nelle Figure a seguire.

	N Malati		N Sani		Valore di P
DNI (%)	50	6,1 [0,00 – 76,10]	92	2,4 [0 – 9,4]	0,0002
	Sepsi		Sepsi grave e shock settico		
DNI (%)	39	4,1 [0 – 76,1]	11	10,2 [0 – 67,2]	NS
	Sepsi e sepsi grave		Shock settico		
DNI (%)	46	4,3 [0 – 76,1]	4	48,7 [18,8 – 58,3]	0,0033

Tabella 7.20. Analisi comparativa del Delta Neutrophil Index in categorie differenti di soggetti. NS, differenza non significativa.

Variabile	Sepsi (*)	Sepsi grave e shock settico (§)	Sani (v)	P
DNI (%)	3,9 [0 – 76,1] *	14,5 [0 – 77,7] *	2,4 [0 – 9,4] *§	0,0003

Tabella 7.21. Risultati del test di Kruskal-Wallis per l'analisi comparativa del DNI tra i gruppi di soggetti con sepsi, soggetti con sepsi grave e soggetti sani. I risultati sono espressi come Mediana e range [min – max]. * indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo “sepsi” ($P < 0,05$), § indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo “sepsi grave e shock settico” ($P < 0,05$), v indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo dei sani ($P < 0,05$).

Variabile	Sepsi e sepsi grave (*)	Shock settico (§)	Sani (v)	P
DNI (%)	4,1 [0 – 77,7] § v	48,7 [18,8 – 58,3] * v	2,4 [0 – 9,4] *§	0,0003

Tabella 7.22. Risultati del test di Kruskal-Wallis per l'analisi comparativa del DNI tra i gruppi di soggetti con sepsi e sepsi grave, soggetti con shock settico e soggetti sani. I risultati sono espressi come Mediana e range [min – max]. * indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo “sepsi e sepsi grave” ($P < 0,05$), § indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo “shock settico” ($P < 0,05$), v indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo dei sani ($P < 0,05$).

Variabile	Curva ROC		
	AUC [95% CI]	SE	P
DNI (%)	0,946 [0,842 – 0,990]	0,0328	< 0,0001

Tabella 7.23. Analisi della curva ROC per il DNI in funzione della presenza di sepsi e sepsi grave vs shock settico. SE, errore standard, CI, intervalli di confidenza. Considerando il criterio $DNI > 16,6\%$, si ottengono sensibilità pari al 100% e specificità pari al 91,3% nel prevedere l'instaurarsi di shock.

Variabile	Regressione logistica binaria univariata				Curva ROC	
	Coefficiente di regressione	SE	Odds Ratio [95% CI]	P	AUC [95% CI]	SE
DNI (%)	0,1118	0,0455	1,1182 [1,0228 – 1,2225]	< 0,0001	0,814 [0,672 – 0,913]	0,0863

Tabella 7.24. Risultati della regressione logistica univariata e dell'analisi della curva ROC relative all'analisi del DNI in funzione del ricovero in terapia intensive (ICU). SE, errore standard, CI, intervalli di confidenza.

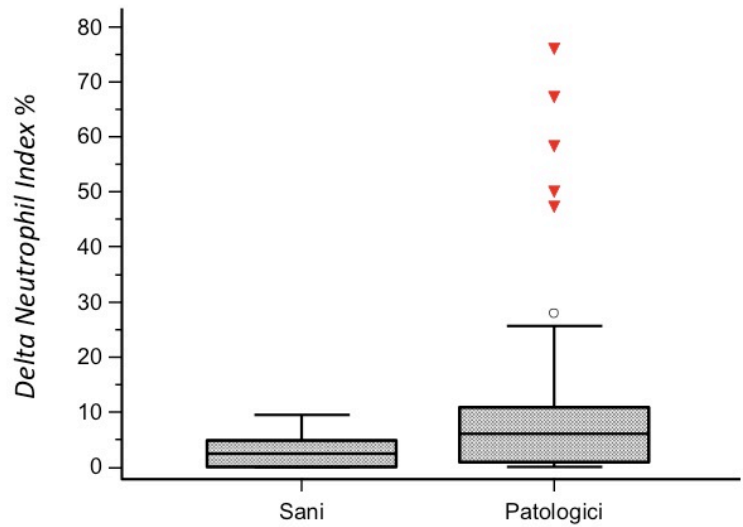


Figura 7.42. Distribuzione dei valori di DNI (%) nel gruppo dei sani e dei malati.

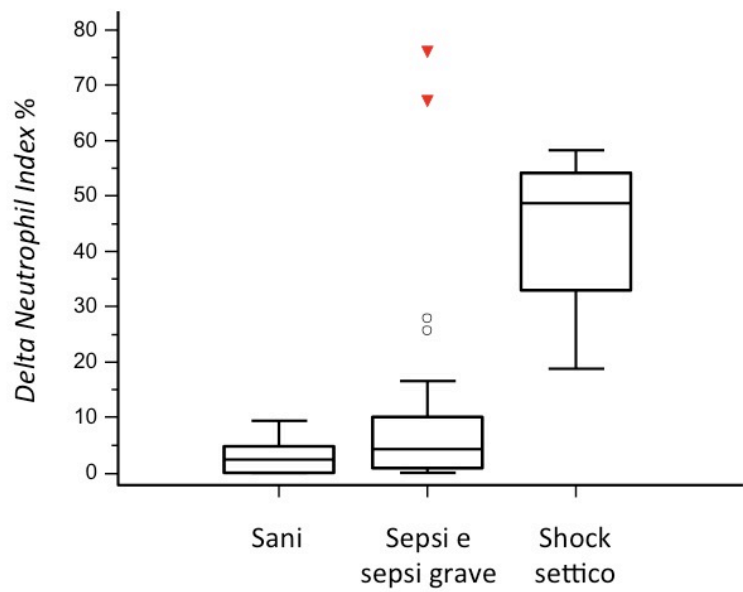


Figura 7.43. Distribuzione dei valori di DNI (%) nel gruppo dei sani, dei soggetti in sepsi o sepsi grave e dei soggetti in shock settico.

7.2.7 Altre variabili associate alla presenza di shock settico

La Tabella 7.25 e le Figure a seguire mostrano i risultati relativi alla correlazione di alcune variabili con la gravità clinica dei soggetti e in particolare con la presenza di shock settico.

Variabile	Sepsi e sepsi grave (*)	Shock settico (§)	Sani (v)	P
Apple _{fast} score	20 [7 – 31] § v	29 [26 – 38] * v	10,5 [0 – 18] *§	< 0,0001
aPTT (sec)	10,4 [8,2 – 16,5] § v	14,5 [11 – 16,4] * v	9,4 [8,0 – 11,7] *§	0,0017
AST (U/l)	33 [17 – 134] §	113 [44 – 1517] * v	38 [25 – 50] §	0,0119

Tabella 7.25. Risultati del test di Kruskal-Wallis per l'analisi comparativa tra i gruppi dei soggetti con sepsi o sepsi grave, soggetti con shock settico e soggetti sani. I risultati sono espressi come Mediana e range [min – max]. * indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo “sepsi e sepsi grave” (P < 0,05), § indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo “shock settico” (P < 0,05), v indica una differenza statisticamente significativa dal gruppo dei sani (P < 0,05).

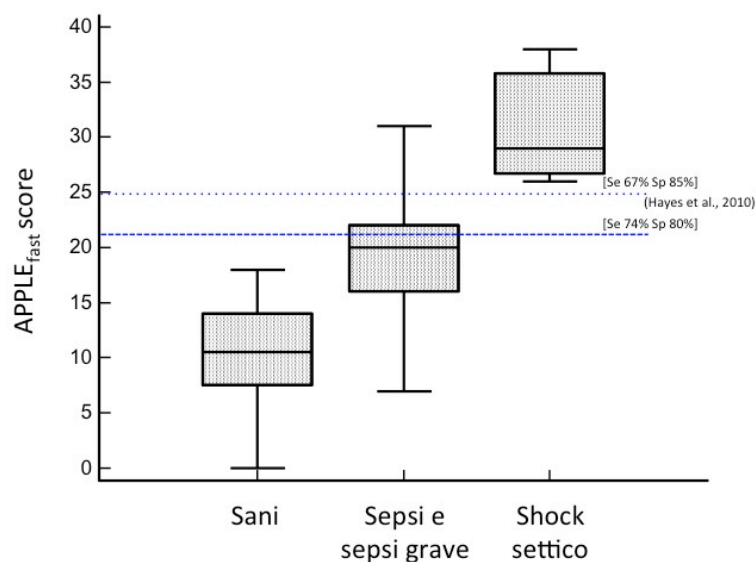


Figura 7.44. Distribuzione dei valori di APPLE_{fast} score nel gruppo dei sani, dei soggetti in sepsi o sepsi grave e dei soggetti in shock settico. Le due linee tratteggiate in blu indicano i due valori di cut-off proposti da Hayes et al. (2010) utilizzati per la previsione di morte (Se 74% e Sp 80% per punteggio >22, Se 67% e Sp 85% per punteggio >25).

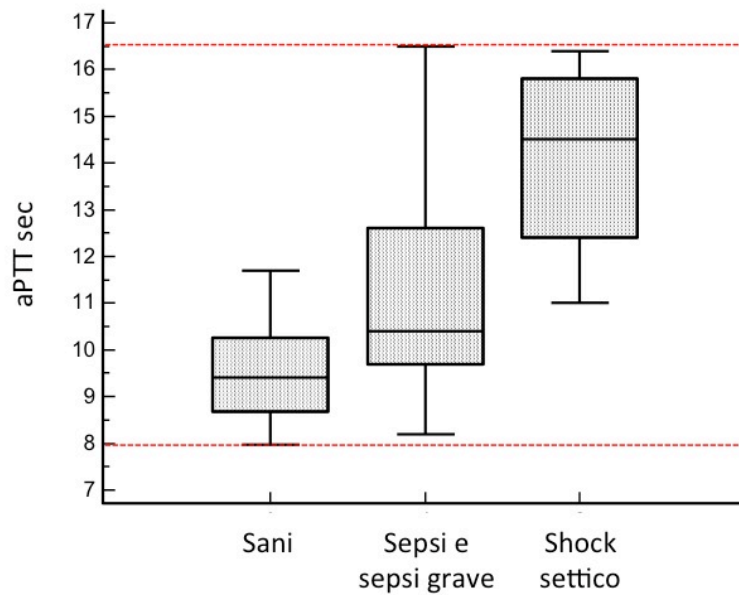


Figura 7.45. Distribuzione dei valori di aPTT (sec) nel gruppo dei sani, dei soggetti in sepsi o sepsi grave e dei soggetti in shock settico. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (8,0-16,5).

