

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE VETERINARIE

Ciclo XXXI°

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4 – Clinica Medica e Farmacologia Veterinaria

Settore Scientifico disciplinare: VET/08 – Clinica Medica Veterinaria

LA CHIMICA URINARIA E LE FRAZIONI DI ESCREZIONE NEL CANE CON
DANNO RENALE ACUTO (AKI) E MALATTIA RENALE CRONICA (CKD):
RIVALUTAZIONE CLINICOPATOLOGICA E NUOVE PROSPETTIVE
DIAGNOSTICHE E PROGNOTICHE

Presentata da: Dott.ssa Federica Serafini

Coordinatore Dottorato

Prof. Arcangelo Gentile

Relatore

Dott. Francesco Dondi

Esame finale anno 2019

SOMMARIO

CAPITOLO 1	5
OMEOSTASI: BILANCIO IDRICO ED ELETTROLITICO NEL PAZIENTE SANO	5
PRINCIPALI FUNZIONI RENALI E CONTROLLO DELL'OMEOSTASI.....	10
CAPITOLO 2	25
VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ RENALE	25
BIOMARKER	30
CAPITOLO 3	62
OBIETTIVI DELLO STUDIO.....	62
MATERIALI E METODI	64
VALUTAZIONI CLINICOPATOLOGICHE, METODICA DI PRELIEVO E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI.....	66
ANALISI STATISTICA	81
CAPITOLO 4	83
RISULTATI	83
PARTE PRIMA - CANI SANI	83
CAPITOLO 5	98
SECONDA PARTE – CANI CON DANNO RENALE ACUTO	98

Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications.	98
CAPITOLO 6	118
TERZA PARTE - CANI CON MALATTIA RENALE CRONICA	118
CAPITOLO 7	162
DISCUSSIONE.....	162
BIBLIOGRAFIA.....	179

CAPITOLO 1

OMEOSTASI: BILANCIO IDRICO ED ELETTROLITICO NEL PAZIENTE SANO

Il corpo dei mammiferi è costituito per circa il 60% da acqua, percentuale che può subire variazioni in base all'età, alla razza e alle condizioni corporee: cani e gatti neonati, infatti, hanno una percentuale di acqua che può raggiungere circa l'80%; mentre cani di razza Greyhound possono arrivare a circa il 70% del contenuto di acqua, dovuto al basso contenuto di tessuto adiposo. È importante ricordare che il contenuto idrico di un corpo deve essere stimato sulla base del contenuto di massa magra, in quanto il tessuto adiposo presenta una scarsa quantità di acqua ed in un paziente normopeso costituisce circa il 20% della composizione corporea (Wellman *et al.*, 2012).

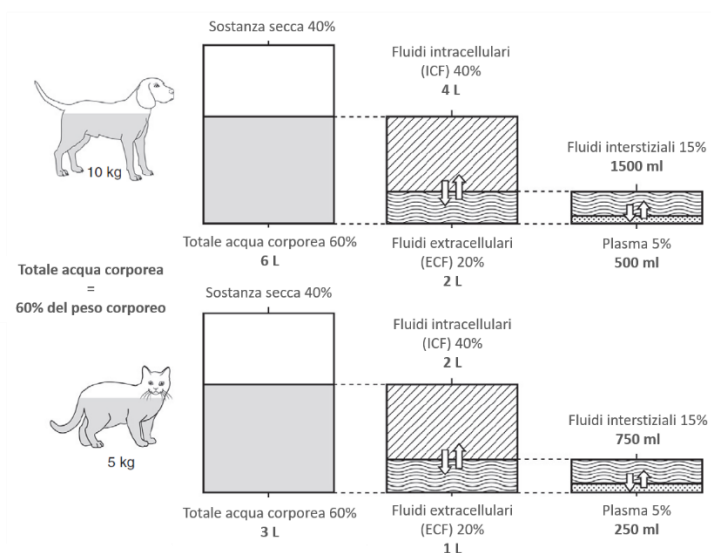


Figura 1.1: Comparti di acqua totale corporea espressi come percentuali di peso corporeo in un cane di 10 kg e in un gatto di 5 kg. Modificato da Wellman *et al.*, 2012.

L'acqua, quindi, è il maggior componente dei fluidi corporei che sono distribuiti in distinti compartimenti (figura 1.1), mantenuti in equilibrio tra loro attraverso diversi meccanismi. La maggioranza dei fluidi corporei è contenuta all'interno delle cellule, fluidi intracellulari (*intracellular fluids* o ICF) e costituiscono circa il 40% del peso corporeo, mentre il restante 20% è rappresentato dai fluidi extracellulari (*extracellular fluids* o ECF). Durante variazioni dello stato di idratazione di un corpo si hanno cambiamenti importanti del contenuto di ECF e, ad esempio, durante alcuni processi patologici (perdite gastrointestinali, poliuria) si ha inizialmente la perdita di ECF che dovranno essere rimpiazzati con una corretta fluidoterapia. Stimare con esattezza la quantità dei fluidi dello spazio extracellulare è complesso e varia a seconda della tecnica usata; i dati riportati nel cane e nel gatto indicano che i EFC possono variare dal 15 al 30% del peso corporeo. Questi ultimi, inoltre, comprendono anche i fluidi interstiziali, il plasma e i fluidi transcellulari (liquido cerebrospinale, fluido gastrointestinale, bile, secrezioni ghiandolari, secrezioni respiratorie e liquido sinoviale) che rappresentano circa l'1% del peso corporeo. Il tessuto connettivo, la cartilagine e l'osso contengono circa il 15% di acqua ma non vengono considerati all'interno dei ECF in quanto questi tessuti cedono acqua lentamente agli altri compartimenti (Wellman *et al.*, 2012).

Per omeostasi si intende la capacità degli organismi viventi di mantenere un equilibrio interno tra i diversi compartimenti (per quanto riguarda la concentrazione di elettroliti nel plasma e nelle cellule, la volemia circolante, la pressione arteriosa, la temperatura corporea e il bilancio energetico) pur in presenza di variazioni delle condizioni esterne. Il bilancio idrico dell'organismo è regolato sia a livello renale che a livello del sistema nervoso centrale (centro della sete). Ogni giorno i reni filtrano enormi volumi di sangue, circa il 25% della gittata cardiaca, e i tubuli riassorbono la maggior parte del fluido e dei soluti filtrati vitali per l'organismo. Il rene, dunque, produce e controlla la composizione finale delle urine, basandosi su fluttuazioni che dipendono dall'*intake* dell'organismo e previene importanti cambiamenti di volume e composizione dei liquidi corporei. I fluidi corporei contengono numerosi soluti, che sono distribuiti in modo eterogeneo nei diversi comparti corporei. Le membrane

cellulari e l'endotelio presentano una differente permeabilità e mantengono diverse concentrazioni tra soluti del comparto intra- ed extracellulare. La concentrazione plasmatica dei soluti riflette la concentrazione dei soluti nello spazio ECF. Nonostante la differenza di concentrazione di soluti dello spazio ICF ed ECF la quantità totale di anioni e cationi è uguale garantendo, così, l'elettroneutralità (Figura 1.2) (Elhassan e Schrier, 2010).

Il catione più rappresentato nei ECF è il sodio e circa il 70% di questo è scambiabile (quindi osmoticamente attivo) mentre il 30% è insolubile ed è presente sotto forma di sali di sodio nelle ossa. Le membrane cellulari sono permeabili al sodio che tende ad entrare nella cellula e grazie alla pompa sodio-potassio o Na^+/K^+ ATP dipendente (Na^+/K^+ ATPasi) viene rimosso attivamente, portandolo nei ECF e garantendo, così, un gradiente di concentrazione tra ICF e ECF (Wellman *et al.*, 2012).

Figure 1.2: il contenuto di acqua plasmatica rappresenta il 93% del volume

Composizione ionica corporea				
Ioni	Plasma (mEq/L)	Acqua plasmatica (mEq/L)	Fluido interstiziale (mEq/L)	ICF- cellule muscolo-scheletriche (mEq/L)
Cationi				
Na^+	142	152,7	145,1	12
K^+	4,3	4,6	4,4	140
Ca^{2+} (ionizzato)	2,5	2,7	2,4	4
Mg^{2+} (ionizzato)	1,1	1,2	1,1	34
Totale	149,9	161,2	153	190
Anioni				
Cl^-	104	111,9	117,4	4
HCO_3^-	24	25,8	27,1	12
HPO_4^{2-} , H_2PO_4^-	2	2,2	2,3	40
Proteine	14	15	0	50
Altri	5,9	6,3	6,2	84
Totale	149,9	161,2	153	190

plasmatico.

Modificato da Wellman *et al.*, 2012.

I ECF, inoltre, contengono una piccola quota di potassio che è scambiabile al 100% e minime alterazioni di quest'ultima possono causare debolezza muscolare (ipopotassiemia) o cardiotossicità (iperpotassiemia). Il gradiente di concentrazioni tra ICF e ECF è mantenuto dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi che spinge il potassio all'interno della cellula contro gradiente, mantenendo un potenziale elettrico di membrana di

circa -70mV. Gli anioni maggiormente presenti nello spazio extracellulare sono il cloro e il bicarbonato (generato a partire da CO₂ e da H₂O in presenza di anidraasi carbonica). Nei ICF i principali cationi sono il potassio e il magnesio, mentre gli anioni predominanti sono i fosfati organici e le proteine (Wellman *et al.*, 2012).

Nel paziente sano la concentrazione di una particolare molecola può essere simile o molto differente tra i vari compartimenti che sono mantenuti in equilibrio attraverso *shift* di soluti. Durante gli stati patologici, il volume dei fluidi e la concentrazione dei soluti cambia drammaticamente perdendo, così, l'omeostasi (Wellman *et al.*, 2012).

Nel paziente sano, in condizioni di neutralità termica, l'*intake* giornaliero di acqua, nutrienti e minerali è bilanciato da un'escrezione giornaliera di queste sostanze o dei loro metaboliti. Le perdite obbligatorie giornaliere avvengono attraverso le urine, a cui si possono aggiungere quelle di feci e saliva ed in minor misura attraverso l'*espirium* e la cute (cuscinetti plantari). Il fabbisogno varia a seconda della quantità di perdite che vengono influenzate dalle condizioni atmosferiche, dall'umidità e dall'attività svolta o da stati patologici (Wellman *et al.*, 2012).

L'eliminazione giornaliera di liquidi si divide in perdite obbligatorie (necessarie per eliminare i cataboliti) e in perdite di acqua libera (sotto il controllo dell'ormone antidiuretico-ADH). Queste ultime evitano la ritenzione eccessiva di acqua nell'organismo che può portare alla sovra idratazione e all'ipotonicità. L'eliminazione di acqua libera è controllata dalla stimolazione o dall'inibizione della secrezione di ADH e dalla sete. La letteratura riporta che una diminuzione dell'1-2% dell'osmolarità sierica promuove l'inibizione della stimolazione di ADH nell'uomo e ne abolisce la sete; mentre un aumento dell'osmolarità dell'1-2 % è sufficiente per provocare un elevato stimolo per la produzione di ADH. Nel cane, invece, l'aumento dell'osmolarità dell'1-3% promuove la sete, pertanto l'eliminazione di acqua libera in cani e gatti ipovolemici è molto scarsa (Wellman *et al.*, 2012).

Il volume di acqua richiesto per l'eliminazione dei soluti urinari dipende dalla massima osmolarità urinaria a cui l'organismo può arrivare. L'osmolarità urinaria massima valutata in diversi studi varia da 2425 a 2791 mOsm/kg nel cane e da 2984 a 4980 mOsm/kg nel gatto. La carica di soluti nelle urine deriva dalla quantità e dalla

composizione della dieta (fonte alimentare di proteine e minerali) e comprende urea, ammonio, sodio, potassio, calcio e magnesio. L'incremento delle proteine nella dieta aumenta la quota di urea presente nelle urine; mentre il metabolismo dei lipidi e dei carboidrati porta alla eliminazione di anidride carbonica e acqua (Wellman *et al.*, 2012).

PRINCIPALI FUNZIONI RENALI E CONTROLLO DELL'OMEOSTASI

Il rene svolge numerose attività necessarie alla sopravvivenza dell'organismo. Le funzioni renali possono essere schematicamente classificate in:

- regolazione del volume del liquido extracellulare e della pressione arteriosa: il sodio è il principale ione coinvolto nella regolazione del volume extracellulare; in presenza di un calo della pressione arteriosa l'apparato urinario e quello cardiovascolare cooperano per riportarla a valori adeguati;
- regolazione dell'osmolarità e del bilancio elettrolitico: i reni mantengono le concentrazioni degli ioni fondamentali per la sopravvivenza entro valori fisiologici;
- regolazione del pH: le oscillazioni del pH plasmatico sono normalmente mantenute entro un intervallo compatibile con la vita; il rene è in grado di tamponare un quadro di acidosi attraverso il riassorbimento di ioni bicarbonato ed un'aumentata escrezione di ioni idrogeno;
- escrezione dei prodotti del catabolismo (quali creatinina, urea) e sostanze esogene come farmaci e tossine;
- produzione di ormoni: i reni sintetizzano eritropoietina (che regola la produzione dei globuli rossi), renina (coinvolta nel controllo della pressione arteriosa) e permettono, inoltre, la conversione della vitamina D in forma attiva (Scott, 2011).

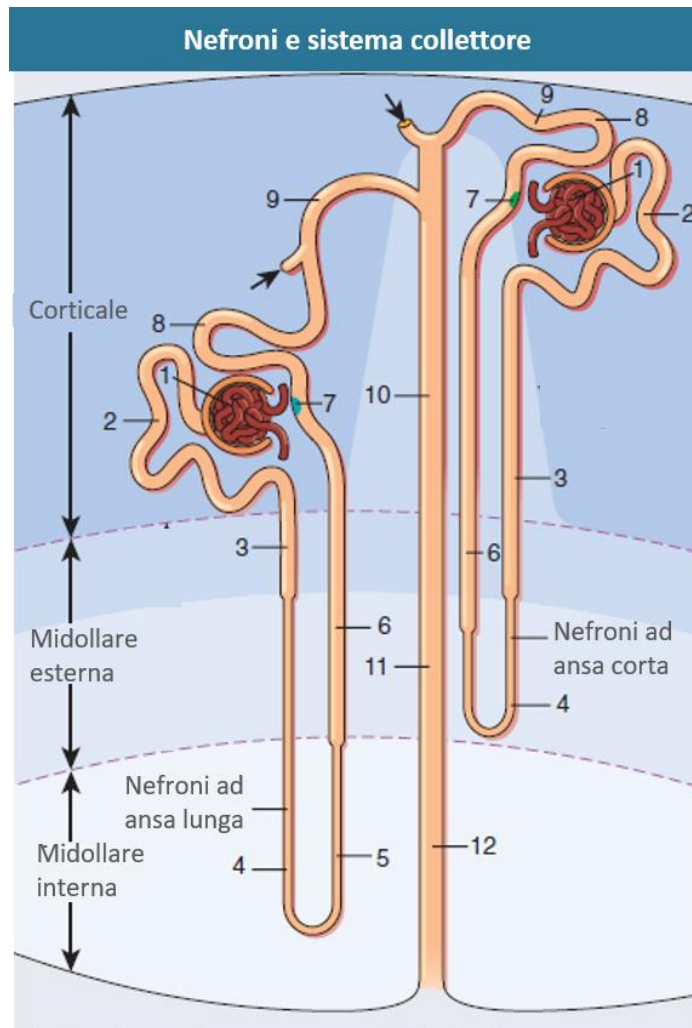


Figura 1.3: Rappresentazione di nefroni e del sistema collettore. 1. Capillari glomerulari. 2. Tubulo contorto prossimale. 3. Segmento largo del tratto discendente del tubulo prossimale (ADS). 4. Parte discendente sottile dell'ansa di Henle. 5. Parte ascendente sottile dell'ansa di Henle. 6. Segmento largo del tratto ascendente del tubulo distale/parte spessa dell'ansa ascendente di Henle (TAL). 7. Macula densa. 8. Tubulo contorto distale (TCD). 9. Tubulo connettore (TCN). 10. Dotto collettore corticale. 11. Tubulo collettore midollare esterno. 12. Tubulo collettore midollare interno. Modificato da Kriz e Elger, 2010.

Il rene mette in atto tre diversi processi implicati nella formazione delle urine:

- filtrazione del sangue che attraversa i capillari glomerulari e che porta alla formazione di ultrafiltrato nello spazio di Bowman;
- riassorbimento selettivo dai tubuli renali al comparto vascolare;
- secrezione selettiva dai capillari peritubulari ai tubuli renali (Shirley e Unwin, 2010).

Filtrazione glomerulare e flusso ematico renale

La filtrazione glomerulare è il processo fisiologico, basato sul fenomeno fisico dell'ultrafiltrazione attraverso una membrana, avviene nei glomeruli renali e rappresenta il primo stadio della formazione dell'urina. La barriera di filtrazione agisce come un filtro selettivo per le molecole contenute nel sangue, impedendone il passaggio in base alle dimensioni (raggio superiore a 42 \AA) e alla carica elettrica (anioni). La velocità di questo processo in un individuo, definita appunto velocità di filtrazione glomerulare (o GFR: *glomerular filtration rate*), costituisce un importante indicatore della funzionalità renale. Con questo termine si indica la velocità di filtrazione totale di entrambi i reni e rappresenta la somma della velocità di filtrazione di ogni singolo nefrone. Il numero di nefroni per rene varia in rapporto alle dimensioni dell'animale: il gatto ha circa 200000 nefroni, il cane 500000 (Scott, 2011) mentre l'uomo supera il milione per rene (DiBartola, 2012).

L'ultrafiltrato glomerulare contiene solo lo 0,03% di proteine, mentre acqua e soluti sono in concentrazioni simili a quelle del plasma. La concentrazione non è esattamente identica per l'effetto di Gibbs-Donnan e per le forze di Starling, che subiscono modifiche sostanziali (DiBartola, 2012).

La velocità di filtrazione glomerulare viene così calcolata:

$$\text{GFR} = K_f [(P_{CG} - P_B) - (\pi_{CG} - \pi_B)]$$

K_f è un coefficiente molto variabile e dipende dalla superficie disponibile per la filtrazione e dall'area del letto capillare permeabile ai cristalloidi e all'acqua. Questo coefficiente è più elevato nei capillari glomerulari rispetto ai capillari sistemici, inoltre, può subire modificazioni in base a patologie e a risposte ormonali (DiBartola, 2012).

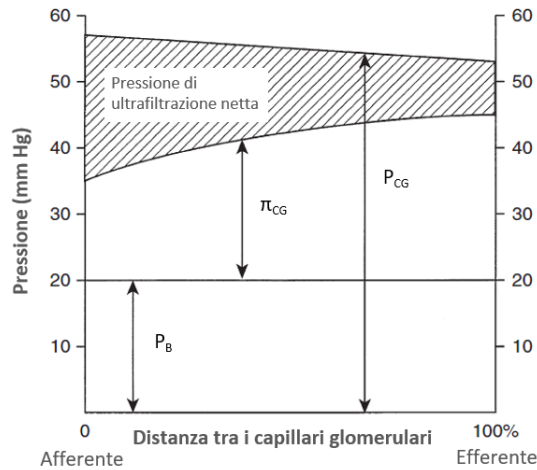
P_{CG} è la pressione idrostatica nei capillari glomerulari, con un valore medio di 55 mmHg, che diminuisce leggermente lungo il tragitto.

P_T è la pressione idrostatica nella capsula di Bowman, con una media di 20 mmHg.

π_{CG} è la pressione oncotica nei capillari glomerulari che ha un valore medio di 20 mmHg.

π_T è la pressione oncotica nello spazio di Bowman, trascurabile in quanto l'ultrafiltrato è un liquido quasi privo di proteine (Pollak *et al.*, 2014).

Figura 1.4: Rappresentazione della generazione della pressione di ultrafiltrazione netta, governata dalle forze di Starling. Modificato da DiBartola, 2012.



Medie dei valori nel cane e nel gatto

P_{CG}	Pressione idrostatica nei capillari glomerulari	52	58
π_{CG}	Pressione oncotica nei capillari glomerulari	20	22
P_B	Pressione idrostatica nello spazio di Bowman	20	18
π_B	Pressione oncotica nello spazio di Bowman	0	0
Pressione di ultrafiltrazione netta		12	18

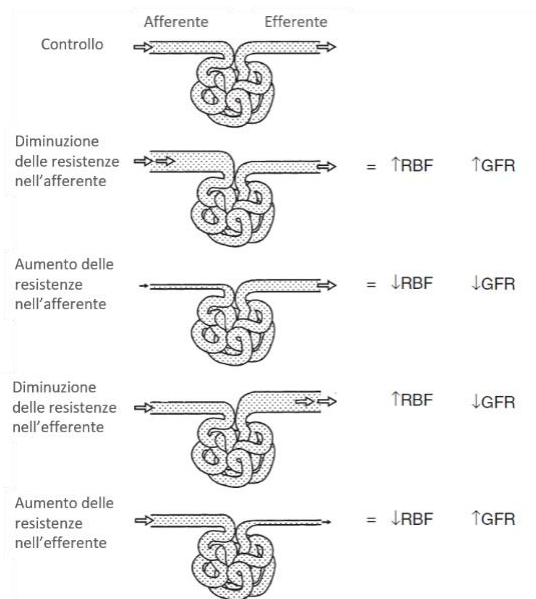
Quindi si può semplificare con:

$$GFR = K_f (P_{GC} - P_T) - \pi_{GC} \text{ e viene espressa in ml/min/m}^2.$$

Il flusso ematico renale (o RBF, *Renal Blood Flow*) è il rapporto tra il gradiente pressorio dei vasi renali e la resistenza vascolare renale totale. I reni ricevono circa il 25% dell'*output* cardiaco attraverso l'arteria renale, la cui pressione è simile a quella sistemica, e la vena renale, la cui pressione è di 3-4 mmHg. Le resistenze vascolari renali sono costituite soprattutto dalle arterie interlobulari, dalle arteriole afferenti e dalle arteriole efferenti. La portata non è omogenea in tutti i settori del nefrone e, ad esempio, nel cane il 90% del RBF arriva alla corticale, meno del 10% raggiunge la midollare esterna e il 2-3% perfonde la midollare interna. Il flusso nella parte interna della midollare è comparabile a quello dei muscoli e questa riduzione della percentuale di perfusione è necessaria per il normale meccanismo di concentrazione

delle urine. Variazioni delle resistenze delle arteriole afferenti portano ad un cambiamento parallelo tra la GFR e il RBF, mentre alterazioni delle resistenze dell'arteriola efferente porta a cambiamenti divergenti della GFR e sul RBF (figura 1.5). Per questo entrano in gioco fattori neuronali e ormonali che cercano di limitare questi leggeri cambiamenti della GFR, da cui possono derivare drastici effetti avversi sul volume e composizione del fluido extracellulare. La capacità intrinseca del rene è quella di garantire un'autoregolazione della pressione di perfusione e di mantenere il RBF. Nonostante una variazione della pressione arteriosa da 80-180 mmHg la GFR e il RBF variano solo di un 10%. Per pressioni arteriose inferiori la GFR declina linearmente con il RBF (DiBartola, 2012).

Figura 1.5: Effetto della regolazione del tono dell'arteriola afferente ed efferente sul RBF e sulla GFR. Modificato da DiBartola, 2012.



L'autoregolazione è possibile grazie a 2 meccanismi: quello miogenico, cioè attraverso l'azione della muscolatura liscia, capace di opporsi alla vasocostrizione/dilatazione. Questo meccanismo si instaura dopo 1-2 secondi. L'altro è rappresentato dal *feedback* tubulo-glomerulare, attivato dall'aumento della concentrazione di cloruro di sodio nel tubulo contorto distale e questo feedback si instaura dopo circa 10-20 secondi. Le resistenze delle arteriole sono regolate dal

Sistema Nervoso Autonomo e da numerosi mediatori (figura 1.6) (Shirley e Unwin, 2010; DiBartola, 2012).

	Stimolo	Effetto su GFR e RBF	
VASOCOSTRITTORI			
Nervi simpatici	↓ VCE	↓	↓
Angiotensina II	↓ VCE	↓	↓
Endotelina	↓ stiramento, angiotensina II, bradichinina, adrenalina	↓	↓
VASODILATATORI			
Prostaglandine (PGE ₁ , PGE ₂ , PGI ₂)	↓ VCE, ↑ stiramento, angiotensina II	NC	↑
NO	↑ Stiramento, acetilcolina, istamina, bradichinina, adenosina trifosfato	↑	↑
Bradichinina	Prostaglandina, ↓ enzima di conversione dell'angiotensina	↑	↑
Peptidi natriuretici (ANP, BNP)	↑ VCE	↑	↑

Figura 1.6. Principali mediatori che influenzano la GFR e il RBF. VCE=volume circolante effettivo (modificato da Koppen e Stanton, 2017).

Riassorbimento e secrezione tubulare

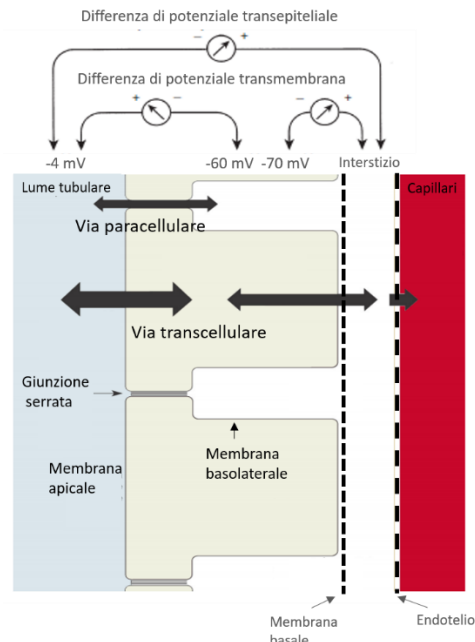


Figura 1.7: Rappresentazione di una cellula epiteliale tubulare renale.

Modificato da DiBartola, 2012.

Le cellule tubulari presentano una membrana luminale che separa il citoplasma della cellula dal fluido tubulare e una membrana basolaterale che separa la cellula dallo spazio intercellulare e dall'interstizio peritubulare. La differenza di potenziale transmembrana si riferisce alla differenza di potenziale elettrico fuori e dentro la cellula e normalmente è di $-60/-70\text{ mV}$. Il potenziale transepiteliale (o transtubulare) rappresentato dalla differenza di potenziale elettrico tra il lume tubulare e l'interstizio peritubulare è di pochi millivolt (circa -4 mV). Queste differenze di potenziale permette il passaggio di soluti carichi e contribuisce al gradiente elettrochimico. Nei primi segmenti del tubulo contorto prossimale il lume tubulare ha carica elettrica negativa rispetto all'interstizio, mentre nei segmenti terminali diventa positiva (DiBartola, 2012; Pollak *et al.*, 2014).

Il passaggio di soluti e acqua può avvenire attraverso la via paracellulare (attraverso le giunzioni cellulari) o per via transcellulare (attraverso il citoplasma della cellula). La via transcellulare è disponibile per il 99% della superficie della cellula e attraverso questa via avvengono i trasporti passivi, attivi e il 90-95 % di trasporto di acqua. Le giunzioni tra le cellule epiteliali renali possono essere deboli/lasse (soprattutto a livello di tubulo prossimale) o serrate (prevalentemente a livello dei tubuli distali o dei dotti collettori). Le prime non generano un importante gradiente di concentrazione transepiteliale, avendo una bassa differenza di potenziale e sono altamente permeabili all'acqua. Le giunzioni serrate o *tight junctions* possono generare un buon gradiente di concentrazione e differenza di potenziale e sono scarsamente permeabili all'acqua (Kriz e Elger, 2010).

Quattro meccanismi di trasporto contribuiscono al riassorbimento tubulare:

- diffusione passiva;
- diffusione facilitata;
- trasporto attivo primario; diffusione attraverso un canale di membrana
- trasporto attivo secondario.

La diffusione passiva è il libero passaggio di una molecola altamente liposolubile attraverso lo strato fosfolipidico o, nel caso di altre sostanze, attraverso canali proteici idrofili. Questo tipo di passaggio dipende dalla permeabilità della membrana, dalla pressione idrostatica e avviene secondo gradiente elettrochimico senza il consumo di energia metabolica (Shirley e Unwin, 2010; DiBartola, 2012).

La diffusione facilitata rappresenta il passaggio di sostanze secondo il gradiente elettrochimico in seguito al legame con specifiche proteine *carrier* di membrana. Il *carrier*, che presenta affinità e specificità per una determinata sostanza, cambia conformazione in seguito al legame con la molecola e la trasporta da un lato all'altro della membrana. Non richiede energia metabolica ma, a differenza della diffusione passiva, è un processo saturabile, come ad esempio il riassorbimento di glucosio e di aminoacidi a livello della membrana basolaterale del tubulo prossimale (Shirley e Unwin, 2010; DiBartola, 2012).

Il trasporto attivo primario è il movimento di sostanze attraverso una membrana che prevede l'utilizzo di *carrier* e avviene contro gradiente elettrochimico; questo processo richiede energia metabolica ricavata dall'idrolisi dell'ATP. Il più importante trasporto attivo è rappresentato dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi presente nella membrana basolaterale delle cellule tubulari, che espelle sodio e porta all'interno della cellula potassio. Questo processo modifica il potenziale in quanto la pompa porta fuori dalla cellula 3 ioni Na^+ e introduce 2 ioni K^+ , eliminando una netta carica positiva. Altri esempi sono rappresentati dalla pompa H^+/K^+ ATPasi presenti nella membrana laterale delle cellule tubulari e la pompa $\text{H}^+/\text{Na}^+/\text{K}^+$ ATPasi presente a livello di membrana luminale delle cellule α intercalate dei dotti collettori (Shirley e Unwin, 2010; DiBartola, 2012).

Il trasporto attivo secondario è il movimento di due sostanze attraverso la membrana dopo legame con un *carrier*. Si definisce co-trasporto se il passaggio delle sostanze avviene nella stessa direzione, mentre si tratta di contro-trasporto quando le sostanze vengono portate in direzioni opposte. Questo processo può avvenire secondo gradiente di concentrazione e non richiedere, in quel caso, l'utilizzo di energia oppure può avvenire contro gradiente di concentrazione. In varie parti del nefrone glucosio, fosfato, aminoacidi, potassio e cloro possono essere co-trasportati con il sodio che entra all'interno della cellula; mentre ioni idrogeno, calcio possono essere contro-trasportati rispetto al sodio (Shirley e Unwin, 2010; DiBartola, 2012).

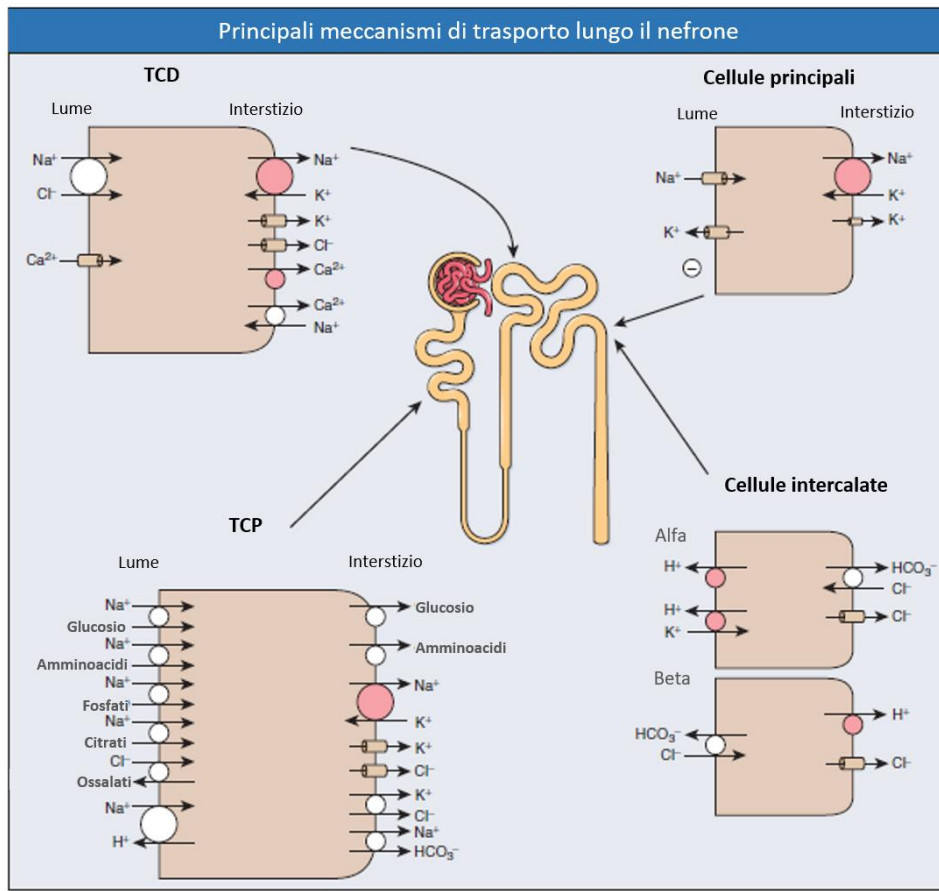


Figura 1.8: Principali meccanismi di trasporto dei soluti nelle membrane basolaterale e apicale delle cellule tubulari in specifici settori del nefrone. I cerchi rossi rappresentano il trasporto attivo primario; i cerchi bianchi rappresentano il trasporto attivo secondario mediato da *carrier*; i cilindri rappresentano i canali ionici.
Modificato da Shirley e Unwin, 2010.

Tubulo contorto prossimale

Il tubulo contorto prossimale (TCP) è caratterizzato dalla presenza, lungo la superficie cellulare apicale, di villi (orletto a spazzola) e da giunzioni cellulari abbastanza deboli. Sulla base strutturale e funzionale il tubulo prossimale è diviso in 3 segmenti (Figura 1.3):

- S1, parte breve iniziale del tubulo contorto prossimale;
- S2, parte rimanente del tubulo contorto prossimale e porzione corticale del segmento largo del tubulo prossimale;
- S3, porzione midollare del segmento largo del tubulo prossimale.

Il tubulo prossimale è il settore che ha la massima capacità di riassorbimento ed è responsabile del riassorbimento di sodio, potassio, cloro, bicarbonato, glucosio, aminoacidi e proteine a basso peso molecolare. Altri soluti vengono in parte riassorbiti a livello di tubulo prossimale: il 60% di calcio, l'80% di fosfato e il 50% di urea. Il tubulo è inoltre permeabile all'acqua (avendo un basso gradiente osmotico) e circa il 65% di quest'ultima viene riassorbita a questo livello. Nella parte terminale S2 e S3 avviene la secrezione di basi e acidi deboli (incluso alcuni diuretici) (Shirley e Unwin, 2010).

Tubulo distale

Il tubulo distale è composto da tre segmenti (figura 1.3):

- il tubulo contorto distale (TCD), dove agiscono molecole tiazido-sensibili;
- il tubulo connettore (TCN), intermediario tra gli altri 2 segmenti;
- la parte iniziale del dotto collettore, che presenta lo stesso epitelio del dotto collettore corticale.

Il tubulo distale, nonostante rappresenti la porzione più corta del nefrone, gioca un ruolo fondamentale nei processi di omeostasi, quali il riassorbimento di cloruro di sodio, la secrezione di potassio e la regolazione di calcio e magnesio. Il TCD riassorbe approssimativamente il 5-10 % del sodio filtrato grazie ai cotrasportatori tiazido-

sensibili (ad es. NKCC) e ai canali del sodio (ENaC) presenti sul versante apicale della cellula. Gli ioni sodio intracellulari vengono estrusi nel fluido peritubulare dalla pompa Na^+/K^+ ATPasi sul versante basolaterale. Questo permette la creazione di una differenza di potenziale negativo (-60/-70 mV). Il potassio entra nelle cellule principali attraverso la membrana basolaterale (pompa Na^+/K^+ ATPasi), mentre la sua fuoriuscita avviene attraverso i canali del potassio, favorita dalla creazione della differenza di potenziale (Subramanya and Ellison, 2014).

Ansa di Henle e meccanismo di concentrazione delle urine

Il principale ruolo dell'ansa di Henle è quello di generare e mantenere un gradiente osmotico interstiziale che va da circa 290 mOsm/kg nella corticale a circa 1200 mOsm/kg nella parte midollare più profonda nell'uomo e può arrivare fino a 2800 mOsm/kg nel cane e 3000 mOsm/kg nel gatto (DiBartola, 2012).

L'ansa di Henle comprende (figura 1.3):

- il segmento largo del tratto discendente del tubulo prossimale (parte spessa dell'ansa discendente o ADS);
- la parte sottile discendente e ascendente (presente solo nei nefroni midollari);
- il segmento largo del tratto ascendente del tubulo distale (parte spessa dell'ansa ascendente o TAL).