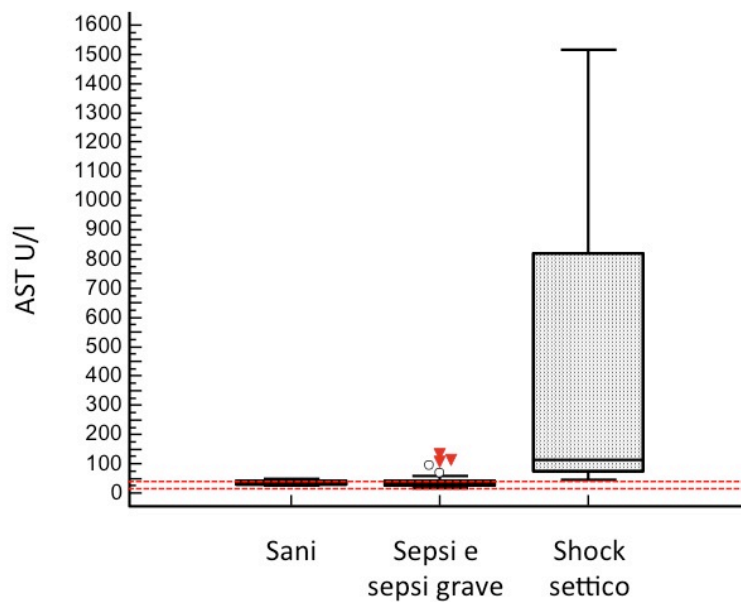


Figura 7.46. Distribuzione dei valori di AST (U/l) nel gruppo dei sani, dei soggetti in sepsi o sepsi grave e dei soggetti in shock settico. Le linee rosse tratteggiate indicano il limite superiore ed inferiore considerati normali per questo parametro nel cane (20-42).

7.2.7 Altre correlazioni

Nei soggetti sopravvissuti la durata del ricovero ha mostrato associazione positiva con Lattatemia ($P = 0,0306$), Glicemia ($P = 0,0113$) e APPE_{fast} score ($P = 0,0100$) e associazione negativa con il valore di ATIII ($P = 0,0036$).

Il valore di APPE_{fast} ha mostrato inoltre associazione positiva con la Temperatura ($P = 0,0411$) e il valore di Creatinina ($P = 0,0456$) e associazione negativa con la Calcemia ($P = 0,0100$).

La Potassiemia nei soggetti malati risulta associata con i valori di Creatinina ($P = 0,0033$), Urea ($P = 0,0002$) e Fosforo ($P < 0,0001$) con elevata significatività.

CAPITOLO VIII

Discussione

La piometra e la prostatite associata ad ascesso prostatico rappresentano, nel cane, potenziali emergenze medico-chirurgiche che, come tali, necessitano di una rapida e corretta diagnosi e di adeguate scelte terapeutiche atte a limitare la progressione verso forme sistemiche gravi, lo sviluppo di complicazioni e, con esse, il rischio di morte.

Entrambe le patologie esordiscono come forme localizzate all'apparato riproduttore, ma nella maggior parte dei casi evolvono determinando un interessamento sistemico legato alla diffusione di batteri ed endotossine nel circolo ematico, con lo sviluppo di sepsi e non di rado shock settico (Dorfman e Barsanti, 1998, Fransson et al., 2007); queste condizioni contribuiscono ad aumentare notevolmente il rischio di morte nei soggetti colpiti: nel caso della piometra, ad esempio, la mortalità generale varia tra il 3 e il 10% ma può superare il 35% negli animali con sepsi grave (Conti-Patara et al., 2012, Gibson et al., 2013, Jitpean et al., 2014 a). La piometra, inoltre, rappresenta una patologia di frequente riscontro nella pratica clinica veterinaria, arrivando a colpire circa un quarto della popolazione di femmine intere al di sopra dei 10 anni (Egenvall et al., 2001); pur non potendo paragonare le due malattie in termini di incidenza, la prostatite associata ad ascesso prostatico è stata inclusa nel presente studio in quanto si ritiene rappresenti, nel maschio, una condizione potenzialmente assimilabile alla piometra per evoluzione clinica e gestione terapeutica, oltre che, in parte, per l'eziologia.

L'incidenza relativamente elevata (almeno per quanti riguarda l'infezione uterina) associata alla frequente evoluzione sistemica e la potenziale gravità di queste condizioni, tuttavia, non sono le sole motivazioni a giustificare lo studio delle due patologie: piometra e prostatite, infatti, rappresentano modelli utili per lo studio della sepsi spontanea nel cane. Tale approccio non è nuovo in riferimento alla piometra, già ritenuta un ottimo modello di sepsi spontanea, in contrapposizione alla sepsi indotta sperimentalmente, e pertanto oggetto, da sola o insieme ad altre malattie, di numerosi studi prospettici

sull'inflammatione sistemica nel cane (de Laforcade et al., 2003, Nakamura et al., 2008, Kjelgaard-Hansen et al., 2007, Yu et al., 2010, Yuki et al., 2010, Conti-Patara et al., 2012, Karlsson et al., 2013, 2016, Haas et al., 2015, Torrente et al., 2015).

Che piometra e prostatite siano oggetto d'attenzione di per sé o in qualità di modelli di sepsi, è comunque notevole l'interesse verso l'individuazione e lo studio di indicatori che permettano, in certa misura, di fare previsioni sull'*outcome*, agevolando l'esecuzione delle scelte terapeutiche più adatte in funzione della gravità del caso. Obiettivi della presente tesi erano proprio l'individuazione e la valutazione di potenziali marker con significato prognostico in una popolazione di cani con piometra o prostatite associata ad ascesso prostatico, afferenti al Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, nel periodo compreso tra Gennaio 2013 e Dicembre 2015.

A tale scopo la popolazione di studio è stata analizzata nel complesso, valutando le variabili d'interesse in relazione agli intervalli di riferimento considerati normali per la specie canina o, dove possibile, in comparazione ad un gruppo di controllo costituito da soggetti sani ("Malati vs Sani"). Per valutare la correlazione con l'*outcome* la popolazione è stata poi suddivisa in base alla prognosi, permettendo di effettuare comparazioni tra il gruppo dei sopravvissuti e quello dei non sopravvissuti ("Vivi vs Morti"). Infine, la popolazione di studio è stata oggetto di una stratificazione in base alla gravità delle manifestazioni cliniche riportate dagli animali ("Sepsi vs Sepsi grave vs Shock settico"). Tale categorizzazione consente di creare ulteriori sottogruppi nell'insieme dei malati, i quali rendono possibile l'esecuzione di analisi comparative *all'interno* della popolazione di studio e non solo *tra* questa e il gruppo di controllo.

La popolazione di studio esaminata nel complesso appariva costituita da una maggioranza di femmine colpite da piometra (88%) e da un numero relativamente ridotto di maschi affetti da prostatite/ascesso prostatico (9%); un simile andamento non è un dato inatteso e rispecchia l'elevata incidenza della piometra nella popolazione canina in confronto all'infezione prostatica, una condizione meno comune per il cane maschio intero se pure la sua frequenza non sia trascurabile.

Il restante 3% della popolazione era rappresentato da maschi pseudoermafroditi (2 soggetti su 75) in cui era presente una struttura vestigiale simil-uterina compatibile per

localizzazione e aspetto con residuo del Dotto di Müller, o “utero mascolino”, descritto in letteratura tra le anomalie della differenziazione sessuale e potenzialmente associato a piometra e infezioni del tratto urinario (Romagnoli e Schlafer, 2006, Christensen, 2012). Tale struttura risultava istologicamente costituita da mucosa simil-endometriale colpita da iperplasia cistica e infiammazione cronica, giustificando l’inclusione di questi due soggetti nel gruppo delle “piometre” in virtù della localizzazione del processo patologico. Il trattamento chirurgico, infatti, è stato mirato all’asportazione dell’utero vestigiale senza coinvolgere la prostata, che era comunque interessata dall’infiammazione per continuità.

L’età mediana al momento della diagnosi nella popolazione totale era di 10 anni, confermando la tendenza di piometra e ascesso prostatico a colpire animali sessualmente maturi, tendenzialmente in età adulta e avanzata (Dorfman e Barsanti, 1998, Egenvall et al., 2001, Gibson et al., 2013). L’età minima riscontrata era di 6 mesi, in un soggetto Bulldog Inglese di sesso femminile che aveva sviluppato piometra in seguito al primo calore; tale situazione, se pure infrequente, è già segnalata in letteratura (Pretzer, 2008, Gibson et al., 2013) e avvalorata l’ipotesi che altri fattori, oltre al susseguirsi delle stimolazioni ormonali durante il succedersi dei cicli estrali, predispongano allo sviluppo di iperplasia endometriale e contribuiscano alla patogenesi della piometra (Verstegen et al., 2008).

Analizzando la distribuzione dell’età in funzione della taglia degli animali colpiti, si nota come gli animali di taglia grande/gigante tendano a manifestare la malattia più precocemente (ad esempio, nel gruppo della piometra, l’età mediana è di 8 anni per i soggetti di peso >26 kg, mentre è rispettivamente di 11 e 12 anni per gli animali di taglia piccola e media). Tale andamento potrebbe rispecchiare la differente durata della vita propria di cani di taglia diversa, come è stato ipotizzato da Egenvall et al. (2001) in relazione alla razza, notando differenze significative nell’età media alla diagnosi per razze differenti.

Tra i 75 animali inclusi nello studio la razza maggiormente rappresentata era il Pastore Tedesco (9%), seguito da Barboncino, Golden Retriever e Rottweiler (4%), mentre la maggior parte dei soggetti colpiti era rappresentata da meticci (31%). Sebbene non siano riportate vere e proprie predisposizioni genetiche per le patologie in esame, Golden Retriever e Rottweiler sono annoverati tra le razze più comunemente colpite da piometra (Gibson et al., 2013), mentre il Pastore Tedesco figura con una certa frequenza all’interno

delle popolazioni studiate, sempre in relazione all'infezione uterina (ad esempio, questa razza costituisce il 6% circa della popolazione studiata da Sharif et al., 2013, e arriva a rappresentare il 22,8% della popolazione nello studio di Faldyna et al., 2001). Altre razze per le quali è riportato un certo grado di predisposizione allo sviluppo della piometra sono il Cavalier King Charles Spaniel (Egenvall et al., 2001) e il Labrador Retriever (Sharif et al., 2013), entrambe rappresentate da 2 soggetti su 75 nella popolazione di studio (3%). È opportuno ricordare, tuttavia, che la moda e la diffusione nella nostra area geografica di alcuni tipi di cane, rispetto ad altri, potrebbero giocare un ruolo fondamentale nell'influenzare la distribuzione delle razze nella popolazione di studio.

Per quanto riguarda i due soggetti pseudoermafroditi, di razza Schnauzer nano e Basset Hound, essi rispecchiano perfettamente i dati presenti in letteratura riguardo all'elevata predisposizione di queste razze per la Sindrome del Dotto Mülleriano Persistente (PMDS) (Romagnoli e Schlafer, 2006).

La sintomatologia clinica riportata dai cani al momento dell'ammissione rispecchia il coinvolgimento sistemico dei soggetti: inappetenza o anoressia e alterazione dello stato mentale erano presenti nella maggior parte degli animali, la polidipsia era presente in oltre un terzo della popolazione, poliuria e vomito circa in un caso su quattro; l'ipertermia è stata riscontrata in più della metà dei soggetti. In relazione alla piometra, sintomi quali disturbi dell'appetito, alterazione dello stato mentale e poliuria/polidipsia sono riportati in letteratura con frequenze che arrivano al 100% dei soggetti colpiti; i risultati del nostro studio sono in linea con i dati bibliografici (Fransson et al., 2004, Hagman et al., 2006 a, Smith, 2006, Pretzer, 2008, Verstegen et al., 2008, Küplülü et al., 2009, Dabrowski et al., 2009, 2013, 2015 b, Jitpean et al., 2014 a, 2014 c, Enginler et al., 2014) se non per l'apparente minore incidenza di PU/PD, che potrebbe essere frutto di una sottostima da parte dei proprietari o del minor risentimento renale determinato, ad esempio, da uno stadio più precoce della patologia.

La mortalità complessiva della popolazione in esame è risultata del 10,7%. Analizzando il dato entro diverse categorie, risulta che la piometra è associata con una mortalità del 9,1% circa (6 soggetti su 66), in linea con quanto riportato in Letteratura (Jitpean et al., 2014 a), mentre nel gruppo della prostatite/ascenso prostatico la mortalità arriva al 28,6% (2 soggetti su 7); l'infezione della prostata appare quindi una condizione tendenzialmente più grave rispetto all'infezione uterina. Tale osservazione, tuttavia, è da considerare in maniera

arbitraria: il dato grezzo sulla mortalità, infatti, oltre ad essere influenzato dal numero esiguo di soggetti maschi inclusi nello studio, può risentire del fatto che la popolazione di studio includeva solo le prostatiti gravi associate ad ascesso, mentre le prostatiti croniche non complicate non determinano risentimento sistemico né si accompagnano a segni specifici che ne permettano la localizzazione e la diagnosi, portando ad una sottostima della reale incidenza delle infezioni prostatiche (Dorfman e Barsanti, 1998). Come si vedrà più avanti tuttavia, il gruppo dei soggetti colpiti da prostatite e ascesso mostra una certa tendenza all'aumento di uno dei *marker* positivamente associati alla gravità del quadro clinico nella popolazione di studio, il *Delta Neutrophil Index*, rispetto al gruppo delle piometre (differenza però non statisticamente significativa), avvalorando in parte la supposizione fatta.

Volendo prendere in considerazione la mortalità in base alla gravità clinica degli animali, essa raggiunge il 66,7% nei soggetti con sepsi grave e/o shock settico (8 morti su 12), in accordo con i dati presenti in letteratura, che riportano per la specie canina un tasso di mortalità associato alla sepsi variabile tra il 20 e il 75% (Otto, 2007, Yu et al., 2010, Conti-Patara et al., 2012).

La popolazione, esaminata nel complesso, ha rivelato la presenza di leucocitosi neutrofilica con monocitosi e aumento delle forme immature nella maggior parte dei soggetti malati, accompagnate da ipoalbuminemia, da incremento della Proteina C-reattiva (al di sopra dell'intervallo di riferimento in tutti i soggetti tranne 3) e riduzione dell'attività dell'Antitrombina. Simili reperti testimoniano la presenza di infiammazione sistemica, condizione associata ad incremento delle Proteine di Fase Acuta (APP) positive, come la CRP, e riduzione delle APP negative quali Albumina e Antitrombina. I valori di Ematocrito tendenzialmente bassi se pure entro gli intervalli di riferimento, la tendenza verso un'iposideremia e i valori di TIBC vicini al limite minimo degli intervalli di riferimento confermano questo dato mostrando una tendenza degli animali colpiti verso un principio di anemia infiammatoria. Simili riscontri appaiono più significativi se letti alla luce della leggera disidratazione presente negli animali, testimoniata dai valori delle Proteine totali spostati verso il limite superiore. L'incremento delle Proteine sieriche, che restano nel complesso negli intervalli di riferimento, appare infatti troppo lieve per risentire di altre componenti infiammatorie quali l'aumentata produzione di APP positive e

Immunoglobuline. Tra le altre Proteine di Fase Acuta positive, il Fibrinogeno non mostra alterazioni di rilievo nella popolazione di studio, mentre la metodica applicata per la misurazione della Procalcitonina si è rivelata inefficace per l'utilizzo nella specie canina.

Accanto alla leucocitosi neutrofilica, in linea con la presenza di leucogramma infiammatorio, emerge una tendenza dei linfociti verso il limite inferiore degli intervalli di riferimento; secondo Faldyna et al. (2001) la linfopenia è proporzionale con la gravità del quadro clinico e fornisce una misura dell'immunosoppressione associata alla piometra. Nel nostro studio, quindi, il grado di immunosoppressione potrebbe essere lieve, tanto che la popolazione di malati non mostra differenze statisticamente significative per quanto riguarda il conteggio dei linfociti rispetto alla popolazione dei sani. La differenza tra malati e sani è invece significativa, come atteso, per quanto riguarda il numero di leucociti totali, monociti e neutrofili, oltre che per la stima delle forme granulocitarie immature. Quest'ultimo parametro può fornire un utile strumento diagnostico qualora ci si trovi di fronte a soggetti che presentano una conta leucocitaria all'interno degli intervalli di riferimento; in assenza di leucocitosi, infatti, è utile ricorrere alla valutazione di *marker* di sepsi, noti (come ad esempio la CRP) o di nuova definizione. Il *Delta Neutrophil Index* si è rivelato in questo studio un buon *marker* associato alla presenza di sepsi determinata da piometra o prostatite, mostrando valori significativamente differenti nella popolazione dei malati rispetto ai controlli sani ($P = 0,0002$). È inoltre opportuno ricordare che una conta leucocitaria "normale" potrebbe rispecchiare un'inversione di tendenza verso lo sviluppo di leucopenia, condizione più rara ma associata a maggior gravità negli animali con sepsi causata dalla piometra (Jitpean et al., 2014 b).

Analizzando gli indicatori di danno d'organo all'interno della popolazione di studio, si nota che i parametri di funzionalità renale, Creatinina e Urea sieriche, non mostrano differenze significative rispetto alla popolazione di controllo, sebbene tendano verso il limite superiore degli intervalli di riferimento pur rimanendo nei *range*; questo leggero spostamento potrebbe essere imputato a un principio di risentimento renale, supportato anche dalla leggera tendenza dei soggetti malati all'iperfosfatemia e all'ipopotassiemia (che tuttavia non si è rivelata statisticamente significativa). Nonostante la piometra, in particolare (Heiene et al., 2007, Maddens et al., 2010), e la sepsi, in generale (Keir e Kellum, 2015), siano associate allo sviluppo di danno renale secondario, Creatinina ed Urea potrebbero non mostrare alterazioni negli stadi precoci del processo patologico in

quanto indicatori tardivi di risentimento renale (Maddens et al., 2011). In tal senso, la valutazione della proteinuria e di specifici *marker* urinari potrebbe fornire interessanti prospettive future di approfondimento del presente lavoro di ricerca.

I valori di Potassio, parallelamente a quelli di Sodio e Cloro (tutti tendenzialmente bassi se pure negli intervalli di riferimento), potrebbero essere spiegati dalla presenza di vomito e diarrea negli animali malati, responsabili di perdite elettrolitiche.