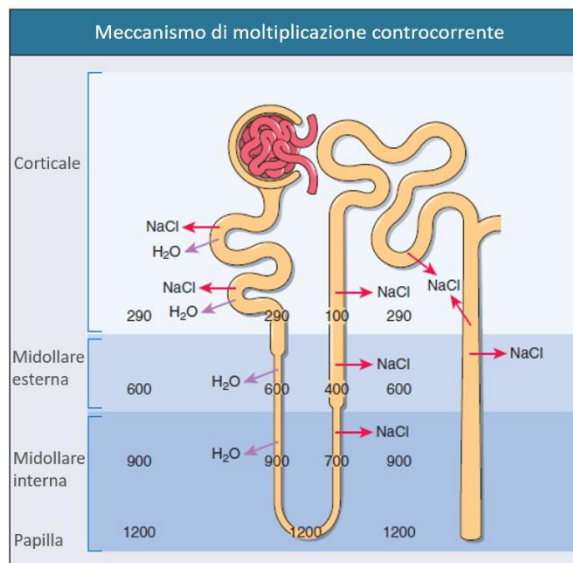


Figura 1.9: Meccanismo di moltiplicazione controcorrente nell'ansa di Henle (es. nell'uomo). Tubulo distale e dotto collettore corticale (impermeabili all'acqua in assenza di ADH): riassorbimento attivo NaCl. Dotto collettore midollare interna (poco permeabile all'acqua e urea in assenza di ADH): riassorbimento attivo NaCl. Modificato da Shirley e Unwin, 2010.

L'elemento chiave della formazione di urina iperosmotica rispetto al plasma è il passaggio, attraverso l'interstizio midollare iperosmotico, di un tubulo (dotto collettore) la cui permeabilità all'acqua può essere regolata dall'ormone antidiuretico (ADH). Il fluido tubulare si mette in equilibrio con l'interstizio iperosmotico, portando alla concentrazione delle urine. L'iperosmolarità della midollare è creata e mantenuta dal meccanismo di moltiplicazione controcorrente, dipendente dall'organizzazione anatomica dell'ansa di Henle e dei vasa recta (capillari peritubulari della midollare renale), che permettono la separazione tra soluti e acqua. Le condizioni che permettono l'iperosmolarità nella midollare sono dovute alle caratteristiche di ogni singola parte del nefrone. Nella parte discendente dell'ansa di Henle (ADS), permeabile all'acqua e in minor misura ad Urea e NaCl, avviene il 25% di riassorbimento di acqua. Nella parte ascendente dell'ansa di Henle e nel TAL (impermeabile all'acqua) avviene il riassorbimento di circa il 40% di NaCl, sia in modo passivo che attivo. Il riassorbimento di soluti causa una progressiva diminuzione della tonicità del fluido tubulare che porta alla presenza di fluido ipotonico nel primo tratto del tubulo distale. Inoltre, l'urea contribuisce al meccanismo di concentrazione delle

urine concentrandosi passivamente nell'interstizio midollare sotto influenza dell'ormone antidiuretico (Scott, 2011).

Il riassorbimento attivo nel TAL avviene attraverso la pompa del sodio nella membrana basolaterale che consente di mantenere una bassa concentrazione di sodio intracellulare, permettendone l'entrata dal lume attraverso il co-trasportatore $\text{Na}^+/\text{2Cl}^-/\text{K}^+$ (NKCC-2) ed in minor misura dalla pompa Na^+/H^+ . L'NKCC-2 è parte unica del nefrone ed è il sito dove agiscono i diuretici di ansa, come il furosemide. Il sodio esce dalla cellule attraverso le pompe del sodio e il cloro e il potassio attraverso i canali e il co-trasportatore Cl^-/K^+ . Il potassio rientra nel lume tubulare attraverso dei canali potassio nella membrana apicale e questo meccanismo è necessario per la creazione di una differenza di potenziale di membrana positivo. Questo è necessario per il funzionamento del NKCC-2, probabilmente perché il potassio è un fattore limitante per il funzionamento (in quanto il potassio è meno concentrato nel tubulo rispetto a cloro e sodio). Inoltre questa differenza di potenziale guida il riassorbimento di sodio attraverso la via paracellulare: per ogni sodio assorbito per via transcellulare, ne viene assorbito uno per via paracellulare. Altri cationi, come il potassio, il calcio e il magnesio, sono riassorbiti per via paracellulare. Il riassorbimento di NaCl nel TAL in assenza di riassorbimento di acqua significa che il fluido tubulare che lascia il segmento è ipotonico, da qui il concetto di urine diluite. La formazione dell'ansa di Henle a U e la differenza di permeabilità della parte discendente e ascendente sono le basi della moltiplicazione controcorrente e la generazione del gradiente osmotico midollare. Il fluido tubulare che entra nell'ansa è isotonico, incontrando l'ipertonicità progressiva dell'interstizio midollare (che determina un riassorbimento di NaCl) tende all'equilibrio osmotico. I fluidi entrano nella parte discendente corticale o l'acqua esce per osmosi dalla parte profonda midollare. Questi eventi determinano un progressivo aumento dell'osmolarità midollare, mentre in ogni livello della parte ascendente dell'ansa l'osmolarità è inferiore dell'ambiente circostante, portando all'arrivo nel tubulo distale di fluidi ipotonici. In assenza di ormone antidiuretico, questi fluidi rimarrebbero ipotonici durante tutto il passaggio attraverso il tubulo distale e il dotto collettore, nonostante

l'ampio gradiente osmotico che favorisce il riassorbimento di acqua. Durante la secrezione massimale di vasopressina, l'acqua è riassorbita secondo gradiente e l'ultrafiltrato diventa isotonico nel dotto collettore corticale e ipertonico nel dotto collettore midollare. Portando alla formazione di un piccolo quantitativo di urine concentrate (peso specifico urinario > 1030) (Shirley e Unwin, 2010; DiBartola, 2012).

CAPITOLO 2

VALUTAZIONE DELLA FUNZIONALITÀ RENALE

In ambito veterinario, una corretta valutazione della funzionalità renale si avvale di esami del sangue, analisi delle urine e diagnostica per immagini. Per effettuare un'iniziale screening, si indaga la perdita della capacità di concentrare le urine e l'aumento della concentrazione di creatinina ed urea sierica; purtroppo questi parametri sono marker insensibili per diagnosticare un danno renale precoce e non riescono a differenziare tra danno glomerulare, danno tubulare prossimale o distale (Pressler, 2013).

Diagnosi di danno renale acuto (*Acute kidney Injury* o AKI) e malattia renale cronica (*Chronic Kidney Disease* o CKD)

Attualmente la diagnosi di compromissione/disfunzione renale viene intrapresa mettendo insieme dati raccolti attraverso:

- l'anamnesi, è estremamente importante raccogliere la storia completa del paziente dalla nascita fino alla presentazione in ospedale. Le domande fondamentali da rivolgere al proprietario riguardano lo stile di vita del paziente, la presenza e il momento di insorgenza di poliuria e polidipsia, il comportamento verso il cibo e il grado di appetito, presenza/assenza di vomito, vitalità del soggetto;
- l'esame fisico, attraverso la visita il clinico deve cercare di individuare segni indicativi di insorgenza acuta o di patologia renale presente da tempo. I segni

da evidenziare riguardano la presenza di ulcere buccali, condizione corporea e muscolare, palpazione renale (dimensioni, forma, localizzazione, eventuale algia);

- la valutazione della pressione arteriosa;
- la valutazione di esami emato-chimici;
- analisi urinari (esame delle urine completi, con proteinuria ed urinocoltura);
- diagnostica per immagini, tramite ecografia addominale per valutare la morfologia di tutto l'apparato urinario. Valutare le dimensioni di entrambi i reni e se si ci sono i segni di deterioramento renale (presenza di fibrosi, riduzione della distinzione cortico-midollare) o infiammazione (pielectasia/idronefrosi), materiale con spot iperecogeni, pareti ureterali ispessite (Bartges and Polzin, 2011).

Nonostante tutti questi elementi rimane difficile capire, in alcune circostanze se il paziente è affetto da un danno renale acuto, se è presente una sottostante malattia renale cronica o se sono presenti entrambi, da cui deriva una diversa prognosi (Palm, 2014). Stabilire la presenza in un paziente veterinario di un danno renale acuto, quindi che si è instaurato da poco tempo (ore o giorni), è ancora un argomento insidioso. Attualmente, le linee guida del gruppo IRIS prevedono la stadiazione in gradi di cani e gatti con AKI, basandosi su misurazioni seriali della concentrazione di creatinina sierica e dell'output urinario (figura 2.1).

AKI GRADING	CREATININA (MG/DL)	DATI CLINICI E CLINICOPATOLOGICI
Grado I	<1,6	AKI non azotemico: - diagnosi di AKI basata su anamnesi, segni clinici, dati di laboratorio, diagnostica per immagini, oliguria/anuria, risposta alla fluidoterapia e/o - aumento progressivo della creatinina all'interno dell'intervallo di riferimento (≥ 0.3 mg/dl) entro 48 ore - oliguria (< 1 ml/kg/h) o anuria nelle 6 ore successive
Grado II	1,7–2,5	AKI lieve: - diagnosi di AKI (come sopra) e iperazotemia stabile o in progressivo incremento - incremento di ≥ 0.3 mg/dl entro 48 ore o risposta alla fluidoterapia - oliguria (<1 ml/kg/h) o anuria nelle 6 ore successive
Grado III	2,6–5,0	AKI moderato/grave:
Grado IV	5,1–10,0	diagnosi di AKI (come sopra) e aumento dell'azotemia, segni clinici di disfunzione o insufficienza renale
Grado V	> 10,0	

Figura 2.1: sistema di *grading* di AKI nel cane e nel gatto. Modificato da www.iris-kidney.com, 2016.

Tradizionalmente i marker di funzionalità renale utilizzati nella diagnosi di AKI sono la misurazione della GFR, difficile da ottenere nella pratica clinica veterinaria, e della concentrazione di creatinina sierica. La misurazione della GFR e della concentrazione di creatinina sierica, inoltre, sono influenzati da numerosi fattori renali e non renali e la creatinina sierica si innalza tardivamente oltre l'intervallo di riferimento, quando si ha la perdita di circa il 75% dei nefroni (Pressler, 2013). Un altro marker clinico utile, ma purtroppo non specifico, nella diagnosi di AKI è la misurazione dell'output urinario in quanto l'oliguria può essere dovuta ad una risposta fisiologica in seguito a chirurgia, traumi, dolore e stress con mantenuta funzionalità renale (Kellum *et al.*, 2015); inoltre, l'oliguria di breve durata (< 4 ore) ha mostrato una ridotta sensibilità e specificità nel predire il danno renale acuto (Prowle *et al.*, 2011). Le classificazioni attuali e i sistemi di *grading* di AKI precludono la possibilità di diagnosticare forme subcliniche di disfunzione e di danno al parenchima renale, per questo motivo negli ultimi tempi è emersa la necessità di diagnosticare precocemente l'AKI tramite l'utilizzo di biomarker (capitolo 3) di danno strutturale, anche in assenza di disfunzione d'organo (Endre *et al.*, 2013).

In medicina umana vengono utilizzati nuovi biomarker, divisi in 5 categorie:

- biomarker di funzionalità, o di filtrazione glomerulare (Cistatina C);
- proteine a basso peso molecolare presenti nella circolazione sistemica che, in condizioni fisiologiche, vengono ultrafiltrate e riassorbite a livello tubulare. La loro presenza nelle urine è indicativa di disfunzione tubulare (Cistatina-C, β 2 microglobulina, α 1 microglobulina, RBP o proteina legante il retinolo);
- enzimi rilasciati dalle cellule tubulari renali nelle urine dopo danno tubulare (N-acetil- β -glucosaminidasi, α -glutazione-S-transferasi, γ GT, pi-glutazione-s-transferasi);
- mediatori infiammatori rilasciati dalle cellule renali o cellule infiammatorie presenti nell'interstizio (IL-18);
- proteine sovra-espresse in risposta a danno tissutale/cellulare (NGAL, KIM-1, L-FABP).

La scoperta e la validazione di nuovi biomarker ha permesso l'introduzione del concetto di AKI subclinico in medicina umana. La valutazione quantitativa di questi marker ha spostato la diagnosi da un piano clinico/biochimico ad un livello molecolare/cellulare (Ronco, 2016).

La prevalenza della CKD nella popolazione canina nordamericana è stimata tra lo 0,5 e l'1,5%, mentre raggiunge l'1-3% nel gatto. La CKD è una malattia irreversibile e progressiva. È caratterizzata dalla riduzione permanente di almeno il 50% della velocità di filtrazione glomerulare (*Glomerular Filtration Rate*, GFR) da un periodo di tre mesi o più. In molti pazienti, dopo la diagnosi si assiste ad un lento e inesorabile declino della funzionalità renale, in altri la patologia decorre in modo subclinico fino ad un precipitoso scompenso (crisi uremica) che può portare ad un esito infausto (Brown, 2007).

È stata messa a punto una classificazione (Figura 2.2) che prevede la suddivisione della malattia renale cronica in quattro stadi (stadiazione IRIS-*International Renal Interest Society*). Tale classificazione si basa principalmente sulla concentrazione sierica di creatinina, valutata in almeno due prelievi effettuati in un paziente stabile e a digiuno.

La CKD può essere, inoltre, sottostadiata in base alla proteinuria e alla pressione arteriosa del paziente (www.iris-kidney.com, 2017).

STADIO	CREATININA (MG/DL)		COMMENTI
	CANE	GATTO	
A RISCHIO	<1,4	<1,6	La storia suggerisce che l'animale è a rischio di sviluppare una malattia renale cronica in futuro a causa di numerosi fattori (ad esempio esposizione a farmaci nefrotossici, razza, alta prevalenza di malattie infettive nell'area e l'età avanzata).
1	<1,4	<1,6	Non azotemici. Presentano altre alterazioni, ad esempio, incapacità di concentrare adeguatamente le urine, palpazione renale o reperti ecografici anomali, proteinuria di origine renale, risultato patologico di biopsia renale, aumento della concentrazione della creatinina sierica in prelievi seriali.
2	1,4 - 2,0	1,6 – 2,8	Azotemia renale lieve. Segni clinici lievi o assenti.
3	2,1 - 5,0	2,9 – 5,0	Azotemia renale moderata. Segni clinici presenti.
4			Aumento del rischio di segni clinici sistemici e di crisi uremiche.

Figura 2.2. Stadiazione IRIS di CKD nel cane e nel gatto. Modificato da www.iris-kidney.com, 2017.

Sfortunatamente la disfunzione renale cronica nel cane e nel gatto è una malattia molto spesso subclinica e con una lenta progressione, difficile da notare durante i primi stadi. Nella pratica clinica, quando il paziente manifesta i sintomi e le principali alterazioni di laboratorio siamo già in un quadro avanzato con la perdita della maggior parte della funzionalità renale. Questo limita i potenziali benefici dovuti alla terapia e al rallentamento della progressione. È, perciò, un obiettivo in nefrologia umana e veterinaria sviluppare/scoprire nuovi biomarker per una diagnosi precoce di CKD (Syme, www.iris-kidney.com, 2017).

BIOMARKER

Cos'è un biomarker? A cosa serve? Perché viene usato? Il gruppo di lavoro sui biomarker della *National Institutes of Health* (NIH) nel 2001 ha elaborato le seguenti definizioni.

Biomarker: una variabile che è oggettivamente misurata e valutata come indicatore di un normale processo biologico, patologico o come risposta farmacologica ad interventi terapeutici.

Endpoint clinico: variabile che riflette come un paziente si sente, come vive e sopravvive.

Endpoint surrogato: rappresenta un biomarker che può sostituire un *endpoint* clinico. Può predire un beneficio clinico (o mancanza di beneficio o danno) basato su evidenze epidemiologiche, terapeutiche o fisiopatologiche.

Alcuni biomarker possono essere considerati come *endpoint* intermedi, definiti cioè come biomarker posizionati nella strada tra l'*interventional endpoint* e l'*endpoint* clinico (Hartung, 2016).

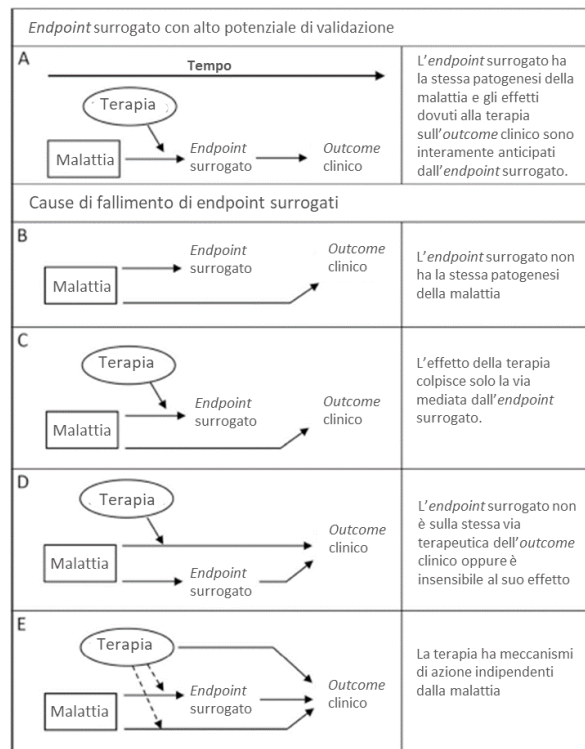


Figura 2.1: Caratteristiche di un *endpoint* surrogato ideale (A), cause di fallimento di *endpoint* surrogati (B-E). Modificato da Hartung *et al.*, 2016.

Nonostante il grande interesse di salute pubblica, in medicina umana il numero di *trial* clinici nefrologici sono relativamente esigui rispetto ad altri campi. Questo è dovuto alla difficoltà in questo ambito di trovare degli *endpoint* clinici. Il biomarker ideale in ambito nefrologico dovrebbe essere in grado di:

- diagnosticare un danno renale in fase precoce;
- localizzare l'insulto renale (glomerulare, tubulare o entrambi);
- differenziare il danno renale in pre-, post- o non renale;
- predirne la gravità;
- monitorare gli effetti del trattamento farmacologico.

Per essere applicabile in ambito clinico, il marker deve essere accurato, facile da misurare e non invasivo per il paziente (De Loo *et al.*, 2013). Attualmente come *endpoint* per la malattia renale cronica si valuta la progressione a stadio finale della

patologia, attraverso la misurazione della concentrazione di creatinina sierica, che può non essere raggiunto per decenni; oppure in corso di AKI si utilizza la valutazione della concentrazione di creatinina sierica, marker poco sensibile e tardivo. Quindi c'è un notevole interesse a ricercare nuovi biomarker che possono servire da biomarker surrogati nella diagnosi di patologie renali. La valutazione di un *endpoint* surrogato può offrire notevoli vantaggi, rispetto al vero *endpoint* clinico, primo su tutti permette di elaborare trial di durata più breve, maggiore *compliance* dei pazienti e minori costi da sostenere (Hartung, 2016).

In medicina veterinaria la misurazione della velocità di filtrazione glomerulare è considerata il *gold standard* per valutare la funzionalità renale ma il metodo è *time-consuming*, invasivo e non facilmente attuabile nella pratica clinica. I principali parametri utilizzati per diagnosticare un danno renale acuto o cronico rimangono la creatinina sierica, l'urea e il peso specifico urinario (Cobrin *et al.*, 2013). Questi ultimi rappresentano dei biomarker tardivi e si rende, perciò, necessario l'utilizzo di altre variabili in grado di determinare precocemente l'insorgenza/instaurarsi di un danno renale.