Anche i *marker* di funzionalità e di danno epatico non presentano alterazioni importanti, se non una leggera tendenza di Bilirubina totale e AST verso i limiti superiori degli intervalli di riferimento (non significativa). L'iperbilirubinemia e il moderato aumento degli enzimi epatici sono comuni negli stati di sepsi (Brady e Otto, 2001) e nella piometra (Fransson, 2003, Hagman et al, 2006 a, 2009 a) e riflettono la colestasi intraepatica legata all'effetto di endotossine e mediatori dell'infiammazione sugli epatociti. In corso di piometra il risentimento epatico è generalmente lieve e non altera la funzionalità dell'organo (Fransson, 2003). Sorprendentemente l'ALT appare più bassa nei soggetti malati rispetto ai sani; tale differenza, statisticamente significativa, trova tuttavia spiegazione in una tendenza del gruppo di controllo verso l'emoconcentrazione come testimoniato dai valori di Ematocrito vicini ai limiti massimi considerati normali nel cane.

Analizzando la popolazione di studio in funzione dell'*outcome* e della gravità delle manifestazioni cliniche, emerge che alcuni parametri non significativamente associati alla presenza di malattia acquistano importanza clinica e prognostica. Osservando le distribuzioni di alcune delle variabili studiate, infatti, si nota come nel gruppo dei morti esse giacciono decisamente al di fuori degli intervalli di riferimento (Figure 7.32-40), laddove le stesse variabili rientravano nei *range* di normalità se valutate nella popolazione complessiva (Figure 7.10,12,13,15,19,21,22,27,30). Ne sono chiari esempi i valori di AST, Creatinina, Urea, Fosforo, Cloro e Lattato, in minor misura Bilirubina e Potassio ematici.

Il gruppo dei morti mostra, rispetto ai vivi, valori significativamente più elevati di Creatinina ed Urea, associati ad iperfosfatemia e iperpotassiemia. Simili alterazioni, esaminate nel loro insieme, sono imputabili principalmente al deterioramento della funzionalità renale, sebbene l'aumento dei Fosfati e del Potassio sierico possano trovare spiegazione anche in una probabile condizione di acidosi (non verificata nella popolazione in esame, che non è stata soggetta ad emogasanalisi) cui conseguirebbero la mobilitazione

dei sistemi tampone e la fuoriuscita del Potassio dall'ambiente intracellulare. L'assenza di una correlazione significativa tra i valori di Potassio e di Lattato, che avrebbe avvalorato l'ipotesi dell'acidosi, non esclude questa possibile alternativa; tuttavia, proprio l'aumento dei Lattati e del Potassio ematici sono le uniche variabili, tra tutte quelle associate ad un maggior rischio di morte, trattenute all'interno di un modello di analisi multivariato, deponendo per un maggior potenziale prognostico di questi due parametri particolarmente qualora esaminati insieme.

La kaliemia risulta inoltre significativamente correlata con le altre variabili associate alla funzionalità renale, ovvero Creatinina, Urea e Fosforo sierico, supportando l'ipotesi di una disfunzione del sistema escretore. L'analisi comparativa tra il gruppo dei morti e quello dei vivi a confronto con i controlli sani, evidenzia una distribuzione "divergente" della Potassiemia (Tabella 7.16): mentre l'insieme dei morti è caratterizzato da tendenza all'iperpotassiemia, quello dei vivi manifesta piuttosto un andamento contrario, mostrando come già accennato una tendenza all'ipopotassiemia. Se ne deduce che piometra e prostatite siano associate in generale a riduzione del K ematico ma che, in presenza di un danno renale tale da giustificare un aumento del rischio di morte, il K salga al di sopra dei range di riferimento. In una simile ottica l'iperpotassiemia acquista significato quale *marker* prognostico qualora riscontrata in un soggetto settico (*odds ratio* 10,67 con $P = 0,0001$).

Nella popolazione di studio l'ipocloremia è un altro reperto associato con aumento del rischio di morte, giustificata probabilmente dalle perdite elettrolitiche legate a vomito e diarrea.

Creatinina e Urea o BUN sono variabili già associate con l'*outcome* in numerosi studi sulla piometra (Küplülü et al., 2009, Sant'Anna et al., 2014, Jitpean et al., 2014 a, Jitpean, 2015) mentre non sono molti i dati presenti in letteratura circa lo stato elettrolitico degli animali colpiti. L'ipokaliemia è riportata in una piccola percentuale di casi (Fransson, 2003) o, come nel nostro studio, è descritta piuttosto una tendenza verso il limite inferiore degli intervalli di riferimento (Plavec et al., 2006); non è mai riportata iperkaliemia, mentre il Fosforo è al di sopra dei *range* di riferimento in 7 soggetti su 15 nello studio di Zaragoza et al. (2015); ipercloremia ed ipernatriemia testimoniano la disidratazione comune nei soggetti colpiti da piometra, mentre Plavec et al. (2006) riportano piuttosto una tendenza all'ipocloremia dei soggetti all'ammissione, con valori di Cloro inferiori rispetto a quelli

misurati in fase di ripresa. In ogni modo non è riportata per questi parametri alcuna associazione con la prognosi.

Il moderato aumento della Bilirubina, insieme a quello marcato dell'AST, lasciano supporre la presenza di un risentimento epatico nel gruppo dei morti, apparentemente trascurabile nel gruppo dei vivi. All'incremento dell'AST potrebbero contribuire tuttavia le isoforme muscolari di questo enzima, portando a ipotizzare la presenza concomitante di un danno miocardico come possibile conseguenza dell'endotossiemia e dell'infiammazione sistemica. L'esame della Troponina cardiaca, marker altamente sensibile e specifico di danno dei miocardiociti, avrebbe potuto avvalorare o smentire simile ipotesi (Pelander et al., 2008), tuttavia non è stato oggetto del presente studio.

Altra differenza statisticamente significativa tra il gruppo dei vivi e quello dei morti riguarda l'aPTT, sebbene questo parametro rientri in entrambi i casi nell'intervallo di riferimento. La leggera alterazione del Tempo di Protrombina Parziale attivata lascia supporre una tendenza verso lo squilibrio del sistema emostatico nei soggetti non sopravvissuti. L'analisi comparativa di questo parametro tra le categorie di animali in sepsi, in shock settico e nei soggetti sani, rivela la presenza di differenze significative tra tutti i gruppi, evidenziando che la tendenza allo sviluppo di disturbi dell'emostasi va di pari passo con l'aggravarsi delle condizioni cliniche dei soggetti. Il sistema emostatico, infatti, rientra tra gli "apparati" resi disfunzionali dalla sepsi, tra le cui conseguenze è annoverata la Coagulazione Intravasale Disseminata (Brady e Otto, 2001, Remick, 2007, O'Brien, 2012). Una certa tendenza allo sviluppo di CID, raramente manifesta, è riportata nei soggetti colpiti da piometra e potrebbe essere confermata valutando la concentrazione dei D-dimeri, *marker* sensibile e specifico per questa condizione (Plavec et al., 2006).

Una ridotta attività dell'Antitrombina, pur non influenzando direttamente l'*outcome*, risulta correlata con prolungamento dell'ospedalizzazione e con maggior rischio di ricovero in terapia intensiva, rivelando un'associazione di questa variabile con la gravità del quadro clinico in corso di piometra e prostatite. La riduzione dell'attività di questo enzima è dovuta alla ridotta produzione e alla degradazione della stessa a causa dell'infiammazione, oltre che al consumo negli stati di CID (de Laforcade et al., 2003, O'Brien, 2012) ed è conosciuta come indice prognostico negativo in corso di sepsi (Bentley et al., 2013, Giunti et al., 2015); essa rispecchia, nel presente studio, un aumento della morbilità che potrebbe essere legato ad un principio di deterioramento dell'emostasi o all'infiammazione

sistemica (essendo l'Antitrombina una Proteina di Fase Acuta negativa). I livelli di Fibrinogeno, apparentemente normali, potrebbero in effetti testimoniare una tendenza alla transizione da uno stato di iperfibrinogenemia, tipico della piometra e della Risposta di Fase Acuta (Børresen e Skrede, 1980), ad uno di ipofibrinogenemia, da consumo, tipica degli stadi avanzati di CID. Altri parametri della coagulazione, tuttavia, non mostrano alterazioni di rilievo nella popolazione di studio, portando in secondo piano l'ipotesi di una coagulopatia. Il Tempo di Protrombina (PT) nella norma e la tendenza solo lieve ad un aumento dell'aPTT in accordo con quanto osservato da Plavec et al. (2006), lasciano infatti supporre l'assenza di una deplezione da consumo dei fattori della coagulazione, oltre che la mancanza di un danno epatico tale da giustificarne una ridotta produzione.

La conta piastrinica, inoltre, appare entro i limiti della norma nella maggior parte dei soggetti, con una ridotta quota di soggetti trombocitopenici, e non mostra nessuna correlazione statisticamente significativa con l'outcome. Neppure l'analisi degli indici piastrinici ha fornito risultati significativi.

Appare evidente che sono in particolare i parametri associati a disfunzione organica a presentare differenze significative tra il gruppo dei sopravvissuti e dei non sopravvissuti, confermando che animali in cui è maggiore la compromissione dei diversi apparati sono soggetti a maggior rischio di morte. La sepsi, infatti, può progredire in sepsi grave determinando disfunzioni organiche e squilibri emodinamici fino allo sviluppo di MODS (Sindrome della Disfunzione Multiorganica) e shock, condizioni responsabili di un aumento della mortalità tra i pazienti colpiti, sia in veterinaria (Brady e Otto, 2001) che in medicina umana (Martin, 2012). Non stupisce pertanto il fatto che, nel presente studio, variabili quali il ricovero in terapia intensiva (ICU) e l'utilizzo di emocomponenti (*odds ratio* 12,8 con $P = 0,0095$), oltre a condizioni quali la presenza di sepsi grave ma soprattutto di shock settico (*odds ratio* 35,56 con $P = 0,0001$), siano significativamente correlate con una prognosi infausta.