I biomarker renali possono essere valutati in plasma, siero e/o urine. Ogni matrice ha i suoi vantaggi e svantaggi. Il plasma è facilmente ottenibile anche in pazienti anurici ed è meno incline a contaminazioni batteriche. Tuttavia, cambiamenti delle concentrazioni di biomarker sierici non sono necessariamente collegati a diminuzione della funzionalità renale e possono essere il prodotto di risposte sistemiche. Le urine, d'altro canto, possono essere collezionate in modo non invasivo, contengono un ridotto numero di interferenti proteici e hanno una maggiore specificità per il danno renale indipendentemente dalla patologia sottostante. Per contro, il campionamento di urine è limitato nei pazienti oligo/anurici e biomarker urinari possono essere influenzati dalle variazioni dei meccanismi di concentrazione renale, dal flusso urinario, dallo stato di idratazione del paziente e dall'uso di farmaci (come ad esempio i diuretici). Un recente studio in medicina umana ha valutato la misurazione degli stessi biomarker renali (creatinina, cistatina C, *neutrophil gelatinase-associated lipocalin* o NGAL, *liver fatty acid-binding protein* o L-FABP, KIM-1 e albumina) su siero

e su urine in un *setting* di pazienti con possibile danno renale acuto. Il lavoro ha mostrato che i biomarker plasmatici hanno un miglior potere discriminativo nella valutazione del rischio di sviluppare un danno renale rispetto ai marker urinari; questi ultimi migliorano le loro performance se normalizzati con la creatinina urinaria (Schley *et al.*, 2015). In Medicina veterinaria non esistono lavori a riguardo.

Principali biomarker urinari e plasmatici del cane e del gatto								
Biomarker renali	Sito di produzione	Tipo di proteine/molecole	Matrice	Tipo di biomarker	Validazione/specie	Metodi comuni di misurazione	Indicatori di AKI, CKD o entrambi	Influenze non renali
Creatinina	Muscolo	Derivazione dalla creatina	Siero/ plasma e urine	Marker endogeno indiretto del GFR	Cane e gatto	metodo enzimatico (reazione di Jaffe)	Entrambi	Massa muscolare, dieta iperproteica, stato di idratazione
Cistatina C	Tutte le cellule nucleate	Proteine LMW e inibitori proteinasi	Siero/ plasma	Marker endogeno indiretto del GFR	Cane e gatto	Immunoturbidimetrico (PETIA)	CKD: cane e gatto (+ AKI?)	Obesità e perdita di peso nel cane
SDMA	Tutte le cellule nucleate	Aminoacidi metilati (arginina)	Sangue	Marker endogeno indiretto del GFR	Cane e gatto	Spettrometria di massa e LC-MS/MS	CKD: cane e gatto (+ AKI?)	
FGF-23	Osteociti e osteoblasti	Ormone fosfaturoico	Plasma	Marker di alterato metabolismo del P	Gatto	ELISA	CKD: gatto	Diete iperP, ipertiroidismo
NGAL	Neutrofilii*	Glicoproteine LMW	Siero/ plasma e urine	Marker endogeno indiretto del GFR	Cane	ELISA canino specifico	AKI e CKD: cane	Infiammazione
Proteina C-reattiva	Epatociti	Proteina di fase acuta positiva	Siero/ plasma e urine	Marker infiammatorio	Cane	Metodica immunoturbidimetrica	Renal disease (non specifico)	
Omocisteina	Tutte le cellule nucleate	Aminoacidi: metionina	Sangue	Marker endogeno indiretto del GFR	Cane	Metodo enzimatico	AKI e CKD: cane	Obesità e perdita di peso; ittero, severa emolisi e lipemia
Endotelina 1	Vasi sanguigni, polmoni, rene	Precursore dell'endotelina 1	Sangue	Infiammazione	Cane	ELISA sandwich	CKD: cane	Iperensione e infiammazione sistemica

Figura 2.2: Principali biomarker nel cane e nel gatto. *Neutrofilii, rene, bronchi, stomaco, piccoli intestino, pancreas, prostata, timo. LMW o low molecular weight. LC-MS/MS o liquid chromatography-mass spectrometry. Modificato da Cobrin *et al.*, 2013; Hokamp e Naby, 2016.

Marker endogeni/esogeni sierici di velocità di filtrazione glomerulare

- **Creatinina (sCr)**

La misurazione della concentrazione di creatinina sierica o plasmatica è, in medicina veterinaria, il marker più diffuso e utilizzato di GFR. Ci sono diversi fattori che limitano o rendono difficoltoso l'utilizzo e l'interpretazione nella pratica clinica. La concentrazione di creatinina supera il limite dell'intervallo di riferimento quando si perde il 75% dei nefroni, a cui corrisponde la perdita di funzionalità renale che può variare dal 35% al 60%. Questo differente rapporto tra massa e funzionalità è dovuto al lavoro compensatorio che svolgono i nefroni rimanenti (Hopkamp e Nabity, 2016). Gli ampi intervalli di riferimento derivano in gran parte dalle differenze biologiche nella concentrazione di sCr tra gli individui. Questo parametro presenta un'elevata variabilità individuale nel cane e nel gatto ed è influenzato dall'età, dal sesso e dalla razza nel cane e in minor misura nel gatto (Hopkamp e Nabity, 2016).

La sensibilità di questo marker può aumentare valutandolo in modo seriale nello stesso paziente; in quel caso anche piccoli aumenti della concentrazione di creatinina sierica all'interno dell'intervallo di riferimento possono essere indicatori precoci di danno renale. Questo concetto è stato adottato dall'IRIS *group* per il *grading* del danno renale acuto (AKI) (www.IRIS-Kidney.com, 2016).

Questo parametro è, inoltre, influenzato da fattori non renali, come ad esempio la massa muscolare dell'individuo, che può sottostimare la funzionalità renale in pazienti cachettici, geriatrici, molto giovani o in cani di razza *toy*. Come dimostrato in un recente lavoro di Hall e collaboratori, gatti con più di 15 anni presentano una sCr e una GFR inferiori rispetto a gatti più giovani; quindi, anche disponendo di misurazioni seriali questo parametro non è un marker affidabile di declino della GFR se associato a perdita/ipotrofia muscolare (Hall *et al.*, 2014).

La sCr presenta, inoltre, notevoli variabilità analitiche tra le varie strumentazioni e i diversi laboratori, ciò comporta una notevole imprecisione e possibili *bias* per il clinico (Uleberg *et al.*, 2011).

- **Clearance plasmatica**

La clearance renale di una sostanza è il volume plasmatico che contiene la quota di sostanza escreta nelle urine in un tempo definito e fornisce importanti informazioni sulla funzionalità renale. Se la concentrazione della sostanza nelle urine è U_x e la velocità del flusso urinario è V , la quota di sostanza escreta nelle urine per minuto è $U_x V$. Se la concentrazione della sostanza nel plasma è P_x , il volume di plasma che contiene la stessa quantità di quella sostanza o il volume plasmatico che deve essere filtrato per minuto per raggiungere quella quota nelle urine è $U_x V / P_x$. Quindi,

$$P_x \times \text{GFR} = U_x \times V$$

$$\text{GFR} = U_x V / P_x$$

Attraverso prove di clearance può essere misurata la GFR, ottenendo una stima sufficientemente accurata del suo valore (DiBartola, 2012).

Ci sono diversi metodi validati nel cane e nel gatto per determinare la GFR, la maggior parte di questi riporta il volume di plasma eliminato a intervalli di tempo dati, rapportandolo al peso del paziente espresso in kg (Pressler, 2013). Nello studio di Lippi e collaboratori, il valore della GFR viene espresso in $\text{ml}/\text{min}/\text{m}^2$ in modo da ottenere una valutazione più accurata. Infatti, per cani di piccola taglia, avendo essi una maggiore superficie corporea, si può andar incontro ad una sovrastima della GFR quando la si esprime in $\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$ (Lippi *et al.*, 2008).

Il metodo consiste nella somministrazione di una sostanza esogena che funge da marker, che verrà filtrata a livello glomerulare, non verrà riassorbita o secreta dai tubuli e verrà, infine, eliminata con le urine. La velocità con cui la concentrazione della sostanza diminuisce nei prelievi ematici successivi permette di calcolare la clearance plasmatica e la GFR. Test che permettono di misurare la velocità con cui il marker viene eliminato con le urine sono più accurati rispetto a quelli che valutano la sua scomparsa nel plasma, in quanto solo pochissimi marker vengono filtrati dal glomerulo senza subire processi di riassorbimento o secrezione tubulare. Tuttavia, le analisi urinarie che permettono di calcolare la clearance sono più invasive e *time-consuming* in quanto necessitano di tutte le urine prodotte nell'arco delle 24 ore.

Fortunatamente i test ematici che valutano la clearance plasmatica sono sufficientemente correlati alla clearance renale, quindi nel *setting* clinico il campionamento di urine può non essere necessario (Pressler, 2013).

Differenti marker sono stati validati in medicina veterinaria (Frederic *et al.*, 2002; Finch *et al.*, 2013); in particolare nel cane la GFR può essere valutata mediante:

a) Metodi che sfruttano la clearance urinaria (inulina, creatinina endogena, creatinina esogena)

b) Metodi che sfruttano la clearance plasmatica (inulina, creatinina esogena, ioexolo, ^{99m}Tc-DTPA)

c) Metodo scintigrafico renale (^{99m}Tc-DTPA) (Lippi *et al.*, 2008).

In medicina umana, invece, la GFR viene stimata attraverso una formula che utilizza la concentrazione di creatinina, il peso corporeo e fattori di correzione basati sul genere e sulla razza. Sfortunatamente questa formula non è applicabile in medicina veterinaria a causa della grande variabilità tra gli individui, genere e razza (Pressler, 2013).

- **Symmetric dimethylarginine, SDMA**

Definito dall'*IRIS group* come nuovo marker surrogato di GFR e inserito nelle linee guida della stazione della CKD basandosi sui dati offerti dai laboratori Idexx (www.IRIS-Kidney.com, 2017).

L'SDMA o dimetilarginina simmetrica è un'arginina metilata derivante dalla metilazione intranucleare della L-arginina da enzima metiltransferasi e rilasciata nel circolo ematico dopo proteolisi. Concentrazioni di SDMA sono state ritrovate nel ratto in vari organi (in ordine decrescente), cervello, fegato, polmoni, rene, milza e piccolo intestino ma anche cuore, muscolo, pelle e sangue. L'SDMA è primariamente eliminata attraverso escrezione renale e non sembra essere riassorbita dai tubuli renali, suggerendo un potenziale marker endogeno di GFR. Influenze non renali, consistenti, non sono state identificate nell'uomo sebbene può essere minimamente influenzata dall'obesità, sesso ed età (Hopkamp e Nabity, 2016).

Il primo studio effettuato in medicina veterinaria condotto su 69 gatti con CKD ha mostrato una moderata correlazione tra la sCr e l'SDMA ($r = 0.741$, $P < 0.001$) mentre non ha evidenziato associazione tra quest'ultima e la pressione arteriosa (Jepson *et al.*, 2008). Altri studi effettuati nel gatto ($n=10$) hanno rilevato un aumento dell'SDMA correlato alla diminuzione della GFR. In questo stesso studio l'SDMA si comporta come la sCr in relazione alla GFR, entrambe mostrano una correlazione lineare (Braff *et al.*, 2014). Un altro studio con 21 gatti condotto nel 2014 mostra l'utilità dell'SDMA come indicatore precoce di compromessa funzionalità renale in gatti con CKD rispetto alla sCr. Lo studio mostra una maggior sensibilità dell'SDMA (100%) rispetto alla sCr (17%), ma una minore specificità (SDMA 91% mentre sCr 100%) (Hall *et al.*, 2014). Recentemente è stato pubblicato un lavoro da Peterson e collaboratori su 260 gatti ipertiroidei; in alcuni di questi si è evidenziata un'elevata concentrazione di SDMA che può essere predittiva di sviluppo di iperazotemia dopo il trattamento con radioisotopi per la patologia endocrina. Questo test ha mostrato una buona specificità (97%), risultando così in pochi falsi positivi ma una bassa sensibilità (33%), identificando solo un terzo di gatti ipertiroidei che diventeranno iperazotemici dopo il trattamento. Il dato interessante è che gatti che sono diventati iperazotemici dopo il trattamento con radioisotopi presentavano urine meno concentrate (peso specifico <1.035) prima del trattamento rispetto ai gatti che rimanevano non azotemici (92% contro il 29%) post trattamento (Peterson *et al.*, 2018).

L'SDMA è stata valutata nel cane ($n=12$) per la prima volta nello studio di Nabity e collaboratori che ha messo in luce un progressivo aumento dell'SDMA parallelamente al peggioramento della malattia renale cronica, con forte correlazione con la GFR in cani con malattia renale ereditaria (*X-linked hereditary nephropathy*). Inoltre l'SDMA identificava una diminuzione della funzionalità renale in modo precoce rispetto alla sCr e alla GFR. Mentre la sCr identificava una diminuzione di circa il 50% della funzionalità renale l'SDMA era in grado di identificarne il 30%. L'SDMA risulta essere un test utile per identificare e monitorare la perdita di funzionalità renale nel cane, come marker endogeno di GFR e molto utile in quei pazienti con perdita muscolare massiva, cioè dove la valutazione della sCr può essere sottostimata (Nabity *et al.*,

2015). Uno dei più recenti lavori, effettuato su 22 cani sani, ha dimostrato che l'SDMA e la sCr hanno una variabilità individuale moderata-elevata, portando a falsi negativi in cani con malattia renale precoce; più con la sCr che con la SDMA. Entrambi questi marker presentano evidenti limiti come test di screening con un singolo valore per individuo, enfatizzando l'importanza di monitoraggi seriali (Kopke *et al.*, 2018). Uno studio effettuato su 12 cani con dirofilariosi ha mostrato un aumento significativo dell'SDMA nei cani che presentavano la malattia in stadio più grave rispetto alla sCr (2/6). Tuttavia l'aumento dell'SDMA nei cani con sintomi clinici minori (che mostravano comunque una diminuzione del GFR) non era significativo rispetto al gruppo di controllo (Choi *et al.*, 2017)^a. In cani con malattia mitralica cronica l'aumento dell'SDMA è stato correlato alla gravità dell'insufficienza mitralica e indicava un danno renale precocemente rispetto alla creatinina (Choi *et al.*, 2017)^b. Un altro studio ha valutato 77 cani con AKI e CKD e ha mostrato un aumento significativo di sCr e SDMA rispetto al gruppo di controllo. L'SDMA mostra una buona correlazione con la sCr in cani con CKD, ma non permette la discriminazione tra cani con CKD e AKI; mentre la sCr era significativamente aumentata in cani con AKI rispetto ai CKD (Dahlem *et al.*, 2017).

BIOMARKER RENALI URINARI

Quando biomarker sono quantificati nelle urine la loro concentrazione è spesso espressa come rapporto alla creatinina urinaria o al peso specifico urinario. Esprimere un valore come rapporto presuppone che l'escrezione urinaria di creatinina sia costante in uno stesso individuo e tra gli individui e che queste variabili urinarie e la creatinina siano inversamente proporzionali alla velocità del flusso urinario. Quindi, un aumento o una diminuzione del rapporto marker/creatinina urinari rifletterà un aumento o diminuzione dell'escrezione del biomarker (Hokamp *et al.*, 2016). Tuttavia, secondo la letteratura umana, quando la funzionalità renale è in rapido cambiamento, l'assunto di una costante escrezione renale di creatinina non è corretto e può portare a sovrastima o sottostima del dato. In questo caso si suggerisce, per una valutazione più accurata, la collezione delle urine nell'arco di 24 per stimare la vera concentrazione di creatinina escretata. Per questo motivo è questionabile esprimere una variabile urinaria in rapporto alla creatinina soprattutto durante il danno renale acuto (Waikar *et al.*, 2010). Anche in medicina veterinaria alcuni autori preferiscono non esprimere il biomarker in rapporto, mentre altri usano l'espressione $u\text{Biomarker}/u\text{Creatinine}$ (uX/uCr) (Hokamp e Nabity, 2016).

Scoperta di nuovi biomarker

Le proteine totali urinarie rappresentano l'insieme di proteine plasmatiche filtrate, proteine derivanti dal rene e proteine originate dalle basse vie urinarie. Il processo che porta alla scoperta di nuovi biomarker si basa essenzialmente su due approcci. Nel primo approccio nuovi biomarker renali urinari sono proposti e studiati sulla base della patofisiologia del danno/disfunzione renale. L'alterazione della funzionalità del nefrone può portare alla presenza di grandi quantità di proteine nelle urine. Normalmente la barriera di filtrazione glomerulare esclude il passaggio di proteine con peso molecolare maggiore di 69 kDa, mentre proteine più piccole passano il filtro glomerulare ma vengono riassorbite a livello tubulare (Figura 2.3A). Inoltre, anche la carica delle proteine influenza la filtrazione: proteine cariche positivamente passano il glomerulo più facilmente rispetto a proteine cariche negativamente. Cambiamenti

nella struttura/composizione della barriera o dello stato emodinamico del paziente può comportare una diminuzione della permselectività glomerulare.