La gravità clinica dei pazienti è rispecchiata significativamente anche dal punteggio APPE_{fast}, un sistema di stratificazione clinica validato da Hayes et al. (2010) allo scopo di fornire uno strumento utile alla valutazione del rischio di morte negli animali ospedalizzati, indipendentemente dalla diagnosi. Il punteggio APPE_{fast} nel presente studio è risultato significativamente differente tra animali malati e sani ($P < 0,0001$) e tra sopravvissuti e

non sopravvissuti ($P = 0,0034$). L'analisi della curva ROC ha fornito un valore di *cut-off* pari a 25/50 punti per questa variabile, offrendo un criterio altamente specifico se pur scarsamente sensibile per discriminare i vivi dai morti all'interno della popolazione di studio (Se 60,0%, Sp 90,2%). Analogamente, Hayes et al. (2010) riportavano valori di sensibilità pari a 67,1% e specificità pari a 85,3% utilizzando lo stesso *cut-off* per prevedere il rischio di morte; la sensibilità poteva essere incrementata, a scapito della specificità, abbassando il valore soglia a 22/50 punti (Hayes et al., 2010). Il punteggio APPLE_{fast}, nel nostro studio, è risultato inoltre associato positivamente con la durata dell'ospedalizzazione, riflettendo una maggiore gravità clinica nei soggetti con APPLE più elevato, oltre che con i valori di Creatinina (al limite della significatività: $P = 0,0456$) e con la Calcemia (associazione negativa). Poiché il sistema APPLE_{fast} non contiene variabili associate con il danno renale, unire la valutazione della Creatinina sierica potrebbe fornire uno strumento ulteriore nella previsione della prognosi, essendo entrambe le variabili correlate con l'*outcome*.

Anche il valore di Lattato ematico mostra una chiara associazione con la prognosi (*odds ratio* 3,2 con $P = 0,0006$) oltre che con la durata dell'ospedalizzazione, in accordo con quanto riportato in diversi studi (Hagman et al., 2009 a, Conti-Patara et al., 2012, Jitpean et al., 2014 a, Jitpean, 2015), sebbene il dato appaia ridondante in quanto la lattatemia è una delle variabili già comprese nel modello APPLE_{fast} (Hayes et al., 2010). Lo stesso vale per la Glicemia, che risulta correlata positivamente con la durata del ricovero. I dati bibliografici in merito a quest'ultimo parametro rivelano che sia condizioni di ipoglicemia (Jitpean, 2015) che di iperglicemia (Hayes et al., 2010) possono contribuire ad un incremento di morbilità e mortalità; nel caso del presente lavoro, l'iperglicemia può essere imputata allo stato di stress dei soggetti settici, come suggerito da Hayes et al. (2010) per gli animali in terapia intensiva.

Considerando a parte il gruppo dei soggetti affetti da piometra, le variabili che mantengono significatività nel confronto tra vivi e morti sono essenzialmente parametri di funzionalità renale: Creatinina, Urea, Potassio e Fosforo, imputabili al danno renale comunemente associato alla patologia (Heiene et al., 2007, Maddens et al., 2010), oltre ad AST e Cloro. La mancanza di una differenza statisticamente significativa tra il gruppo dei vivi e dei morti per quanto concerne i livelli di Proteina C-reattiva, l'unica APP che è stato possibile

valutare efficacemente nel nostro studio, conferma lo scarso significato prognostico delle Proteine di Fase Acuta positive (Giunti et al., 2015).

Per quanto riguarda l'analisi del *Delta Neutrophil Index*, parametro innovativo in medicina veterinaria, esso si è rivelato un *marker* dotato di significato diagnostico utile nell'identificazione dei soggetti settici e nella loro stadiazione, ma non correlato con la prognosi. La letteratura sull'argomento è limitata alla medicina umana ed il DNI è proposto come *marker* di sepsi, associato con la gravità del quadro clinico e correlato con lo sviluppo di complicazioni nei pazienti settici e con l'*outcome* (Nahm et al., 2008, Park et al., 2011, Hwang et al., 2015). Nel presente studio, il DNI ha mostrato correlazione positiva con la presenza di malattia, come già accennato, sia considerando la popolazione nel suo complesso ($P = 0,0002$) che il solo gruppo dei soggetti con piometra ($P = 0,0008$). Sebbene non siano state rilevate differenze significative tra le due patologie prese in esame, la presenza di prostatite e ascesso prostatico sembra tendenzialmente associata ad un aumento del DNI, corroborando l'ipotesi di una maggior gravità di questa patologia rispetto all'infezione uterina, almeno nella popolazione di studio. Considerando le patologie studiate quali modelli di sepsi spontanea, è possibile affermare che il *Delta Neutrophil Index* rappresenta anche nella specie canina un valido *marker* di sepsi. Tale parametro, infatti, rispecchia la frazione di granulociti immaturi presenti nel sangue, che aumentano in corso di infiammazione sistemica in risposta alla "paralisi" dei neutrofili circolanti cui si oppongono l'incremento della produzione midollare e il rilascio precoce di forme giovanili per fronteggiare l'aumento della richiesta durante un'infezione (Hwang et al., 2015). Il cosiddetto "spostamento a sinistra" che caratterizza il leucogramma infiammatorio è rispecchiato anche dalla percentuale di neutrofili a banda (PBN), parametro che nel cane rientra tra i criteri diagnostici di SIRS (Hauptman et al., 1997), rilevabile anche nei soggetti con piometra (Fransson et al., 2007) e in questi significativamente associato all'*outcome* (Küplülü et al., 2009). Il dato fornito dall'analizzatore automatico ADVIA, tuttavia, ha il vantaggio di una più pronta disponibilità rispetto al conteggio differenziale su striscio di sangue e riveste pertanto un potenziale interesse per la pratica clinica.

Il DNI nel nostro studio non ha mostrato associazione significativa con l'*outcome*, ma si è dimostrato utile nel definire la gravità clinica dei pazienti e in particolare nella

discriminazione dei soggetti con shock settico ($P = 0,0033$). Analogamente a quanto riportato in medicina umana (Park et al., 2011), infatti, il valore di DNI cresce con la progressione da sepsi a sepsi grave e poi a shock, sebbene la differenza tra il gruppo degli animali settici e quelli in sepsi grave non risulti significativa. Invece, trattando separatamente i soggetti in shock settico il paragone con il gruppo comprendente animali in sepsi e sepsi grave acquista significatività. L'analisi della curva ROC per questo parametro ha fissato a 16,6 il *cut-off* utile per definire la presenza di shock tra i soggetti in esame con massima sensibilità ed elevata specificità (rispettivamente 100% e 91,3%). In base ai risultati del nostro studio, è pertanto possibile affermare che soggetti che presentino $DNI > 16,6$ % sono pazienti ad elevato rischio di progressione a shock settico.

Pur non essendo correlato direttamente con una prognosi infausta, il valore di DNI risulta inoltre associato con il ricovero in terapia intensiva, oltre che con la presenza di shock, entrambe variabili associate con l'*outcome*.

In conclusione, i risultati forniti da questo studio hanno permesso di valutare l'utilità prognostica di diversi parametri in relazione alle patologie esaminate, sano questo motivo d'interesse in sé o in qualità di modelli di sepsi spontanea nel cane. Le variabili di maggior importanza risultano essere quelle associate alla disfunzione organica e agli squilibri emodinamici, indice che la MODS e lo shock giocano un ruolo fondamentale nell'aumentare la mortalità dei pazienti settici. In particolare, un aumento dei valori di Creatinina, Urea, Fosfato e soprattutto del Potassio risultano associati ad aumento del rischio di morte nei pazienti settici, evidenziando il ruolo del danno renale nell'influenzare la prognosi. L'ipocloremia risulta inoltre un indicatore prognostico negativo nella popolazione di studio, accanto ad altri indicatori che suggeriscono una tendenza dei morti a manifestare danno d'organo: Bilirubina (indice di colestasi), AST (indice di danno epatico e miocardico), aPTT (testimone di alterazioni emostatiche). Lattatemia ed APPLE_{fast} score, tra i parametri associati con l'*outcome*, rivestono notevole importanza clinica in quanto facilmente valutabili nei pazienti all'ammissione e al momento dei primi esami.

Un risultato di notevole interesse derivante dal presente lavoro, infine, è il riconoscimento del valore diagnostico del *Delta Neutrophil Index* nella specie canina. Sebbene il DNI non risulti correlato direttamente con la prognosi, come invece è riportato in medicina umana,

esso ha mostrato associazione significativa con la gravità del quadro clinico e rappresenta pertanto una variabile utile nel riconoscimento dei soggetti settici e nella stratificazione clinica della popolazione.

Bibliografia

Agnoli et al., 2013

Agnoli C, Dondi F, Russo S, Troia R, Gentilini F, Giunti M. Automated Platelet Parameters analysis (ADVIA 2120) in healthy and SIRS dogs: a retrospective evaluation. 12th European Veterinary Emergency Critical Care Conference, 2013. Copenhagen. Poster Session.

Allen e Holm, 2008

Allen SE, Holm JL. Lactate: physiology and clinical utility. J Vet Emerg Crit Care 2008; 18(2): 123-132.

Barsanti e Finco, 1984

Barsanti JA, Finco DR: Evaluation of techniques for diagnosis of canine prostatic diseases. JAVMA.1984; 185(2): 198–200.

Bartoskova et al., 2007

Bartoskova A, Vitasek R, Leva L, Faldyna M. Hysterectomy leads to fast improvement of haematological and immunological parameters in bitches with pyometra. J Small Anim Pract. 2007; 48(10): 564-8.

Bentley et al., 2013

Bentley AM, Mayhew PD, Culp WT, Otto CM. Alterations in the hemostatic profiles of dogs with naturally occurring septic peritonitis. J Vet Emerg Crit Care. 2013; 23(1): 14-22.

Bigliardi et al., 2004

Bigliardi E, Parmigiani E, Cavirani S, Luppi A, Bonati L, Corradi A. Ultrasonography and cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. Reprod Domest Anim. 2004; 39(3): 136-40.

Bone et al., 1992

Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. 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 Medicine. Chest. 1992; 101(6): 1644-55.

Børresen e Skrede, 1980

Børresen B, Skrede S. Pyometra in the dog--a pathophysiological investigation. V. The presence of intrahepatic cholestasis and an "acute phase reaction.". Nord Vet Med. 1980; 32(9): 378-86.