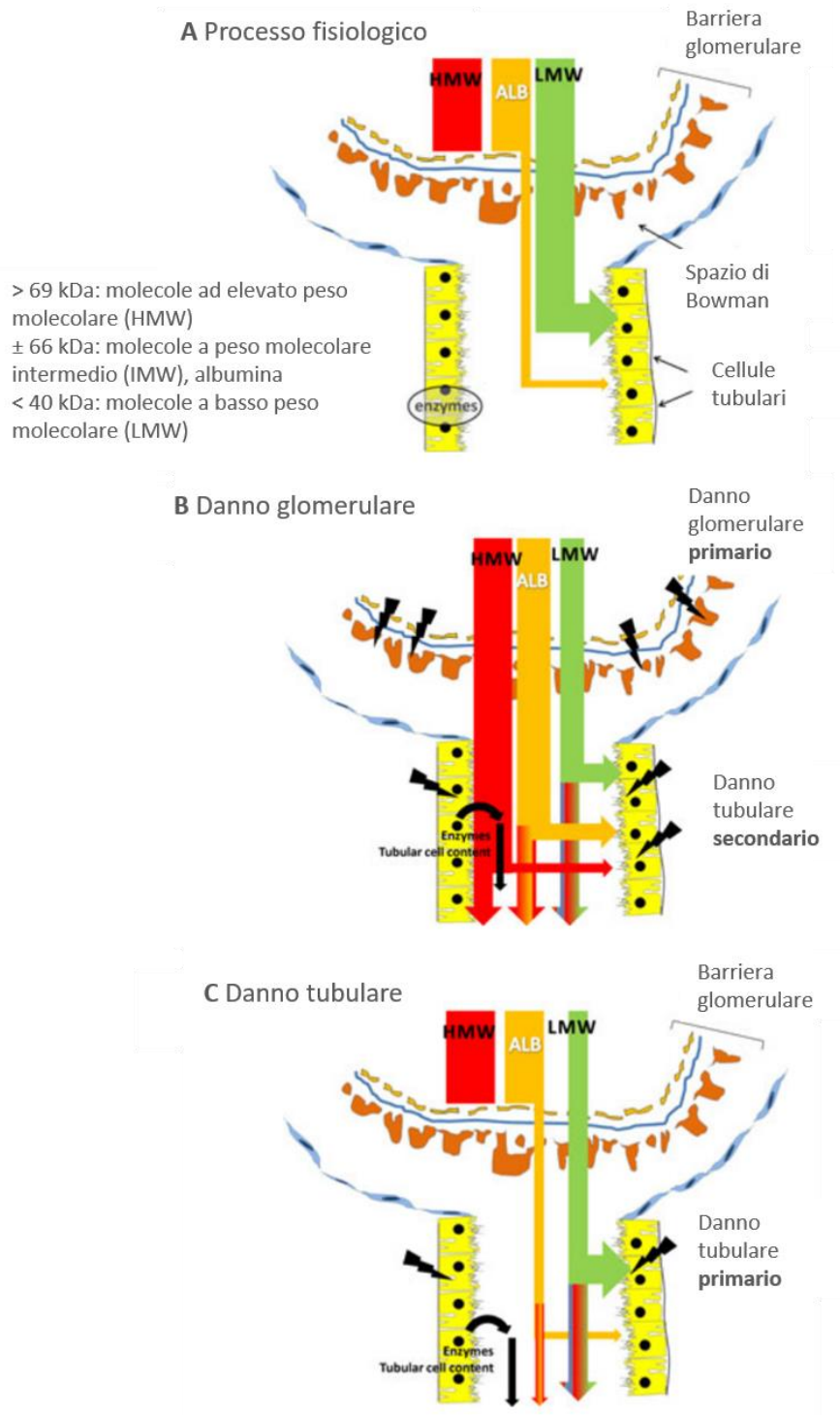


Figura 2.3: modificato da D'Amico e Bazzi, 2003.

Questa disfunzione glomerulare primaria comporta il passaggio di una grande quantità di proteine ad alto ed intermedio peso molecolare nell'ultrafiltrato (Figura 2.3B). Ad un danno tubulare, primario o secondario, consegue un'incapacità dei tubuli a riassorbire completamente le proteine filtrate, determinando la presenza di queste ultime nelle urine (Figura 2.3B e C). L'affinità dei recettori tubulari, Megalina e Cubilina, è specifico per determinate proteine, comportando una competizione per il legame in caso di sovraccarico proteico. Quindi danno glomerulare e tubulare, o misto, possono portare a proteinuria con differente meccanismo. Tutte queste proteine possono essere rilevate misurando il rapporto tra la concentrazione di proteine totali urinarie e la creatinina urinaria, mentre test più sofisticati permettono la loro differenziazione. Il secondo approccio può essere considerato come una ricerca proteomica con l'obiettivo di raggiungere una visione globale di proteine e peptidi nelle urine. Diverse tecniche sono disponibili per questo approccio, come ad esempio l'analisi di spettrofotometria di massa che mira alla creazione di una mappa delle proteine presenti nelle urine, dalla quale si può partire per la ricerca e scoperta di nuovi biomarker di danno renale. Questa strategia è ampiamente utilizzata in medicina umana, ma ancora raramente usata in medicina veterinaria (De Loor *et al.*, 2013).

La misurazione di marker urinari indicativi di patologia renale prevedono l'utilizzo di differenti metodiche analitiche; tuttavia in questa tesi si prendono in considerazione principalmente marker urinari analizzati tramite metodiche utilizzate in chimica clinica, in quanto di uso comune nei principali laboratori di analisi, relativamente poco costose e di rapida esecuzione.

Chimica clinica

La chimica clinica, o biochimica clinica, è un ramo della medicina di laboratorio che si occupa dell'applicazione di tecniche analitiche chimico-strumentali ed immunochimiche per effettuare determinazioni diagnostiche o di routine sui liquidi

biologici (siero, urine, liquido cefalorachidiano). Esistono metodiche di laboratorio particolarmente accurate per la determinazione di specifiche classi di parametri analitici. I più comuni test che vengono effettuati tramite strumentazioni di chimica clinica riguardano i dosaggi di carboidrati, lipidi, enzimi, ormoni, proteine, elettroliti e metaboliti (Bruns *et al.*, 2015).

I sistemi automatici di chimica clinica utilizzano un'ampia varietà di metodiche ottiche, incluse:

- fotometria e spettrofotometria;
- turbidimetria e nefelometria;
- metodi a ioni selettivi.

La fotometria è il processo che determina la quantità di luce assorbita da molecole e viene usata per la stima quantitativa di composti. Le molecole, essendo quantizzate, assorbono solo la luce che ha l'esatta energia che causa transizioni da uno stato energetico all'altro. Ciascuno composto chimico ha una serie propria di livelli di energia quindi assorbirà luce di lunghezze d'onda specifiche producendo qualità spettrali uniche che possono essere usate anche per un'analisi qualitativa che identifica e distingue miscele di molecole non note. In chimica clinica, per quantificare, è necessario conoscere la gamma di lunghezze d'onda assorbite dal composto in esame per generare la migliore sensibilità d'analisi e conoscere l'entità dell'assorbimento della molecola stessa a concentrazioni note. La misura fotometrica viene fatta introducendo nel raggio monocromatico inizialmente una soluzione di riferimento ed in seguito la soluzione della sostanza da esaminare; la differenza fra le due intensità costituisce una misura della trasmittanza del composto, alla lunghezza d'onda alla quale è stata effettuata la detenzione. Lo spettro di assorbimento è la traslazione dei valori dell'intensità dell'energia radiante in funzione della lunghezza d'onda. Per ottenere la concentrazione di una determinata sostanza in soluzione, partendo dai valori di trasmittanza o di assorbanza si possono utilizzare tre metodiche:

- utilizzando la legge di Lambert-Beer;

- confrontando le letture dei campioni con letture standard a concentrazioni note;
- estrapolando la concentrazione da curve di taratura ottenute con soluzioni di riferimento.

Le applicazioni di questa metodica sono le più comuni nei laboratori di chimica clinica; ad esempio per la determinazione di substrati quali glucosio, urea, colesterolo (con metodica *end point*), o per enzimi quali transaminasi, fosfatasi alcalina, LDH (con una metodica che valuta le variazioni di assorbanza nell'unità di tempo) (Boyd and Hawer, 2015).

La turbidimetria è una metodica ottica di analisi che permette di determinare il livello di torbidità di un liquido sfruttando l'assorbimento e la riflessione di raggi luminosi a determinata lunghezza d'onda. Tale metodica viene applicata quando la dimensione delle particelle che provocano torbidità è dell'ordine, o superiore, al micrometro, condizione nella quale l'assorbimento prevale sulla diffusione. Nel caso si abbia a che fare con particelle di più piccole dimensioni, dell'ordine di decine o centinaia di nanometri, prevale l'effetto diffusivo e viene pertanto utilizzata una metodica differente, chiamata nefelometria. Entrambe queste tecniche sono utilizzate per la misurazione della velocità di formazione degli immunocomplessi in vitro e vengono utilizzate per la quantificazione di proteine, antigeni e alcuni farmaci (Kricka *et al.*, 2015).

L'ISE indiretto, o potenziometria indiretta (ISE o *Ion Selective Electrode*, elettrodo ionoselettivo o a membrana) impiega due elettrodi ionoselettivi, dei quali uno agisce come elettrodo di riferimento. Questo sistema viene utilizzato per valutare la concentrazione degli elettroliti, che viene misurata in seguito ad una diluizione del campione con della soluzione tamponata. Il tampone è utilizzato per stabilire un coefficiente di attività costante per gli ioni, calibrando l'elettrodo sui valori di concentrazione. Quando la diluizione viene a contatto con l'elettrodo e ha, quindi, luogo il processo di scambio ionico, si sviluppa una variazione di potenziale dell'elettrodo. Queste variazioni vengono messe in relazione con l'elettrodo di

riferimento. Il potenziale di riferimento consente di calcolare, per mezzo dell'equazione di Nernst, la concentrazione dell'elettrolita (Boyd and Hawer, 2015).

Tra i grossi produttori di analizzatori automatici per il laboratorio vi sono: Abbott Laboratories, Beckam Coulter (ex Olympus), Ortho Clinical Diagnostics, Roche e Siemens.

I vantaggi di eseguire test tramite analizzatori automatici sono: la velocità con cui si ottiene il risultato, il numero di campioni analizzabile per ora, la riduzione dei costi di analisi, la riduzione della variabilità dipendente dall'operatore e l'ottenimento di risultati di qualità (www.beckamcoulter.com).

Marker di disfunzione/danno glomerulare e tubulointerstiziale

- **Proteinuria** (rapporto proteine urinaria/creatinina urinaria o UPC)

La presenza di proteine nelle urine è dovuta ad un danno renale, che può coinvolgere il glomerulo, il tubulo o entrambi (Vaden and Elliott, 2016). In medicina veterinaria è stato evidenziato come la proteinuria rappresenti un fattore prognostico negativo in cani e gatti con malattia renale cronica (Jacob *et al.*, 2005).

I test diagnostici che si possono utilizzare per misurare le proteine totali urinarie sono il dipstick urinario, il test turbidimetrico (SSA, Bumin test) o il calcolo del rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC). Il primo test, ovvero il dipstick, è il più rapido da effettuare e si ottiene un dato grossolano sulla quantità di proteine, principalmente albumine, presenti nelle urine; ma è necessario interpretarlo tenendo in considerazione il peso specifico urinario e il pH. Questa metodica, rispetto alle altre è la meno sensibile e specifica, infatti, si possono avere numerosi falsi positivi (urine alcaline, tempi di reazione prolungati o presenza di contaminanti, come la clorexidina) o falsi negativi (proteinuria di Bence-Jones). La sensibilità del test è del 54% nel cane e del 60% nel gatto; invece la specificità varia dal 69% nel cane al 31% nel gatto (Fry, 2011; Vaden and Elliott, 2016). La presenza di proteine nelle urine può essere stimata anche con il metodo di precipitazione con acido sulfosalicilico (SSA). Questo reagente viene aggiunto ad un pari volume di urine, provocandone l'acidificazione e la conseguente precipitazione. Tale test va sempre interpretato alla luce del peso specifico urinario e non apporta maggiori informazioni rispetto al dipstick urinario, ed è stato quasi abbandonato dai principali laboratori (Vaden and Elliott, 2016).

La proteinuria è classicamente definita come escrezione di più di 15-20 mg di proteine/kg per giorno in cani e gatti sulla base delle urine raccolte nell'arco di 24 ore. Tuttavia il metodo più conveniente per quantificare la presenza di proteine nelle urine è il rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (Nabity, 2011). La determinazione dell'UPC elimina il vincolo di interpretazione legato al peso specifico

urinario e permette di avere un dato relativo alla proteinuria con un solo campione di urina. Le metodiche a disposizione sono molteplici, da metodi immunoturbidimetrici, a metodi turbidimetrici con benzetonio cloruro, a metodi che legano coloranti, come il Coomassie blue ed il rosso di pirogallolo-molibdato. Le ultime due metodiche sono le più utilizzate in medicina veterinaria (Rossi *et al.*, 2016).

Piccole quantità di proteine possono essere ritrovate nelle urine di pazienti sani e il rapporto proteine urinarie/ creatinina urinaria viene considerato patologico quando maggiore di 0,2 nel cane, nella gatta o nel maschio castrato; gatti maschi interi sani, invece, possono raggiungere valori di UPC fino a 0,6 dovuto principalmente all'escrezione di cauxina (Miyazaki *et al.*, 2006).

Un aumento del valore di UPC può essere dovuto a molteplici cause (riassunte in figura 2.3), importante è riuscire ad escludere cause di proteinuria pre-renale e post-renale (Vaden e Elliott, 2016).

Cause di proteinuria nel cane e nel gatto		
Categorie	Meccanismi	Potenziali cause
Prerenale	Maggior passaggio di proteine a basso peso molecolare in un glomerulo normale	<ul style="list-style-type: none"> Emoglobinuria da emolisi intravascolare Mioglobinuria da rhabdmiolisi Catene leggere Ig da mieloma multiplo o linfoma
Renale	Passaggio di proteine plasmatiche causato da una delle seguenti sottocategorie	
Funzionale (fisiologica)	Fisiologia renale alterata in risposta a stress transitori	<ul style="list-style-type: none"> Esercizio estremo Febbre Convulsioni Esposizione a temp estreme
Glomerulare	Alterata permeabilità della membrana basale del glomerulo	Tutte le cause di danno o disfunzione glomerulare (es. ICGN, amiloidosi, glomerulosclerosi)
Tubulare	Alterato riassorbimento tubulare di proteine che sono normalmente nell'ultrafiltrato	Tutte le cause di danno tubulare (es. ATN, sindrome di Fanconi)
Interstiziale	Essudazione di proteine dall'interstizio nel tubulo	Nefrite interstiziale
Postrenale	Essudazione da sangue o siero di proteine nell'apparato urinario o genitale	<ul style="list-style-type: none"> Infezioni del tratto urinario Urolitiasi Carcinoma cell transizionali Vaginiti

Figura 2.3: Categorizzazione delle cause di proteinuria nel cane e nel gatto. Modificato da Vaden e Elliott, 2016.

L'IRIS (International Renal Interest Society) ha raccomandato di sottostadiare cani e gatti con malattia renale cronica in base al valore di pressione arteriosa e di UPC. Uno studio condotto da Nabity et al., raccomanda la valutazione di UPC seriali per stabilire la persistenza di proteinuria, definita come la conferma della presenza di proteine nelle urine in 3 separate occasioni in un arco di tempo maggiore di 2 settimane. Durante il monitoraggio, per valutare una variazione significativa dell'UPC rispetto al valore al tempo zero (quando quest'ultimo è compreso tra 0,5 e 12) deve essere presente un incremento o una diminuzione del 35-80%. Nello stesso studio, inoltre, raccomandano di effettuare la misurazione dell'UPC (in particolare, quando questo è superiore a 4) da 2-3 campioni di urina differente o facendo un *pool* dei campioni,

ottenendo così un valore medio dei 3 giorni (Nabity *et al.*, 2007). Comunemente cani con proteinuria renale e UPC superiore a 2 hanno un danno glomerulare, mentre valori di UPC inferiori a 2 possono essere dovuti sia a danno glomerulare che tubulo-interstiziale (Vaden and Elliott, 2016). Uno studio condotto da Schneider *et al.*, su biopsie renali di 501 cani con sospetto di danno glomerulare ha evidenziato come anche cani con UPC maggiore di 2 (in particolare con valore mediano di 3,9 e range da 0,6 a 8,6) possono avere un danno primario tubulo interstiziale (Schneider *et al.*, 2013).

La concentrazione delle proteine urinarie e della creatinina urinaria non viene influenzata dallo stoccaggio a temperatura ambiente o dal congelamento. Lo stoccaggio a -20° o a -80°C per più di un anno e 3 cicli di congelamento-scongelo possono influenzare lievemente l'UPC senza influenzare l'interpretazione clinica (Théron *et al.*, 2017).

Marker di disfunzione/danno glomerulare

- **Albuminuria** (rapporto albumina urinaria/creatinina urinaria o AUC)

L'albumina, sintetizzata dal fegato, è la proteina più abbondante nel plasma. Le principali funzioni sono quelle di provvedere alla pressione oncotica, di legare e trasportare altre sostanze nel circolo ematico. La barriera glomerulare riesce ad impedire quasi totalmente il passaggio dell'albumina nell'ultrafiltrato, essendo quest'ultima una proteina con peso molecolare intermedio e carica negativa. Inoltre, in situazioni fisiologiche la piccola quantità di albumina che passa il filtro glomerulare viene riassorbita a livello del tubulo prossimale. Danni glomerulari, tubulari o misti determinano il passaggio di grandi quantità di albumina nelle urine. Per questo motivo l'albumina era considerata il primo potenziale biomarker urinario sia nell'uomo che in medicina veterinaria. Si definisce albuminuria quando la concentrazione di albumina urinaria è maggiore a 30 mg/dl, mentre si definisce microalbuminuria quando la concentrazione di albumina urinaria è compresa tra 1 e 30 mg/dl, considerando campioni di urina diluiti ad un peso specifico di 1010. In entrambi i casi il paziente è considerato proteinurico (De Loor *et al.*, 2013). Nel primo caso l'albuminuria può essere evidenziata anche con il semplice utilizzo di un dipstick urinario, mentre metodiche più avanzate sono necessarie per rilevare tracce di albumine nelle urine. Il metodo è stato validato nel cane nello studio di Gentilini *et al.*, e prevede l'utilizzo di una metodica immunoturbidimetrica umana per la misurazione del rapporto della concentrazione dell'albumina urinaria e la creatinina urinaria (Gentilini *et al.*, 2005).

La microalbuminuria è un buon marker di danno glomerulare precoce in cani con nefropatia ereditaria XLHN (*X-Linked Hereditary Nephropathy*), in cani infettati sperimentalmente con *Dirofilaria immitis* e nei Soft Coated Wheaten terrier. Tuttavia ci sono diversi studi che hanno mostrato la presenza di albumina urinaria in cani con

patologie da cause non renali, questionando, così la specificità del parametro per diagnosi di danno renale. Patologie sistemiche possono determinare, infatti, l'attivazione della cascata di citochine urinarie e causare disfunzione endoteliale, che può indurre un aumento della permeabilità capillare alle proteine plasmatiche (De Loor *et al.*, 2013).

- **Immunoglobuline**

Le immunoglobuline sono grandi glicoproteine (150 kDa per le IgG fino a 900 kDa per le IgM) prodotte dalle plasmacellule nella milza, nei linfonodi e nel midollo osseo e sono responsabili dei meccanismi di difesa immunomediata. Il metodo di elezione per valutare la concentrazione di immunoglobuline (IgG e IgM) urinarie è un'Elisa specie-specifico (Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA and Immunology Consultants Laboratories [ICL], Portland, OR, USA) validate nel cane (Maddens *et al.*, 2010; Hokamp *et al.*, 2016); mentre l'unico metodo riportato nel cane per la misurazione di IgA urinarie è il Western Blot (Zaragoza *et al.*, 2003).

Nell'uomo la detenzione di un'alta quantità di IgG urinarie riflette un danno glomerulare come mostrato da D'Amico e Bazzi (D'Amico and Bazzi, 2003). In medicina veterinaria sono pochi gli studi che riguardano la valutazione delle immunoglobuline urinarie come marker di danno renale.

Danno renale acuto (AKI): il rapporto IgG urinarie e creatinina urinaria (ulgG/uCr) in cani sani è inferiore a 3 mg/g ed è significativamente più basso rispetto al rapporto ulgG/uCr evidenziato in cani con danno renale acuto (Maddens *et al.*, 2011). Le IgG urinarie sono state valutate in patologie comunemente riconosciute come causa di AKI, come ad esempio la babesiosi, la leptospirosi ed in corso di piometra mostrando un aumento del rapporto ulgG/uCr (Defauw *et al.*, 2012). Nelle cagne con piometra, dopo ovario isterectomia, si assiste ad una diminuzione del rapporto ulgG/uCr che torna a valori che non differiscono da quelli di cani sani (Maddens *et al.*, 2011). In cani con AKI da morso di vipera, un aumento non significativo dell'UPC, si accompagna ad un importante aumento del rapporto ulgG/uCr avvenuto dalla misurazione *baseline* a quella delle 24 ore (Hrovat *et al.*, 2013).

Malattia renale cronica (CKD): IgG (Raila *et al.*, 2007) e IgM urinarie risultano aumentate in cani con malattia renale cronica. In cani con nefropatia ereditaria XLHN è stato evidenziato un aumento in fase precoce della malattia del rapporto ulgG/uCr mentre lo stesso rapporto permaneva all'interno dell'intervallo di riferimento se misurate in cani sani della stessa età (Vinge *et al.*, 2010; Nabity *et al.*, 2012). In cani con nefropatia XLHN è stato mostrato che il rapporto ulgG/uCr non correlava meglio dell'UPC alla gravità del danno glomerulare, valutata attraverso biopsia, non fornendo, quindi, maggiore utilità in questo tipo di cani. Interessante però è che il rapporto ulgG/uCr aumentava precocemente rispetto all'UPC in cani con nefropatia ereditaria anche se non si è trovata una differenza statisticamente significativa (Nabity *et al.*, 2012). In cani con leishmaniosi un recente studio ha rivelato come dopo trattamento il rapporto ulgG/uCr, valutato come biomarker di danno glomerulare, subisca un significativo decremento (Pardo-Marín *et al.*, 2017).

In uno studio condotto da Hokamp *et al.*, le immunoglobuline urinarie e le loro frazioni d'escrezione (FE) sono state misurate in cani con CKD spontanea per valutare la correlazione tra il biomarker e il tipo di danno renale (glomerulare o tubulointerstiziale) e la loro associazione con la sopravvivenza. La concentrazione di ulgG e FE IgG e la concentrazione di ulgM e FE IgM hanno evidenziato una correlazione positiva con il danno glomerulare basato sulla valutazione istologica attraverso microscopia ottica ed elettronica, simile a quella osservata per l'UPC. La FE IgM in questo studio correlavano moderatamente bene con il danno tubulointerstiziale. Quindi aumenti marcati del rapporto ulgG/uCr (valore mediano 1212 µg/mg) e del rapporto ulgM/uCr (valore mediano 14,6 µg/mg) è stato associato con glomerulonefriti immunomediate (ICGN), mentre livelli inferiori di ulgG/uCr e di ulgM/uCr sono stati osservati in corso di glomerulopatie non immunomediate e tubulopatie primarie. La FE IgM e FE IgG sono state significativamente associate con una maggior velocità della progressione della nefropatia (Hokamp *et al.*, 2016).

Atre patologie: le IgG urinarie sono state valutate in cani con aumento del cortisolo dovuto a cause esogene o endogene. In questi studi si mirava a evidenziare l'eccesso di cortisolo come causa di proteinuria e quindi di alterazione della barriera di

filtrazione glomerulare. In cani Beagle trattati per 24 ore con idrocortisone si è evidenziato un aumento progressivo del rapporto ulgG/uCr e dell'UPC, e concomitante diminuzione degli stessi parametri durante la progressiva diminuzione del dosaggio del farmaco fino all'interruzione (Smets *et al.*, 2012)^a. Un altro studio condotto su cani con iperadrenocorticismo ha mostrato un incremento del rapporto ulgG/uCr rispetto al gruppo di controllo sani, sospettando come anche in questi cani sia presente un danno glomerulare (Smets *et al.*, 2012)^b. Un ulteriore studio è stato condotto in cani trattati con trilostano o ipofisectomizzati per iperadrenocorticismo ACTH-dipendente mostrando un incremento di ulgG/uCr anche 15 volte superiore ai cani post-trattamento. Tuttavia il rapporto ulgG/uCr non rientra nell'intervallo di riferimento in tutti i casi, reperto concorde con la persistenza di proteinuria nel 38% dei cani 12 mesi dopo trattamento (Smets *et al.*, 2012)^c.

Pochi lavori (alcuni non ancora pubblicati) sono stati effettuati in medicina veterinaria su possibili fattori non renali che possono alterare la concentrazione di IgG urinarie e hanno mostrato come la concentrazione di quest'ultime non venga alterata dalla presenza di ematuria/emoglobinuria, piuria o infezioni del tratto urinario (Maddens *et al.*, 2010; Maddens *et al.*, 2011; Smets *et al.*, 2012). Di contro, il rapporto IgG urinarie e creatinina urinaria in cani con CKD proteinurica sembra essere significativamente più alto in cani che presentano ematuria e la FE IgG appare aumentata in cani con piuria o batteriuria rispetto a cani che presentavano un sedimento spento (dati non pubblicati, presentati ACVIM congress 2018 Seattle) (Hokamp and Nabity, 2016). In modo simile anche il rapporto tra ulgM/uCr e la frazione di escrezione delle IgM è significativamente più bassa nei cani sani rispetto a cani con CKD proteinurica spontanea. Inoltre ulgM/uCr e FE IgM risultavano significativamente aumentati in cani con ematuria, piuria e batteriuria (dati non pubblicati Hokamp e Nabity, presentati ACVIM congress 2018 Seattle)(Cianciolo *et al.*, 2016; Hokamp and Nabity, 2016).

- **Proteina C reattiva urinaria**

La proteina C-reattiva è stata la prima proteina di fase acuta positiva ad essere scoperta nel 1981 ed il nome deriva dalla sua capacità a legare l'antigene polisaccaridico C della superficie dei batteri Gram+. Fa parte della famiglia delle pentrassine ed è costituita da 5 subunità, che gli conferiscono un alto peso molecolare (115 kDa). Viene prodotta dal fegato e ha la funzione di legarsi ai patogeni e di attivare la cascata del complemento, portando all'opsonizzazione del battere; inoltre, interagisce con specifici recettori sui fagociti tali da indurre la produzione di citochine anti-infiammatorie e di modulare le funzioni dei granulociti neutrofili. Durante stati infiammatori aumenta rapidamente nel circolo ematico nel cane, mentre nel gatto presenta solo lievissimi incrementi durante gli stati infiammatori e per questo motivo non viene considerata una proteina di fase acuta (Eckersall, 2008). Questa proteina può essere misurata anche nelle urine, rappresentando un marker di danno renale, in quanto normalmente essendo troppo grande non viene filtrata a livello glomerulare. Ne consegue una migliore specificità di danno glomerulare rispetto all'UPC che può essere influenzato anche da alterazioni tubulari. La stabilità della CRP nelle urine è stata valutata recentemente dopo stoccaggio per 4 anni a -70°C. Gli autori sottolineano come questo parametro decade dopo stoccaggio, perdendo il significato clinico di marker di danno glomerulare (Defauw *et al.*, 2017). Uno studio recente condotto su cani proteinurici con diagnosi di Leishmaniosi ha messo in luce, in seguito al trattamento, una riduzione dell'UPC significativa e una diminuzione del 79% del rapporto uCRP/uCr (Pardo-Marin, 2017). Un aumento del rapporto uCRP/uCr è stato evidenziato attraverso metodica ELISA in cani con danno renale secondario a piometra (Maddens *et al.*, 2011) e a colpo di calore (Segev *et al.*, 2015) e anche in cani con CKD (Martinez-Subiela, 2013).

Marker di danno tubulare

- **Frazioni di escrezione degli elettroliti**

Il rene è il primo organo responsabile dell'escrezione-conservazione degli elettroliti a seconda del fabbisogno dell'organismo. Gli elettroliti non legati a proteine vengono liberamente filtrati e possono venire riassorbiti a livello di tubulo contorto prossimale, ansa di Henle o tubulo contorto distale (Capitolo 1). Le frazioni di escrezioni si calcolano, valutando la percentuale di escrezione degli elettroliti in relazione alla concentrazione degli elettroliti sierici, correggendo la formula per la velocità di filtrazione basata sulla concentrazione di creatinina escretata (Brown *et al.*, 2015).

$$\text{Frazione di escrezione (\%)} = \frac{[\text{creatinina}] \text{ sierica} \times [\text{solute}] \text{ urinario}}{[\text{creatinina}] \text{ urinario} \times [\text{solute}] \text{ sierico}} \times 100$$

Sebbene il campionamento delle urine nell'arco di 24 ore è il metodo più accurato per calcolarle, campioni spot e simultanei di urine e sangue mostrano una buona approssimazione clinica della quantità totale di elettroliti escretata (Lefebvre *et al.*, 2008; Pressler, 2013), nonostante alcune variabili, come dieta e ritmo circadiano. In particolare è stato osservato in cani alimentati periodicamente con dieta regolare ogni 12 ore un incremento di circa 1,5 volte della media delle frazioni di escrezione del sodio e del potassio nei campioni post-prandiali del mattino rispetto a quelli della sera (Mochel *et al.*, 2014).

Idealmente cani e gatti in cui si voglia testare la FE di uno o più elettroliti dovrebbero avere uno stato di idratazione adeguato e dovrebbero sottostare ad una dieta controllata. I risultati devono essere inoltre interpretati sulla base della presenza di possibili endocrinopatie che influenzano l'escrezione e il riassorbimento renale dell'elettrolita (es.: un eccesso di paratormone comporta un maggior riassorbimento di calcio ed una maggior escrezione di fosforo; una minor secrezione di aldosterone

si manifesterà con una riduzione del riassorbimento di sodio ed un aumento della perdita di potassio a livello di tubulo contorto distale) e della funzione renale. Nell'iperparatiroidismo secondario a malattia renale cronica, la FE di calcio e fosforo si altera in modo non prevedibile, e in presenza di poliuria il riassorbimento di sostanze è reso più complicato dall'aumentato flusso dell'ultrafiltrato che arriva a livello tubulare (Pressler, 2013).

Nonostante i limiti riportati nella pratica è stata documentata una discreta correlazione tra la FE ottenuta con il metodo spot e la quantità di elettrolita escreta giornalmente e calcolata con metodo clearance nel cane (Brown *et al.*, 2015). Ciò non è invece dimostrato nel gatto (Finco *et al.*, 1997).

Sono solitamente utilizzate nella pratica clinica le FE dei principali elettroliti: Na⁺, K⁺, P⁻, Cl⁻, Ca²⁺, Mg²⁺. Numerosi studi sono stati condotti soprattutto negli anni passati in medicina veterinaria per definire quali fossero i valori di FE da considerarsi normali nella popolazione canina (Lefebvre *et al.*, 2008).

Valori normali della frazione di escrezione dei principali elettroliti (%)		
Elettrolita	Cane	Gatto
Sodio	<1	<1
Potassio	<20	<24
Cloro	<1	<1,3
Fosforo	<39	<73

Figura 2.4: valori delle frazioni di escrezione dei principali elettroliti in cani e gatti con funzionalità renale normale. Modificato da Chew *et al.*, 2011.

In uno studio condotto da Laroute *et al.*, in 20 Beagle sani (10 cuccioli e 10 anziani) hanno mostrato che la FE degli elettroliti è simile nel cucciolo e nel cane anziano, rapportati ai valori dell'intervallo di riferimento (Figura 2.4). Per quanto riguarda la FE del sodio e del potassio sono risultate simili. Ci sono differenze per quanto riguarda il valore medio della FE del cloro (0,54±0.11 - 0.26±0.13) e del calcio (0.24±0.15 - 0.09±0.06) entrambe più alte rispettivamente nel cucciolo rispetto al cane anziano; mentre quella del fosforo (12.0±2.9 - 18.4±7.0) risultata maggiore nel cane anziano rispetto al cucciolo. I tubuli renali nei cani cuccioli sembrano riassorbire più fosforo e

meno calcio dei cani anziani. La concentrazione plasmatica di fosforo nel cucciolo è 2,5 volte maggiore rispetto ai cani anziani, mentre la calcemia è solo il 20% più alta nel cucciolo. La funzionalità renale è età-dipendente e questi cambiamenti sono più marcati nel cucciolo rispetto al cane anziano comparandoli con il cane adulto; da qui la necessità di avere intervalli di riferimento per ogni categoria di età e razza (Laroute *et al.*, 2005). In medicina veterinaria è stato condotto uno studio sui valori di FE degli elettroliti in Greyhound sani, consigliando l'utilizzo di valori diversi per cani di questa razza, quando si vuole indagare un danno tubulare (Bennett *et al.*, 2006).

Valori normali della frazione di escrezione dei principali elettroliti nei cani di razza Greyhound (%)	
Elettrolita	Razza Greyhound
Sodio	< 0,72
Potassio	< 12,2
Cloro	< 0,55
Fosforo	< 16,5
Calcio	< 0,13

Figura 2.5: valori delle frazioni di escrezione dei principali elettroliti in cani di razza Greyhound con funzionalità renale normale. Modificato da Bennett *et al.*, 2011.

Danno renale acuto. L'AKI può determinare alterazioni nella GRF, nella quantità di urine prodotte e nell'escrezione di soluti (tra cui gli elettroliti); questi parametri possono quindi essere potenzialmente utilizzati come marker per valutare la presenza e il decorso della patologia nonché per predire un graduale ripristino della funzionalità renale. Cambiamenti nella capacità di riassorbimento tubulare potrebbero quindi fornire un'indicazione sulla funzionalità tubulare ed essere usati come marker per differenziare un danno pre-renale da un insulto renale o per predire l'*outcome* in corso di AKI (Brown *et al.*, 2015; Troia *et al.*, 2018). Nel 2015 Brown *et al.*, hanno condotto uno studio prospettico osservazionale su una popolazione di 10 cani con AKI intrinseca. In corso di AKI intrinseca la FENa assume valori superiori al 3% e nella popolazione animale oggetto di studio il valore medio all'ammissione era

del 20%; mentre gli animali sopravvissuti hanno mostrato un progressivo calo del valore di FENa, negli animali deceduti la FENa si è mantenuta elevata o ha subito un ulteriore incremento. La FENa potrebbe quindi essere un marker utile per indagare l'eventuale ripristino della funzionalità tubulare e dare indicazioni di *outcome* (Brown *et al.*, 2015). Risultati simili sono stati confermati e ampliati dal nostro gruppo di lavoro prendendo in considerazione una casistica maggiore (135 cani). I cani con AKI intrinseca mostravano frazioni di escrezione maggiori rispetto a quelli con AKI fluido responsiva. Inoltre nei cani non sopravvissuti le frazioni di escrezioni erano significativamente più alte rispetto ai non sopravvissuti, fornendo un ottimo marker di prognosi (Troia *et al.*, 2018).

Una correlazione positiva tra creatinina sierica e FE degli elettroliti (Na^+ , K^+ , Cl^- e Mg^{2+}) è stata dimostrata nello studio di Buranakarl *et al.*, in cani con iperazotemia da danno renale organico. Questo studio suggerisce come la FE degli elettroliti studiati sia un buon indicatore del grado di riduzione della GFR. La FE degli elettroliti risulterà essere tanto maggiore quanto più elevato sarà il danno tubulare, specialmente a livello di tubulo prossimale. Nello stesso studio vi è una correlazione positiva fra il grado di azotemia e la FEMg. Dal momento che i meccanismi coinvolti nella regolazione urinaria di Mg^{2+} sono inferiori rispetto a quelli di Na^+ e K^+ , l'aumento della FEMg si può considerare un buon indicatore del grado di danno tubulo-interstiziale, come dimostrato in medicina umana (Buranakarl *et al.*, 2007).

Malattia renale cronica. La letteratura di medicina umana riporta che l'azione di FGF-23, in corso di CKD, viene ad essere inibita da fattori non ancora completamente noti e la FEP può risultare notevolmente ridotta; la FEP è stata quindi utilizzata come marker oggettivo di resistenza all'azione del FGF-23 (Dominguez *et al.*, 2013; Bech, 2015). Dal momento che si ritiene che la resistenza all'FGF-23 possa contribuire all'aumento del rischio relativo di morbidità e mortalità, Dominguez *et al.*, si sono concentrati sullo studio della FEP come marker della resistenza all'FGF-23. Ciò che emerge da questo studio condotto su pazienti con moderata CKD (stadio 2) è che la FEP può essere indice di un peggior *outcome* renale, considerando che pazienti maggiormente resistenti all'FGF-23 hanno una FEP inferiore e maggior rischio di

andare incontro a patologia cardiovascolare conclamata e morte (Dominguez *et al.*, 2013). In medicina veterinaria, sono state studiate le frazioni escretorie di un gruppo di cani con iperparatiroidismo secondario indotto sperimentalmente. La FEP e la FECa di questi cani tendono ad aumentare con la progressione della malattia. Il motivo dell'aumento della FECa in questi animali deve ancora essere chiarito. Probabilmente potrebbe essere il risultato di un aumento del carico filtrato di calcio a livello dei nefroni residui iperfunzionanti (García-Rodríguez *et al.*, 2003). Le frazioni escretorie potrebbero essere utili nella pratica clinica nello studio della CKD ed in particolare nella diagnosi precoce di iperparatiroidismo renale; possono inoltre essere delle valide indicatrici dell'efficacia della terapia dietetica o del trattamento con i chelanti del fosforo (Chew *et al.*, 2011).

- **Frazione di escrezione dell'urea (FEUrea)**

L'urea è fondamentale per creare il gradiente osmotico alla base dell'ipertonicità midollare; dopo aver svolto questa funzione l'urea sarà secreta nuovamente a livello tubulare e subirà un successivo riassorbimento a livello di dotto collettore grazie all'azione dei trasportatori UT-A3 e UT-A1 e all'azione dell'ADH che ne facilita il recupero (Stockham and Scott, 2008; Bailey *et al.*, 2015). L'urea presenta una dinamica differente dagli elettroliti venendo "riciclata" dal rene attraverso il suo movimento dal lume tubulare all'interstizio renale (Stockham and Scott, 2008).