Brady e Otto, 2001

Brady CA, Otto, CM. Systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and multiple organ dysfunction. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2001; 31(6): 1147-62, v-vi.

Ceron et al., 2005

Ceron JJ, Eckersall PD, Martýnez-Subiela S. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Pathol.* 2005; 34(2): 85-99.

Christensen et al., 2014

Christensen MB, Langhorn R, Goddard A, Andreasen EB, Moldal E, Tvarijonavičiute A, Kirpensteijn J, Jakobsen S, Persson F, Kjelgaard-Hansen M. Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. *Can Vet J.* 2014; 55(2): 161-8.

Christensen, 2012

Christensen BW. Disorders of sexual development in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2012; 42(3): 515-26, vi.

Conti-Patara et al., 2012

Conti-Patara A, de Araújo Caldeira J, de Mattos-Junior E, de Carvalho Hda S, Reinoldes A, Pedron BG, Patara M, Francisco Talib MS, Faustino M, de Oliveira CM, Cortopassi SR. Changes in tissue perfusion parameters in dogs with severe sepsis/septic shock in response to goal-directed hemodynamic optimization at admission to ICU and the relation to outcome. *J Vet Emerg Crit Care.* 2012; 22(4): 409-18.

Contri et al., 2015

Contri A, Gloria A, Carluccio A, Pantaleo S, Robbe D. Effectiveness of a modified administration protocol for the medical treatment of canine pyometra. *Vet Res Commun.* 2015; 39(1): 1-5.

Dabrowski et al., 2007

Dabrowski R, Wawron W, Kostro K. Changes in CRP, SAA and haptoglobin produced in response to ovariohysterectomy in healthy bitches and those with pyometra. *Theriogenology.* 2007; 67(2): 321-7.

Dabrowski et al., 2009

Dabrowski R, Kostro K, Lisiecka U, Szczubiał M, Krakowski L. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early post-ovariohysterectomy complications. *Theriogenology.* 2009; 72(4): 471-6.

Dabrowski et al., 2013

Dąbrowski R, Kostro K, Szczubiał M. Concentrations of C-reactive protein, serum amyloid A, and haptoglobin in uterine arterial and peripheral blood in bitches with pyometra. *Theriogenology.* 2013; 80(5): 494-7.

Dabrowski et al., 2015 a

Dąbrowski R, Szczubiał M, Kostro K, Wawron W, Ceron JJ, Tvarijonavičiute A. Serum insulin-like growth factor-1 and C-reactive protein concentrations before and after ovariohysterectomy in bitches with pyometra. *Theriogenology.* 2015;83(4): 474-7.

Dabrowski et al., 2015 b

Dąbrowski R, Pastor J, Szczubiał M, Piech T, Bochniarz M, Wawron W, Tvarijonavičiute A. Serum IL-6 and IL-10 concentrations in bitches with pyometra undergoing ovariohysterectomy. *Acta Vet Scand.* 2015; 57:61.

Davidson e Baker, 2009

Davidson AP, Baker TW. Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim Med.* 2009; 24(2): 55-63.

De Bosschere et al., 2001

De Bosschere H, Ducatelle R, Vermeirsch H, Van Den Broeck W, Coryn M. Cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in the bitch: should the two entities be disconnected? *Theriogenology.* 2001; 55(7): 1509-19.

De Laforcade et al., 2003

de Laforcade AM, Freeman LM, Shaw SP, Brooks MB, Rozanski EA, Rush JE. Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis. *J Vet Intern Med.* 2003; 17(5): 674-9.

DeClue et al., 2012

DeClue AE, Sharp CR, Harmon M. Plasma inflammatory mediator concentrations at ICU admission in dogs with naturally developing sepsis. *J Vet Intern Med.* 2012; 26(3): 624-30.

Deutschman e Tracey, 2014

Deutschman CS, Tracey KJ. Sepsis: current dogma and new perspectives. *Immunity.* 2014; 40(4): 463-75.

Dorfman e Barsanti, 1998

Dorfman M, Barsanti JA. Le malattie della prostata nel cane. *Veterinaria.* 1998; 4: 59-71.

Dow, 1959 a

Dow C. The cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *J Comp Pathol.* 1959; 69: 237-50.

Dow, 1959 b

Dow, C. Experimental reproduction of the cystic hyperplasia-pyometra complex in the bitch. *J Pathol.* 1959; 78: 267-278.

Drewry et al., 2014

Drewry AM, Samra N, Skrupky LP, Fuller BM, Compton SM, Hotchkiss RS. Persistent lymphopenia after diagnosis of sepsis predicts mortality. *Shock.* 2014; 42(5): 383-91.

Egenvall et al., 2001

Egenvall A, Hagman R, Bonnett BN, Hedhammar Å, Olsson P, Lagerstedt A-S. Breed risk of pyometra in insured dogs in Sweden. *J Vet Intern Med.* 2001; 15: 530-538.

Enginler et al., 2014

Enginler S, Ateş A, Diren Sığırcı B, Sontaş B, Sönmez K, Karaçam E, Ekici H, Evkuran Dal G, Gürel A. Measurement of C-reactive protein and Prostaglandin F_{2α} Metabolite

Concentrations in Differentiation of Canine Pyometra and Cystic Endometrial Hyperplasia/Mucometra. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49: 641–647.

Faldyna et al., 2001

Faldyna M, Laznicka A, Toman M. Immunosuppression in bitches with pyometra. *J Small Anim Pract*. 2001; 42(1): 5-10.

Ferkau et al., 2013

Ferkau A, Gillmann HJ, Mischke R, Calmer S, Ecklebe S, Abid M, Minde JW, Echtermeyer F, Theilmeier G. Infection-associated platelet dysfunction of canine platelets detected in a flow chamber model. *BMC Vet Res*. 2013; 9:112.

Fieni et al., 2014

Fieni F, Topie E, Gogny A. Medical treatment for pyometra in dogs. *Reprod Domest Anim*. 2014; 49 (2): 28-32.

Fieni, 2006

Fieni F. Clinical evaluation of the use of aglepristone, with or without cloprostenol, to treat cystic endometrial hyperplasia-pyometra complex in bitches. *Theriogenology*, 2006; 66: 1550-1556.

Floras et al., 2014 a

Floras AN, Holowaychuk MK, Bienzle D, Bersenas AM, Sharif S, Harvey T, Nordone SK, Wood GA. N-terminal pro-C-natriuretic peptide and cytokine kinetics in dogs with endotoxemia. *J Vet Intern Med*. 2014; 28(5): 1447-53.

Floras et al., 2014 b

Floras ANK, Holowaychuk MK, Hodgins DC, Marr HS, Birkenheuer A, Sharif S, Bersenas AME, Bienzle D. Investigation of a commercial ELISA for the detection of canine Procalcitonin. *J Vet Intern Med*. 2014; 28: 599-602.

Fransson et al., 1997

Fransson B, Lagerstedt A-S, Hellmen E, Jonsson P. Bacteriological findings, blood chemistry profile and plasma endotoxin levels in bitches with pyometra or other uterine disease. *J Vet Med*. 1997; 44: 417–426.

Fransson et al., 2004

Fransson BA, Karlstam E, Bergstrom A, Lagerstedt AS, Park JS, Evans MA, Ragle CA. C-reactive protein in the differentiation of pyometra from cystic endometrial hyperplasia/mucometra in dogs. *J Am Anim Hosp Assoc*. 2004; 40(5): 391-9.

Fransson et al., 2007

Fransson BA, Lagerstedt AS, Bergstrom A, Hagman R, Park JS, Chew BP, Evans MA, Ragle CA. C-reactive protein, tumor necrosis factor a, and interleukin-6 in dogs with pyometra and SIRS. *J Vet Emerg Crit Care*. 2007; 17(4): 373–381.

Fransson, 2003

Fransson B. Systemic inflammatory response in canine pyometra; the response to uterine bacterial infection. Doctoral thesis. Ultuna : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae. Veterinaria, 1401-6257 ; 2003: 161.

Freitag et al., 2007

Freitag T, Jerram RM, Walker AM, Warman CG. Surgical management of common canine prostatic conditions. *Compend Contin Educ Vet.* 2007; 29(11): 656-73.

Fukuda, 2001

Fukuda s. Incidence of pyometra in colony-raised beagle dogs. *Exp Anim.* 2001; 50(4): 325-9.

Garcia-Alvarez, 2014

Garcia-Alvarez M, Marik P, Bellomo R. Sepsis-associated hyperlactatemia. *Crit Care.* 2014; 18(5): 503.

Gibson et al., 2013

Gibson A, Dean R, Yates D, Stavisky J. A retrospective study of pyometra at five RSPCA hospitals in the UK: 1728 cases from 2006 to 2011. *Vet Rec.* 2013; 173(16): 396.

Giunti et al., 2010

Giunti M, Peli A, Battilani M, Zacchini S, Militerno G, Otto CM. Evaluation of CALC-I gene (CALCA) expression in tissues of dogs with signs of the systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care.* 2010; 20(5): 523-7.

Giunti et al, 2015

Giunti M, Troia R, Bergamini PF, Dondi F. Prospective evaluation of the acute patient physiologic and laboratory evaluation score and an extended clinicopathological profile in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care.* 2015; 25(2): 226-33

Groppetti et al., 2012

Groppetti D, Pecile A, Barbero C, Martino PA. Vaginal bacterial flora and cytology in proestrous bitches: Role on fertility. *Theriogenology.* 2012; 77(8): 1549-56.

Günzel-Apel et al., 1997

Günzel-Apel AR, Hayer M, Mischke R, Wirth W, Hoppen HO. Dynamics of haemostasis during the oestrous cycle and pregnancy in bitches. *J Reprod Fertil Suppl.* 1997; 51: 185-93.

Haas et al., 2015

Haas M, Kaup FJ, Neumann S. Canine pyometra: a model for the analysis of serum CXCL8 in inflammation. *J Vet Med Sci.* 2015; Epub.