La FEUrea è stata studiata principalmente in medicina umana; uno studio condotto su 107 pazienti da Vanmassenhove *et al.*, ha messo in evidenza una capacità maggiore della FEUrea rispetto alla FENa nel discriminare AKI intrinseca da AKI volume-responsiva quando valutata dopo aver ristabilito una normale velocità di filtrazione glomerulare (4 ore dopo l'ammissione in ospedale) (Vanmassenhove *et al.*, 2013). In questo studio una FEUrea inferiore al 32% in presenza di una FENa maggiore dell'1% era associata ad un danno tubulare più grave e quindi ad un AKI intrinseca. Questi risultati sono in linea con quelli pubblicati nel 2012 da De Witte e collaboratori in cui un valore di FE urea inferiore al 40% discriminava un danno renale da uno pre-renale (DeWitte *et al.*, 2012). La ridotta escrezione di urea è la conseguenza della riduzione della GFR; il rallentamento del flusso tubulare consente all'urea ultrafiltrata di

diffondere passivamente a livello interstiziale e di essere recuperata; la quantità di urea eliminata sarà quindi inferiore e la FEUrea assumerà valori inferiori al 30% (Vanmassenhove *et al.*, 2013).

- **Gamma Glutamil Transferasi (GGT) urinaria**

La gamma-glutamil transpeptidasi è localizzata a livello delle cellule epiteliali tubulari prossimali e può essere individuata nelle urine, durante un danno tubulare. A causa della sua instabilità, necessita di una valutazione immediata dopo la sua raccolta e di conseguenza ne limita l'utilità pratica. È un marcatore conosciuto da tempo ed è stato studiato nel cane in corso di AKI indotta sperimentalmente mediante la somministrazione di gentamicina. L'aumento di GGT è stata documentata fin dal primo giorno mentre la creatinina sierica è aumentata al settimo giorno dall'inizio dello studio. Questo studio indica la GGT come marcatore precoce del danno tubulare (Greco *et al.*, 1985). In tempi più recenti la valutazione della presenza di enzimi urinari, come ad es. la GGT è stata rivalutata nella diagnosi di AKI mostrando diversi limiti (DeLoor *et al.*, 2013).

Gli studi sulla GGT urinaria mostrano un incremento precoce delle concentrazioni di questo enzima prima dell'aumento della creatinina sierica, tuttavia i valori si sovrappongono in gruppi di cani sani, in AKI e con CKD. Gli studi pubblicati non ne raccomandano l'uso come test di *screening* in corso di AKI per il non soddisfacente potere discriminatorio del marker (Cobrin *et al.*, 2013; Nivy *et al.*, 2017). Risultati incoraggianti sono emersi dallo studio di Lippi *et al.*, nell'utilizzo del rapporto uGGT/uCr come marker di AKI. In questo studio stabiliscono un *cut off* per uGGT/uCr di 54,3 con 85,7% di sensibilità e 89,1% di specificità, ribadendo la necessità di un'attenta interpretazione in cani che presentano sottostante CKD o patologie delle vie urinarie inferiori (Lippi *et al.*, 2018).

In un lavoro condotto su cani con CKD stadio I IRIS e leishmaniosi non hanno dimostrato variazioni significative delle GGT urinarie pre e post trattamento, a fronte di significativo decremento di marker di danno glomerulare. Gli autori si sono spiegati questo risultato considerando le GGT un marker di danno tubulare (Pardo-Marín *et al.*, 2017). Uno studio ha correlato l'utilizzo di GGT urinarie come marker di danno

tubulare associandolo all'elettroforesi SDS PAGE. Ha evidenziato come valori del rapporto uGGT/uCr maggiori di 0,81 potevano identificare un danno renale con componente tubulare mentre valori di uGGT/uCr maggiori di 2,64 individuavano cani con proteinuria tubulare (Ibba *et al.*, 2016). In un altro studio condotti su cani leishmaniotici ha evidenziato una diminuzione del rapporto uGGT/uCr in 8 dei 10 cani arrolati nello studio ed in 3 di questi il valore è rientrato nei limiti della normalità. Questi risultati indicano che la maggior parte dei cani che rimangono proteinurici dopo trattamento presentano un persistente danno glomerulare. Questo suggerisce che all'ammissione questi cani presentavano anche proteinuria di origine tubulare, che a volte può persistere anche in cani responsivi al trattamento (Paltrinieri *et al.*, 2018).

Il gruppo di lavoro di Crivellenti *et al.*, ha evidenziato l'aumento di GGT urinarie in Beagle avvelenati con oleandro non nefrotossico, in assenza di alterazioni istologiche. La misurazione delle GGT urinarie può esitare in un falso positivo e questo deve essere tenuto in considerazione nell'interpretazione di questo marker (Crivellenti *et al.*, 2014).

CAPITOLO 3

OBIETTIVI DELLO STUDIO

Lo studio presentato è di tipo prospettico osservazionale ed è costituito da tre parti. I cani inclusi sono selezionati sulla casistica di pazienti afferenti all'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'*Alma Mater Studiorum*-Università di Bologna. La prima parte costituisce l'analisi di variabili cliniche e clinico-patologiche di una popolazione di cani sani. La seconda parte tratta l'analisi di una popolazione di cani con danno renale acuto (AKI), già pubblicata in una rivista internazionale (Troia *et al.*, 2018). La terza parte prende in considerazione variabili cliniche e clinico-patologiche di una popolazione di cani con malattia renale cronica nei diversi stadi e confronta quest'ultima con i pazienti sani e con danno renale acuto.

Prima parte:

- determinare gli intervalli di riferimento della frazione escretoria dei diversi elettroliti (Na, K, Ca, P, Cl, Mg), di alcuni analiti (Urea e acido urico) e del rapporto analita/creatinina urinaria in cani sani.

Seconda parte:

- raccogliere i dati epidemiologici, clinici e di laboratorio di una popolazione di cani con AKI, con particolare riferimento a segnalamento, anamnesi, tipo di patologia associata ad AKI, sintomi clinici rilevati, risultati di indagini clinico-patologiche, produzione urinaria;
- valutare il potenziale diagnostico (pazienti sani Vs pazienti con danno renale acuto), prognostico (pazienti sopravvissuti Vs deceduti) e di caratterizzazione del danno renale (pazienti affetti da AKI-intrinseca Vs AKI-volume responsiva) di variabili cliniche e clinico-patologiche specifiche in corso di AKI nel cane, con particolare riferimento alla frazione escretoria di elettroliti e urea;

- valutazione dell'applicabilità clinica e del significato prognostico di un sistema di stratificazione dei pazienti critici in relazione alla gravità della patologia elaborato per la specie canina (*Apple Fast score*), e del sistema di gradazione per l'AKI proposto per gli animali d'affezione (*IRIS grading*) all'ammissione in clinica (www.iris-kidney.com).

Terza parte:

- raccogliere i dati epidemiologici, clinici e di laboratorio di una popolazione di cani con CKD stabile, con particolare riferimento a segnalamento, anamnesi, sintomi clinici riportati dal proprietario, risultati di indagini clinico-patologiche, terapia effettuata;
- valutare il potenziale diagnostico, prognostico e di caratterizzazione del danno renale di variabili cliniche e clinico-patologiche specifiche in corso di CKD nel cane, con particolare riferimento alla frazione escretoria di elettroliti e urea;
- confrontare i risultati delle indagini eseguite con una popolazione di cani sani e cani con danno renale acuto.

MATERIALI E METODI

ANIMALI SANI

Nello studio sono stati selezionati cani clinicamente sani, di proprietà di privati o studenti o personale del Dipartimento che su base volontaria hanno acconsentito ad effettuare test di screening, ai fini dello studio. Il gruppo di cani oggetto di studio ha compreso anche alcuni soggetti facenti parte del gruppo di cani donatori di sangue. I soggetti inclusi sono stati sottoposti a visita clinica con raccolta anamnestica e esame fisico diretto. Sono stati, inoltre, eseguiti esami ematochimici completi ed urinari (chimico-fisico, sedimento e profilo chimico urinario), previo digiuno di almeno 12 ore.

I soggetti per essere inclusi nello studio dovevano possedere le seguenti caratteristiche:

- normale stato di salute sulla base dei dati anamnestici, dell'esame fisico diretto e degli esami collaterali eseguiti;
- regolarmente trattati per ecto ed endoparassiti;
- non dovevano assumere farmaci;
- avere un'età compresa tra 1 e 10 anni.

Sono stati esclusi dallo studio soggetti che sulla base dell'esame clinico o degli esami clinico patologici avessero evidenziato una patologia sottostante, come per esempio soggetti con sospetto di IBD, epatopatie, malattia renale cronica, allergie, etc.

CANI CON DANNO RENALE ACUTO

I soggetti sono stati definiti come "affetti da AKI" sulla base dei risultati di segnalamento, anamnesi, esame fisico diretto, esami ematochimici, analisi urinaria comprendente la valutazione del sedimento urinario a fresco, e diagnostica per

immagini. Nello specifico, sono stati considerati i seguenti criteri: esordio acuto (<7 giorni) di sintomatologia suggestiva di AKI (es. depressione del sensorio, vomito, anoressia, oligo/anuria) associata a creatinina sierica > 1,4 mg/dl e/o oliguria (produzione urinaria <1ml/kg/h per più di 6 ore dopo adeguata fluidoterapia) in analogia con quanto riportato da Cowgill e collaboratori all'interno del gruppo IRIS (www.iris-kidney.com).

CANI CON MALATTIA RENALE CRONICA

I soggetti sono stati definiti come “affetti da CKD” sulla base dei risultati di segnalamento, anamnesi, esame fisico diretto, esami ematochimici, analisi urinaria e diagnostica per immagini. Questi pazienti al momento dell'inclusione si presentavano in un buon stato clinico, compatibilmente con la patologia, e con degli esami clinico-patologici in linea con i precedenti.

Criteri di esclusione dei pazienti con patologia renale (AKI e CKD)

Sono stati esclusi dalla popolazione di studio AKI e CKD animali con almeno una delle seguenti condizioni:

- sospetto di danno renale “acuto su cronico” (AKI su CKD) sulla base di segnalamento, anamnesi, esame fisico diretto, esami ematochimici precedenti, analisi delle urine e diagnostica per immagini;
- evidenza di condizioni associate a nefropatia post-renale (es. ostruzione del tratto urinario);
- patologie concomitanti in grado di impattare significativamente sul quadro clinico del paziente (es. cardiopatie in stadio avanzato, ipoadrenocorticism, neoplasia).

VALUTAZIONI CLINICOPATOLOGICHE, METODICA DI PRELIEVO

E PROCESSAZIONE DEI CAMPIONI

Su ciascun paziente incluso, al momento dell'ammissione e nei tempi prestabiliti, sono stati eseguiti campionamenti di sangue e urine per valutazioni ematochimiche, emogasanalitiche e urinarie.

Metodica di prelievo sangue

I prelievi di sangue sono stati eseguiti attraverso un sistema a vuoto VACUTEST kima srl[®] e, quando possibile, sono state raccolte:

- un'aliquota di sangue in K₃-EDTA;
- una o più aliquote di sangue senza anticoagulante, con gel separatore, per ottenere il siero;
- un'aliquota di sangue con litio eparina.

Il sangue raccolto in K₃-EDTA con provette VACUTEST[®] è stato processato entro un'ora dal prelievo per l'esecuzione dell'**esame emocromocitometrico**. Tale esame è stato ottenuto utilizzando il sistema per ematologia *Automated Hematology System ADVIA[®] 2120*, (Siemens). Prima delle determinazioni analitiche, i campioni in K₃-EDTA sono stati sottoposti ad agitazione tramite Vortex (Reamix 2789). I parametri valutati sono stati: eritrociti (RBC/mm³), valore ematocrito (Hct%), emoglobina totale (Hgb g%), volume corpuscolare medio (MCV fl), contenuto medio di emoglobina (MCH pg), concentrazione corpuscolare media di emoglobina (MCHC g%), ampiezza della distribuzione eritrocitaria (RDW), leucociti totali (WBC/mm³), piastrine (PLT/mm³), volume piastrinico medio (MPV), conta reticolocitaria assoluta. Gli strisci di sangue eseguiti a fresco e colorati con *May-GrünWald-Giemsa* (Merk[®]) sono stati esaminati al microscopio al fine di valutare la morfologia eritrocitaria, la morfologia e la formula differenziale leucocitaria, la stima e la morfologia piastrinica nonché l'eventuale presenza di aggregati.

Il sangue raccolto in provette da siero (VACUTEST® con “Gel and clot activator”) è stato immediatamente posto in termoblocco (THERMOBLOC, FALC) a 37°C e lasciato per 30 minuti. La separazione del siero è stata ottenuta attraverso centrifugazione per 10 minuti a 3000 × g.

Il siero è stato utilizzato per l’esecuzione di un **profilo chimico** comprendente alanina transaminasi (ALT), aspartato transaminasi (AST), fosfatasi alcalina, creatinina, urea, fosforo, glucosio, bilirubina totale, gamma-glutamyl transferasi (GGT), colesterolo, proteine totali, albumina, rapporto albumina/globuline, calcio, sodio, potassio, cloro, magnesio e acido urico. Tutte le determinazioni sono il risultato di metodiche installate sull’analizzatore automatico OLYMPUS/Beckman Coulter AU 480.

Il sangue raccolto con provetta apposita Monovette® 1ml LH Blood gas, destinato all’**emogasanalisi**, viene analizzato entro 15 minuti dal prelievo impiegando l’emogasanalizzatore Radiometer ABL800.

Tutte le misurazioni sono state eseguite presso i laboratori del Servizio di Patologia Clinica del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell’*Alma Mater Studiorum* - Università di Bologna.

Metodica di prelievo e analisi delle urine

I prelievi di urina sono stati eseguiti tramite minzione spontanea, cistocentesi e cateterismo urinario. Il peso specifico urinario dei campioni di urina è stato misurato tramite un refrattometro (*American Optical*), calibrato giornalmente con acqua distillata.

Per valutare il pH, le proteine, il glucosio, i corpi chetonici, la bilirubina, i leucociti e l'emoglobina presenti nei campioni sono stati utilizzati dei dipstick. Il dipstick è una metodica semiquantitativa utilizzata di routine nella pratica veterinaria e in medicina umana. Le strisce reattive utilizzate sono le *Combur 10Test, Roche Diagnostic*. Il test prevede la disposizione di una goccia di campione tramite micropipetta sui tamponi assorbenti della striscia reattiva. In pochi secondi avviene la reazione colorimetrica. Per eliminare gli errori di lettura operatore-dipendenti, per la lettura della variazione

colorimetrica è stato utilizzato uno strumento che sfrutta la fotometria a riflessione (*Urisys 1100® Analyzer, Roche Diagnostic*).

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

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

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

Quando necessario è stato eseguito l'esame batteriologico.

Con le matrici di surnatante urinario invece, si è proceduto alla misurazione della chimica urinaria comprendente Glucosio (uGlu), Urea (uUrea), Creatinina (uCreatinina), Acido Urico (uAcido Urico), GGT (uGGT), Calcio (uCa), fosforo (uP), Magnesio (uMg), Sodio (uNa), Potassio (uP), Cloro (uCl), Proteine Totali (uTP), rapporto Proteine urinarie/Creatinina urinaria (UPC). Sono state successivamente calcolate le frazioni escretorie degli elettroliti, dell'urea, dell'acido urico e sono stati, inoltre, i rapporti degli elettroliti con la creatinina urinaria (uCa/uCreatinina, uCl/uCreatinina, uK/uCreatinina, uNa/uCreatinina, uP/uCreatinina, uMg/uCreatinina) e il rapporto uAcido Urico/uCreatinina, uGlucosio/uCreatinina, uGGT/uCreatinina e uCreatinina/sCreatinina.

Proteine totali urinarie (uTP)

Le proteine totali urinarie sono state misurate con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Urinary/CSF protein, OSR 6170). Tale metodica è di utilizzo in routine da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come "metodo al rosso di pirogallolo".

Principio del test

Il rosso di pirogallolo si combina con il molibdato per formare un complesso rosso con un'assorbanza massima a 470 nm. Il test è basato sulla variazione nell'assorbimento che si verifica quando il complesso rosso di pirogallolo-molibdato lega gli aminogruppi basici delle molecole proteiche dando origine a un complesso blu-porpora con un'assorbanza massima a 600 nm. L'assorbanza di questo complesso è direttamente proporzionale alla concentrazione di proteina nel campione.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione

Reagente R1	Rosso di pirogallolo 47 µmol/l Molibdato di Na 320 µmol/l Acido succinico 50 mmol/l Benzoato di Na 3,5 mmol/l Ossalato di Na 1,0 mmol/l Metanolo 0,8% w/v	Conservazione: 2-8 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni
Calibratore	OLYMPUS SYSTEM CALIBRATOR Sieroalbumina umana 0,5 g/l	Conservazione: 2-8 °C fino a 7 gg 15-25 °C a 2 gg
Controllo	Controllo Sentinel diagnostics Dropper Level 1 e 2	Conservazione: 2-8 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperto 90 giorni

Tabella 3.1. Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione delle proteine totali urinarie.

Linearità e sensibilità analitica

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

Interferenze

Interferenze inferiori al 10% per:

Bilirubina 0,3 mmol/l.

Glucosio 277 mmol/l.

Acido urico 18 mmol/l.

Creatinina sierica e urinaria

La creatinina (sierica e urinaria) è stata misurata con metodica Olympus (Olympus System Reagent – Creatinine, OSR 6178). Tale metodica è di utilizzo in *routine* da diversi anni in medicina umana e veterinaria ed è nota come “metodo di Jaffé”.

Principio del test

La Creatinina forma un composto giallo-arancio con acido picrico in un mezzo alcalino. La variazione nell'assorbanza a 520-800 nm è proporzionale alla concentrazione di creatinina nel campione.

Creatinina + acido picrico = complesso di picrato e creatinina.

Reagenti, controllo di qualità e calibrazione della creatinina

Reagente R1 e R2	Idrossido di sodio 120 mmol/l Acido picrico 2,9 mmol/l Conservante	Stabili tra 2 e 8 °C a confezione integra fino a data di scadenza; aperti per 14 gg
Calibratore	Olympus System Calibrator Cat. n° 66300	Stabile tra 2 e 8 °C fino a 7 gg; tra 15 e 25 °C per 2 gg
Controllo	Controlli Olympus Cat. n° ODC0003 e ODC0004	Stabili tra 2 e 8 °C fino a 7 gg; tra 15 e 25 °C per 2 gg

Tabella 3.2. Reagenti, controllo qualità e calibrazione della creatinina.

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni di creatinina comprese tra 0,06 e 25 mg/dl. Il metodo applicato sulle urine è lineare tra 1 e 400 mg/dl. La concentrazione minima rilevabile usando le impostazioni per il siero è di 0,027 mg/dl.

Interferenze

Ittero: interferenze inferiori al 10% fino a 40 mg/dl di bilirubina aggiunta.

Emolisi: interferenze inferiori al 3% fino a 5 g/l di emoglobina aggiunta.

Lipemia: interferenze inferiori al 10% fino a 600 mg/dl di lipidi (Intralipid®) aggiunti.

Proteine: interferenza inferiore al 6% tra 3 e 10 mg/dl di proteine aggiunte.