Hadley, 1975

Hadley JC. Unconjugated oestrogen and progesterone concentrations in the blood of bitches with false pregnancy and pyometra. *Vet Rec.* 1975; 96(25): 545-7.

Hagman et al., 2006 a

Hagman R, Kindahl H, Lagerstedt AS. Pyometra in bitches induces elevated plasma endotoxin and prostaglandin F2alpha metabolite levels. *Acta Vet Scand.* 2006; 47: 55-67.

Hagman et al., 2006 b

Hagman R, Kindahl H, Fransson BA, Bergström A, Holst BS, Lagerstedt AS. Differentiation between pyometra and cystic endometrial hyperplasia/mucometra in bitches by prostaglandin F2alpha metabolite analysis. *Theriogenology.* 2006; 66(2): 198-206.

Hagman et al., 2007

Hagman R, Lagerstedt AS, Fransson BA, Bergström A, Häggström J. Cardiac troponin I levels in canine pyometra. *Acta Vet Scand.* 2007; 49: 6.

Hagman et al., 2009 a

Hagman R, Reezigt BJ, Bergström Ledin H, Karlstam E. Blood lactate levels in 31 female dogs with pyometra. *Acta Vet Scand.* 2009; 51: 2.

Hagman et al., 2009 b

Hagman R, Rönneberg E, Pejler G. Canine Uterine Bacterial Infection Induces Upregulation of Proteolysis-Related Genes and Downregulation of Homeobox and Zinc Finger Factors. *Plos One.* 2009; (DOI: 10.1371/journal.pone.0008039).

Hagman, 2011

Hagman R. Serum a-1-acid glycoprotein concentrations in 26 dogs with pyometra. *Vet Clin Pathol.* 2011; 40(1): 52-9

Hagman, 2012

Hagman R. Clinical and molecular characteristics of pyometra in female dogs. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47(6): 323-5.

Hagman, 2014

Hagman R. Diagnostic and prognostic markers for uterine diseases in dogs. *Reprod Domest Anim.* 2014; 49(2): 16-20.

Hardie et al., 1984

Hardie EM, Barsanti JA, Rawlings CA. Complications of prostatic surgery. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1984; 20: 50-6.

Hardy e Osborne, 1974

Hardy RM, Osborne CA. Canine pyometra: pathophysiology, diagnosis and treatment of uterine and extra-uterine lesions. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1974; 10: 245-267

Hauptman et al., 1997

Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg.* 1997; 26(5): 393-7.

Hayes et al., 2010

Hayes G, Mathews K, Doig G, Kruth S, Boston S, Nykamp S, Poljak Z, Dewey C. The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *J Vet Intern Med.* 2010; 24(5): 1034-47.

Heemskerk et al., 1999

Heemskerk VH, Daemen MA, Buurman WA. Insulin-like growth factor-1 (IGF-1) and growth hormone (GH) in immunity and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1999; 10(1): 5-14.

Heiene et al., 2001

Heiene R, Moe L, Mølmen G. Calculation of urinary enzyme excretion, with renal structure and function in dogs with pyometra. *Res Vet Sci.* 2001; 70(2): 129-37.

Heiene et al., 2007

Heiene R, Kristiansen V, Teige J, Jansen JH. Renal histomorphology in dogs with pyometra and control dogs, and long term clinical outcome with respect to signs of kidney disease. *Acta Vet Scand.* 2007; 49: 13.

Horne et al., 2008

Horne AW, Stock SJ, King AE. Innate immunity and disorders of the female reproductive tract. *Reproduction.* 2008; 135(6): 739-49.

Hotchkiss e Karl, 2003

Hotchkiss RS, Karl, IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med.* 2003; 348(2): 138-50.

Hwang et al., 2015

Hwang YJ, Chung SP, Park YS, Chung HS, Lee HS, Park JW, Lee JW, Hong JH, You JS, Park I. Newly designed delta neutrophil index-to-serum albumin ratio prognosis of early mortality in severe sepsis. *Am J Emerg Med.* 2015; 33(11): 1577-82.

Jiménez-Ibáñez et al., 2012

Jiménez-Ibáñez EO, Castillejos-López M, Hernández A, Gorocica P, Alvarado-Vásquez N. High mortality associated with hyperglycemia, neutrophilia, and lymphopenia in critically ill patients. *Tohoku J Exp Med.* 2012; 226(3): 213-20.

Jitpean et al., 2014 a

Jitpean S, Ström-Holst B, Emanuelson U, Höglund OV, Pettersson A, Alneryd-Bull C, Hagman R. Outcome of pyometra in female dogs and predictors of peritonitis and prolonged postoperative hospitalization in surgically treated cases. *BMC Vet Res.* 2014; 10: 6.

Jitpean et al., 2014 b

Jitpean S, Holst BS, Höglund OV, Pettersson A, Olsson U, Strage E, Södersten F, Hagman R. Serum insulin-like growth factor-I, iron, C-reactive protein, and serum amyloid A for prediction of outcome in dogs with pyometra. *Theriogenology.* 2014; 82(1): 43-8.

Jitpean et al., 2014 c

Jitpean S, Pettersson A, Höglund OV, Holst BS, Olsson U, Hagman R. Increased concentrations of Serum amyloid A in dogs with sepsis caused by pyometra. *BMC Vet Res.* 2014; 10: 273.

Jitpean et al., 2015

Jitpean S, Stridsberg M, Petterson A, Höglund OV, Holst BS, Hagman R. Decreased plasma Chromogranin A361-372 (Catestatin) but not Chromogranin A17-38 (Vasostatin) in female dogs with bacterial uterine infection (pyometra). *BMC Veterinary Research.* 2015; 11:14

Jitpean, 2015

Jitpean S. Predictive markers and risk factors in canine pyometra. Doctoral thesis. Uppsala: Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880; 2015: 85.

Johnston et al., 2000

Johnston SD, Kamolpatana K, Root-Kustritz MV, Johnston GR. Prostatic disorders in the dog. *Anim Reprod Sci.* 2000; 60-61: 405-15.

Karlsson et al., 2012

Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Karlstam E, Wernersson S. Cytokines as immunological markers for systemic inflammation in dogs with pyometra. *Reprod Domest Anim.* 2012; 47(6): 337-41.

Karlsson et al., 2013

Karlsson I, Wernersson S, Ambrosen A, Kindahl H, Södersten F, Wang L, Hagman R. Increased concentrations of C-reactive protein but not high-mobility group box 1 in dogs with naturally occurring sepsis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2013; 156(1-2): 64-72.

Karlsson et al., 2016

Karlsson I, Hagman R, Johannisson A, Wang L, Södersten F, Wernersson S. Multiplex cytokine analyses in dogs with pyometra suggest involvement of KC-like chemokine in canine bacterial sepsis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2016; 170: 41-6.

Karlsson, 2015

Karlsson I. Cytokines as diagnostic biomarkers in canine pyometra and sepsis. Doctoral thesis. Uppsala : Sveriges lantbruksuniv., Acta Universitatis agriculturae Sueciae, 1652-6880; 2015: 46.

Keir et al., 2015

Keir I, Kellum JA. Acute kidney injury in severe sepsis: Pathophysiology, diagnosis, and treatment recommendations. *J Vet Emerg Crit Care.* 2015; 25(2): 200-9.

Kjelgaard-Hansen et al., 2007

Kjelgaard-Hansen M, Luntang-Jensen M, Willesen J, Jensen AL. Measurement of serum interleukin-10 in the dog. *Vet J.* 2007; 173(2): 361-5.

Klenner et al., 2010

Klenner S, Richartz J, Bauer N, Moritz A. Myeloperoxidase deficiency in dogs observed with the ADVIA®120. A retrospective study. Tierarztl Prax Ausg K Kleintiere Heimtiere. 2010; 38(3): 139-46.

Krekeler et al., 2012

Krekeler N, Lodge KM, Anderson GA, Browning GF, Charles JA, Wright PJ. Effect of simulated stages of the canine oestrous cycle on Escherichia coli binding to canine endometrium. Reprod Domest Anim. 2012; 47(6): 331-4.

Küplülü et al., 2009

Küplülü S, Vural MR, Demirel A, Polat M, Akçay A. The comparative evaluation of serum biochemical, haematological, bacteriological and clinical findings of dead and recovered bitches with pyometra in the postoperative process. Acta veterinaria (Beograd). 2009; 59(2-3): 193-204.

Lever et al., 2007

Lever A, Mackenzie I. Sepsis: definition, epidemiology, and diagnosis. BMJ. 2007; 335(7625): 879-83.

Levy et al., 2003

Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, Cohen J, Opal SM, Vincent JL, Ramsay G; SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003; 31(4): 1250-6.

Maciel et al., 2014

Maciel GS, Uscategui RR, de Almeida VT, Oliveira ME, Feliciano MA, Vicente WR. Quantity of IL-2, IL-4, IL-10, INF- γ , TNF- α and KC-like cytokines in serum of bitches with pyometra in different stages of oestrous cycle and pregnancy. Reprod Domest Anim. 2014; 49(4): 701-4.

Maddens et al., 2010

Maddens B, Daminet S, Smets P, Meyer E. Escherichia coli Pyometra Induces Transient Glomerular and Tubular Dysfunction in Dogs. J Vet Intern Med. 2010; 24(6): 1263-70.

Maddens et al., 2011

Maddens B, Heiene R, Smets P, Svensson M, Aresu L, van der Lugt J, Daminet S, Meyer E. Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on proteinuria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. J Vet Intern Med. 2011; 25(5): 1075-83.

Mandel, 1959

Mandel EE. Serum iron and iron-binding capacity in clinical diagnosis. Clin Chem. 1959; 5(1): 1-12.

Martin, 2012

Martin GS. Sepsis, severe sepsis and septic shock: changes in incidence, pathogens and outcomes. Expert Rev Anti Infect Ther. 2012; 10(6): 701-6.

Mayeux, 2004

Mayeux R. Biomarkers: Potential Uses and Limitations. *NeuroRx*. 2004; 1(2): 182–188.

Mazzaferro et al., 2002

Mazzaferro EM, Rudloff E, Kirby R. **The role of albumin replacement in the critically ill veterinary patient.** *J Vet Emerg Crit Care*. 2002; 12(2): 113-124.

Memon, 2007

Memon MA. Common causes of male dog infertility. *Theriogenology*. 2007; 68(3): 322-8.

Moritz et al., 2004

Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K, Failing K, Weiss DJ. Canine and feline hematology reference values for the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol*. 2004; 33(1): 32-8.

Moritz et al., 2005

Moritz A, Walcheck BK, Weiss DJ. Evaluation of flow cytometric and automated methods for detection of activated platelets in dogs with inflammatory disease. *Am J Vet Res*. 2005; 66(2): 325-9.

Nahm et al., 2008

Nahm CH, Choi JW, Lee J. Delta neutrophil index in automated immature granulocyte counts for assessing disease severity of patients with sepsis. *Ann Clin Lab Sci*. 2008; 38(3): 241-6.

Nairz et al., 2014

Nairz M, Haschka D, Demetz E, Weiss G. Iron at the interface of immunity and infection. *Front Pharmacol*. 2014; 5: 152.

Nakamura et al., 2008

Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H. C-Reactive Protein Concentration in Dogs with Various Diseases. *J Vet Med Sci*. 2008; 70(2): 127-31.

Naylor, 2003

Naylor S. Biomarkers: current perspectives and future prospects. *Expert Rev Mol Diagn*. 2003; 3(5): 525-9.

Noakes et al., 2001

Noakes DE, Dhaliwal GK, England GC. Cystic endometrial hyperplasia/pyometra in dogs: a review of the causes and pathogenesis. *J Reprod Fertil Suppl*. 2001; 57: 395-406.

O'Brien, 2012

O'Brien M. The reciprocal relationship between inflammation and coagulation. *Topics in Companion An Med*. 2012; 27: 46-52.

Okano et al., 1998

Okano S, Tagawa M, Takase K. Relationship of the blood endotoxin concentration and prognosis in dogs with pyometra. *J Vet Med Sci.* 1998; 60: 1265–1267

Otto, 2007

Otto CM. Sepsis in veterinary patients: what do we know and where can we go? *J Vet Emerg Crit Care.* 2007; 17(4): 329-332.

Paclikova et al., 2006

Paclikova K, Kohout P, Vlasin M. Diagnostic possibilities in the management of canine prostatic disorders. *Veterinarni Medicina.* 2006; 51(1): 1-13.

Park et al., 2011

Park BH, Kang YA, Park MS, Jung WJ, Lee SH, Lee SK, Kim SY, Kim SK, Chang J, Jung JY, Kim YS. Delta neutrophil index as an early marker of disease severity in critically ill patients with sepsis. *BMC Infect Dis.* 2011; 11: 299.

Pelander et al., 2008

Pelander L, Hagman R, Häggström J. Concentrations of cardiac Troponin I before and after ovariohysterectomy in 46 female dogs with pyometra. *Acta Vet Scand.* 2008; 50: 35.

Pierrakos e Vincent, 2010

Pierrakos C e Vincent JL. Sepsis biomarkers: a review. *Crit Care.* 2010; 14(1): R15.

Plavec et al., 2006

Plavec T, Celinšec B, Dolinar K, Pečar J, Nemek A, Butinar J. Haemostasis impairment in bitches with pyometra. *Acta Veterinaria (Beograd).* 2006; 56(5-6): 529-540.

Pretzer, 2008

Pretzer SD. Clinical presentation of canine pyometra and mucometra: a review. *Theriogenology.* 2008; 70(3): 359-63.

Rau et al., 2007

Rau S, Kohn B, Richter C, Fenske N, Küchenhoff H, Hartmann K, Härtle S, Kaspers B, Hirschberger J. Plasma interleukin-6 response is predictive for severity and mortality in canine systemic inflammatory response syndrome and sepsis. *Vet Clin Pathol.* 2007; 36(3): 253-60.

Remik, 2007

Remick DG. Pathophysiology of sepsis. *Am J Pathol.* 2007; 170(5): 1435-44.

Romagnoli e Schlafer, 2006

Romagnoli S, Schlafer DH. Disorders of sexual differentiation in puppies and kittens: a diagnostic and clinical approach. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2006; 36(3): 573-606, vii.

Ros et al., 2014

Ros L, Holst BS, Hagman R. A retrospective study of bitches with pyometra, medically treated with aglepristone. *Theriogenology*. 2014; 82(9): 1281-6.

Saadia e Schein, 1999

Saadia R, Schein M. Multiple organ failure. How valid is the "two hit" model? *J Accid Emerg Med*. 1999; 16(3): 163-167.

Sandholm et al., 1975

Sandholm M, Vasenius H, Kivistö AK. Pathogenesis of canine pyometra. *J Am Vet Med Assoc*. 1975; 167(11): 1006-10.

Sant'Anna et al., 2014

Sant'Anna MC, Giordano LGP, Flaiban KKMC, Muller EE, Martins MIM. Prognostic markers of canine pyometra. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2014; 66 (6): 1711-17.

Semeraro et al., 2010

Semeraro N, Ammollo CT, Semeraro F, Colucci M. Sepsis-Associated Disseminated Intravascular Coagulation and Thromboembolic Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2010; 2(3): e2010024.

Sharif et al., 2013

Sharif H, Hagman R, Wang L, Eriksson S. Elevation of serum thymidine kinase 1 in a bacterial infection: Canine pyometra. *Theriogenology*. 2013; 79(1): 17-23.

Smith et al., 2014

Smith JR, Smith KF, Brainard BM. Platelet parameters from an automated hematology analyzer in dogs with inflammatory clinical diseases. *Vet J*. 2014; 201(3): 406-11.

Smith, 2006

Smith FO. Canine pyometra. *Theriogenology*. 2006; 66(3): 610-2.

Smith, 2008

Smith J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *Theriogenology*. 2008; 70(3): 375-83.

Song et al., 2012

Song R, Kim J, Yu D, Park C, Park J. Kinetics of IL-6 and TNF- changes in a canine model of sepsis induced by endotoxin. *Vet Immunol Immunopathol*. 2012; 146(2): 143-9.

Stevenson et al., 2007

Stevenson CK, Kidney BA, Duke T, Snead EC, Mainar-Jaime RC, Jackson ML. Serial blood lactate concentrations in systemically ill dogs. *Vet Clin Pathol*. 2007; 36(3): 234-9.

Sugiura et al., 2004

Sugiura K, Nishikawa M, Ishiguro K, Tajima T, Inaba M, Torii R, Hatoya S, Wijewardana V, Kumagai D, Tamada H, Sawada T, Ikehara S, Inaba T. Effect of ovarian hormones on

periodical changes in immune resistance associated with estrous cycle in the beagle bitch. *Immunobiology*. 2004; 209(8): 619-27.

Tasca, 2008

Tasca S. Interpretazione clinica delle variazioni della sideremia del cane. *Veterinaria*. 2008; 5: 35-41.

Torrente et al., 2015

Torrente C, Manzanilla EG, Bosch L, Fresno L, Rivera Del Alamo M, Andaluz A, Saco Y, Ruiz de Gopegui R. Plasma iron, C-reactive protein, albumin, and plasma fibrinogen concentrations in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care*. 2015; 25(5): 611-9.

Trasch et al., 2003

Trasch K, Wehrend A, Bostedt H. Follow-up examinations of bitches after conservative treatment of pyometra with the antigestagen aglepristone. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*. 2003; 50: 375–379

Verstegen et al., 2008

Verstegen J, Dhaliwal G, Verstegen-Onclin K. Mucometra, cystic endometrial hyperplasia, and pyometra in the bitch: advances in treatment and assessment of future reproductive success. *Theriogenology*. 2008; 70(3): 364-74.

Volpato et al., 2012

Volpato R, Rodello L, Abibe RB, Lopes MD. Lactate in bitches with pyometra. *Reprod Domest Anim*. 2012; 47(6): 335-6.

Wallace, 2001

Wallace M. Diagnosis and medical management of canine prostatic disease. In: *Proceedings of the Atlantic Coast Veterinary Conference*; 2001.

White et al., 1995

White RA, Williams JM. Intracapsular prostatic omentalization: a new technique for management of prostatic abscesses in dogs. *Vet Surg*. 1995; 24(5): 390-5.

White, 2000

White RA. Prostatic surgery in the dog. *Clin Tech Small Anim Pract*. 2000; 15(1): 46-51.

Yilmaz et al., 2008 a

Yilmaz Z, Eralp O, Ilcol YO. Evaluation of platelet count and its association with plateletcrit, mean platelet volume, and platelet size distribution width in a canine model of endotoxemia. *Vet Clin Pathol*. 2008; 37(2): 159-63.

Yilmaz et al., 2008 b

Yilmaz Z, Ozarda Ilkol I, Ulus IH. Endotoxin increases plasma leptin and ghrelin levels in dogs. *Crit Care Med*. 2008; 36(3): 828-33.

Yu et al., 2010

Yu DH, Nho DH, Song RH, Kim SH, Lee MJ, Nemzek JA, Park J. High-mobility group box 1 as a surrogate prognostic marker in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care*. 2010; 20(3): 298-302.

Yuki et al., 2010

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

Zaragoza et al., 2004

Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, Tapia JA, Mañe MC. Canine pyometra: a study of the urinary proteins by SDS-PAGE and Western blot. *Theriogenology*. 2004; 61(7-8): 1259-72.

Zhang et al., 2009

Zhang D, Lavaux T, Sapin R, Lavigne T, Castelain V, Aunis D, Metz-Boutigue MH, Schneider F. Serum concentration of chromogranin A at admission: an early biomarker of severity in critically ill patients. *Ann Med*. 2009; 41(1): 38-44.