Rapporto proteine urinarie/creatinina urinaria (UPC)

L'UPC è stato calcolato attraverso la formula seguente:

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

Elettroliti (Na, K, Cl)

Per la determinazione degli elettroliti è stato utilizzato il modulo ISE (Ise reagents/ standards, 66320, 66319, 66318, 66317, 66316, 66315, 66314, 66313).

Principio del test

Il modulo ISE per Na⁺, K⁺ e Cl⁻ utilizza degli elettrodi a membrana di etere corona per la determinazione del sodio e del potassio e una membrana in PVC a struttura molecolare per la determinazione del cloro, che risultano essere specifici per ogni ione di interesse nel campione. Un potenziale elettrico viene sviluppato secondo l'equazione di Nernst per un determinato ione. Quando confrontato a un riferimento interno, questo potenziale elettrico viene tradotto in tensione e quindi nella concentrazione di ioni del campione.

Conservazione e stabilità dei reagenti

I reagenti e gli standard sono stabili a confezione integra, fino alla data di scadenza indicata, se conservati a una temperatura compresa tra 2 e 25 °C. In seguito all'apertura della confezione, se conservati ad una temperatura compresa tra 2 e 25°C, rimangono stabili secondo la seguente tabella:

ISE buffer	2 mesi
ISE Mild Standard	1 mese
ISE Reference	2 mesi
ISE Low Serum standard	90 giorni
ISE High Serum Standard	90 giorni
ISE Low/high Urine Standard	90 giorni
ISE Na ⁺ /K ⁺ Selectivity Check	90 giorni

Tabella 3.3. Tempo di conservazione dei reagenti dopo apertura della confezione

Campione

È necessario evitare l'uso di campioni emolizzati e altamente lipemici, in quanto il potassio dei globuli rossi diffonde nel siero/plasma dando luogo a risultati erroneamente elevati. È necessario separare immediatamente il siero o il plasma dalle cellule mediante centrifugazione e rimuoverlo al termine del processo. Dato che una notevole quantità di lipemia provoca pseudoiponatriemia, i campioni fortemente lipemici devono essere sottoposti a ultracentrifugazione.

Stabile nel siero/plasma come indicato qui di seguito:

- cloruro: 7 giorni se conservato ad una temperatura compresa tra 2 e 25°C;
- potassio: 6 settimane se conservato ad una temperatura compresa tra 2 e 25°C;
- sodio: 2 settimane se conservato ad una temperatura compresa tra 2 e 25°C.

Stabilità nelle urine:

- cloro: una settimana se conservato a temperatura compresa tra 2 e 25°C;
- potassio: 2 mesi se conservato a una temperatura compresa tra 2 e 8°C oppure 45giorni se conservato a una temperatura tra 15-25°C;
- sodio: 45 giorni se conservato a una temperatura tra 2-25°C.

Linearità

Il modulo ISE è lineare nei campioni di siero, plasma come indicato nella tabella seguente:

Nelle urine:

Na	10-400 mmol/L
K	2,0-200 mmol/L
Cl	15-400 mmol/L

Interferenze

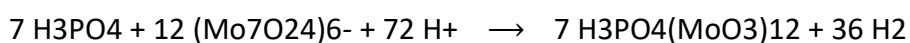
Alcuni anticoagulanti, conservanti, farmaci e composti organofilici possono alterare le determinazioni degli elettroliti.

Fosforo

Per la determinazione del fosforo inorganico viene utilizzato un test fotometrico UV di tipo quantitativo (Olympus Systems- Inorganic Phosphorous, OSR 6122, OSR 6222).

Principio del test

Il fosforo inorganico reagisce con il molibdato per formare un complesso eteropoliacido. L'uso di un surfattante elimina la necessità di preparare un filtrato privo di proteine. L'assorbanza a 340/380 nm è direttamente proporzionale alla concentrazione di fosforo inorganico nel campione.



Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni

Reagente 1	Acido solforico 200 mmol/L
Reagente 2	Ammonio eptamolibdato 0,35 mmol/L
Reagente 3	Glicina 50 mmol/L
Calibratore	System Calibrator Cat. n. 66300
Controllo	Controls Cat. n. ODC0003 e ODC0004
Conservanti e reagenti	Confezione integra: 2-8 C fino alla data di scadenza Confezione aperta: stabili fino a 30 giorni
Conservazione campione	2-8 C per 4 giorni; 15-25 C per un giorno

Tabella 3.4. Reagenti, controllo di qualità e calibrazioni per la determinazione del fosforo inorganico.

Linearità e sensibilità analitica

Il metodo è lineare per concentrazioni di siero comprese tra 0,32 – 6,40 mmol/L (1 – 20 mg/dL). Il metodo è lineare per concentrazioni di urina comprese tra 0-113 mmol/L (0-350 mg/dL).

Si stima che il livello minimo rilevabile nel siero sia di 0,10 mmol/L, nelle urine di 0,48 mmol/L.

Il livello minimo rilevabile rappresenta il livello misurabile più basso di fosforo inorganico che si possa distinguere da zero. Viene calcolato come la media assoluta più tre deviazioni standard di 20 replicati di un campione privo di analita.

Interferenze

Su siero:

- ittero - interferenza inferiore al 3% fino a 40 mg/dL o 684 $\mu\text{mol/L}$ di bilirubina;
emolisi - interferenza inferiore al 10% fino a 3,5 g/L di emoglobina;
- lipemia - interferenza inferiore al 10% fino a 800 mg/dL di Intralipid.

Sulle urine:

- ittero - interferenza inferiore al 3% fino a 40 mg/dL o 684 $\mu\text{mol/L}$ di bilirubina;
- emolisi – interferenza inferiore al 5% fino a 5 g/L di emoglobina.

In rari casi la gammopatia, in particolare di tipo IgM monoclonale (Macroglobulinemia di Waldenstrom), può causare risultati non attendibili.

Calcio Totale

La determinazione quantitativa di calcio totale nel siero e nelle urine 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 bicompativamente 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 (1-5 mmol/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

Su plasma:

- 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.

Sulle urine:

- ascorbato – interferenza inferiore al 3% fino a 50 mg/dL di ascorbato;
- magnesio – interferenza inferiore al 3% fino a 4 mmol/L di magnesio.

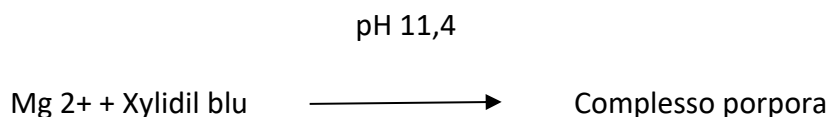
Magnesio

La determinazione quantitativa del Magnesio presente nel siero e nelle urine è stata eseguita mediante l'uso di un test colorimetrico fotometrico (Magnesium OSR6189).

Principio del test

Il reagente Olympus Magnesium utilizza un metodo diretto in cui gli ioni Magnesio formano un complesso colorato con xylidil blu in una soluzione fortemente basica. Il colore prodotto viene misurato biocromaticamente 520/800 nm ed è proporzionale alla concentrazione di Magnesio nel campione. L'interferenza di calcio viene eliminata con acido glicoletilendiammino tetracetico (GEDTA).

Principio della reazione



Reagenti

ε-Acido aminocapronico 450 mmol/L

Tris 100 mmol/L

Acido glicoleterdiammino-N,N,N,N tetracetico 0,12 mmol/L

Xylidil blu 0,18 mmol/L

Conservazione

Il reagente è stabile a confezione integra fino alla data di scadenza indicata, se conservato a temperature comprese tra 2 e 8°C. Una volta aperta la confezione, il reagente conservato nello strumento è stabile per 14 giorni.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni di siero e plasma comprese tra 0,2-3,3 mmol/L (0,5-8,0 mg/dL).

Il metodo è lineare per concentrazioni di urina comprese tra 0,2-9,25 mmol/L (0,5-22,5 mg/dL).

Interferenze

Risultati degli studi su siero condotti per valutare la suscettibilità di interferenza del metodo adottato:

- ittero - interferenza inferiore al 10% fino a 28 mg/dL o 479 umol/L di bilirubina;
- calcio - interferenza inferiore al 3% fino a 30 mg/dL o 7,5 mmol/L di calcio;
- emolisi – interferenza inferiore al 10% fino a 1,5 g/L di emoglobina;
- lipemia – interferenza inferiore al 10% fino a 500 mg/dL di Intralipid.

I risultati degli studi con urina condotti per valutare la sensibilità del metodo alle sostanze interferenti sono stati i seguenti:

- calcio – interferenza inferiore al 10% fino a 40 mg/dL o 10 mmol/L di Calcio

Urea

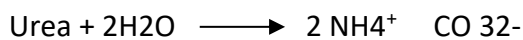
Il test per la determinazione quantitativa di urea è un test UV cinetico.

Principio del test

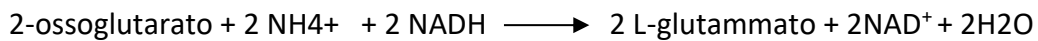
L'urea viene idrolizzata in presenza di acqua ed ureasi per produrre ammoniaca e anidride carbonica. L'ammoniaca prodotta nella prima reazione si combina con 2-ossoglutarato e NADH in presenza di glutammato deidrogenasi (GLDH) per produrre glutammato e NAD⁺. La diminuzione nell'assorbanza di NADH per unità di tempo è proporzionale alle concentrazione di urea.

Principio della reazione

ureasi



GLDH



Reagenti

Soluzione tampone Tris	100 mmol/L
NADH	≥ 0,26 mmol/L
Difosfato tetra sodico	10 mmol/L
EDTA	2,65 mmol/L
2-ossoglutarato	≥ 9,8 mmol/L
Ureasi	≥ 17,76 kU/L
ADP	≥ 2,6 ,mmol/L
GLDH	≥ 0,16 kU/L
Conservante	

Conservazione

I reagenti sono stabili a confezione integra, fino alla data di scadenza indicata, se conservati a una temperatura compresa tra 2 e 8°C. Una volta aperta la confezione, i reagenti conservati nello strumento sono stabili per 30 giorni.

Linearità

Il metodo è lineare per concentrazioni di siero e plasma comprese tra 0,8-50 mmol/L (5-300 mg/dL).

Il metodo è lineare per concentrazioni di urina comprese tra 10-750 mmol/L (60-4500 mg/dL).

Interferenze

I risultati degli studi sul siero condotti per valutare la sensibilità del metodo alle sostanze interferenti sono stati i seguenti:

- ittero- interferenza inferiore al 10% fino a 20 mg/dl o 342 umol/L di bilirubina;
- emolisi- interferenza inferiore al 10% fino a 2,5 g/L di emoglobina;
- lipemia- interferenza inferiore al 3% fino a 500 mg/dL Intralipid.

I risultati degli studi con urina condotti per valutare la sensibilità del metodo alle sostanze interferenti sono stati i seguenti:

- ittero – interferenza inferiore al 3% fino a 40 mg/dL o 684 umol/L di bilirubina;
- emolisi – interferenza inferiore al 3% fino a 5 g/L di emoglobina;

Acido Urico

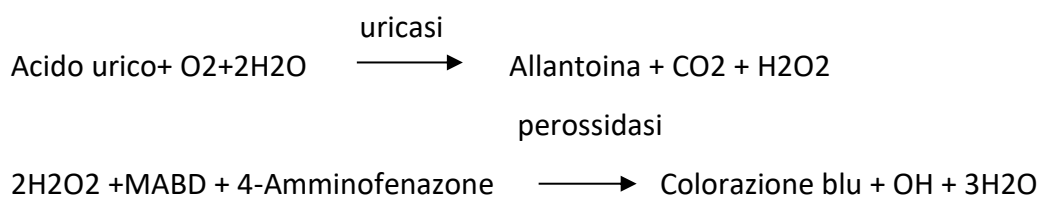
La determinazione quantitativa dell'acido urico nel siero e nelle urine è stata eseguita mediante un test colorimetrico enzimatico (URIC ACID OSR6098, OSR6198, OSR 6298).

Principio del test

L'acido urico viene convertito dall'uricasi in allantoina e perossido di idrogeno. Per misurare la quantità di H₂O₂ viene fatto ricorso alla reazione di Trinder.

L'H₂O₂ che si forma reagisce con la N N-bis(4-solfo-butil)-3,5-dimetilanilina, sale bisodico (MABD) e il 4-amminofenazone in presenza di per ossidasi, portando alla formazione di un cromoforo, che viene rilevato mediante biocromotografia a 660/800 nm. La quantità di colorante formatosi è proporzionale alla concentrazione di acido urico presente nel campione.

Principio della reazione



Reagenti

Tampone fosfato (pH 7,5) 42 mmol/L

MABD 0,15 mmol/L

4-Amminofenazone 0,30 mmol/L

Perossidasi $\geq 5,9$ kU/L (98 ukat/L)

Uricasi

Ascorbato ossidasi

Conservazione

In confezione chiusa, i reagenti sono stabili fino alla data di scadenza indicata, se conservati a 2-8°C. Una volta sullo strumento rimangono stabili per 30 giorni.

Linearità

Il test è lineare per concentrazioni comprese tra 89-1785 $\mu\text{mol/L}$ (1,5-30 mg/dL) per siero e plasma. Il test è lineare per concentrazioni comprese tra 119-23800 $\mu\text{mol/L}$ (2-400 mg/dL) per l'urina.

Interferenze

I risultati degli studi condotti su campioni di siero per valutare la sensibilità del metodo alle sostanze interferenti sono stati i seguenti:

- ascorbato – interferenza inferiore al 5% fino a 20 mg/dL di ascorbato;
- ittero – interferenza inferiore al 5% fino a 40 mg/dL o 684 μmol di bilirubina non coniugata; interferenza inferiore al 10% fino a 20 mg/dL o 342 $\mu\text{mol/L}$ di bilirubina coniugata;
- emolisi – interferenza inferiore al 5% fino a 5 g/L di emoglobina;
- lipemia – interferenza inferiore al 5% fino a 1000 mg/ DL di Intralipid;

I risultati condotti su campioni di urina per valutare la sensibilità del metodo alle sostanze interferenti sono stati i seguenti:

- ascorbato – interferenza inferiore al 5% fino a 50 mg/dL di ascorbato;

In casi molto rari, la gammopatia, specialmente se IgM (macroglobulinemia di Waldenstrom), può causare risultati non affidabili.

Frazione di escrezione urinaria:

la frazione di escrezione urinaria di Na, Cl, K, Mg, Ca, P, urea e dell'acido urico è stata calcolata secondo la formula:

$$\text{Frazione di escrezione (\%)} = \frac{[\text{creatinina}] \text{ sierica} \times [\text{solute}] \text{ urinario}}{[\text{creatinina}] \text{ urinario} \times [\text{solute}] \text{ sierico}} \times 100$$

Sodio e potassio

Gli elettroliti sono stati misurati attraverso l'utilizzo di un modulo ISE standard inserito sull'analizzatore per chimica clinica OLYMPUS AU 400. Il modulo ISE impiega elettrodi a membrana di etere a corona per sodio e potassio, specifici per ogni ione di interesse nel campione. Un potenziale elettrico viene sviluppato secondo l'equazione di Nernst per ogni determinato ione. Quando confrontato ad un riferimento interno, questo potenziale elettrico viene tradotto in tensione e quindi nella concentrazione di ioni del campione.

ANALISI STATISTICA

PRIMA PARTE

I dati ottenuti sono stati analizzati attraverso statistica descrittiva ed espressi come media e deviazione standard o mediana e range. La distribuzione dei dati è stata valutata graficamente e attraverso l'utilizzo di test di normalità (Shapiro-Wilk test). Le distribuzioni di tipo *double sided* sono state separate da quelle *right sided*. Gli intervalli di riferimento sono stati ottenuti utilizzando il metodo *Robust*, quando possibile, sia in caso di distribuzione non parametrica sia in caso di distribuzione normale, sia in caso di distribuzioni *double* o *right sided*. La presenza di *outlier* è stata valutata graficamente o tramite il test di Tukey.

SECONDA PARTE

I dati ottenuti sono stati analizzati attraverso statistica descrittiva, ed espressi come media, mediana e range (valore minimo e massimo). La distribuzione dei risultati è stata valutata graficamente mediante test di normalità (Kolmogorov-Smirnov test). Le variabili cliniche e clinico-patologiche oggetto di studio sono state confrontate tra i gruppi (Sani Vs AKI; Sopravvissuti Vs Non sopravvissuti; Sani Vs AKI-volume responsiva Vs AKI intrinseca) mediante statistica non parametrica (Mann Whitney U Test, Kruskal Wallis ANOVA). I risultati del confronto tra gruppi sono stati rappresentati mediante Box and Whiskers plot; i punti terminali dei box definiscono il valore minimo e massimo, mentre la linea entro i box il valore mediano. La frequenza di morte all'interno delle variabili categoriche è stata confrontata mediante il test del Chi-quadrato o il Fischer exact test. L'analisi dei fattori di rischio per lo sviluppo di AKI intrinseca è stata valutata tramite analisi di regressione logistica univariata e multivariata. Per tutte le analisi effettuate i risultati sono stati considerati statisticamente significativi per un valore di $P < 0,05$.

TERZA PARTE

I dati ottenuti sono stati analizzati attraverso statistica descrittiva, ed espressi come media, mediana e range (valore minimo e massimo) in base alla distribuzione della popolazione. La distribuzione dei risultati è stata valutata graficamente mediante test di normalità (Shapiro-Wilk test). Le variabili clinico-patologiche oggetto di studio sono state confrontate tra i vari stadi IRIS CKD e tra sani, CKD e AKI mediante statistica non parametrica (Kruskall Wallis ANOVA). I risultati del confronto tra gruppi sono stati rappresentati mediante Box and Whiskers plot; i punti terminali dei box definiscono il valore minimo e massimo, mentre la linea entro i box il valore mediano. Le variabili che sono risultate statisticamente differenti tra le varie popolazioni sono state confrontate utilizzando l'analisi della *Receiver Operating Characteristic (ROC) curve*, per valutarne la capacità discriminatoria tra cani con malattia renale cronica e danno renale acuto.

I dati sono stati elaborati utilizzando i seguenti programmi: Microsoft Excel e MedCalc Statistical Software versione 15.6.1 (MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2015).

CAPITOLO 4

RISULTATI

PARTE PRIMA - CANI SANI

Dati epidemiologici

Il gruppo di soggetti inclusi in questo studio è costituito da una popolazione eterogenea per età, sesso, peso e razza. Sono stati selezionati 115 cani. L'età minima rilevata è pari a 13 mesi, l'età massima è di 121 mesi, mentre la mediana è di 41 mesi. Il peso medio dei pazienti sani è di 23,5 kg, quello mediano è di 24,9 kg con un range da 3 a 78 kg. La popolazione è composta da 64 femmine (54%), di cui 31 intere e 33 sterilizzate e da 55 maschi (46%) di cui 40 interi e 15 castrati (Figura 4.1).

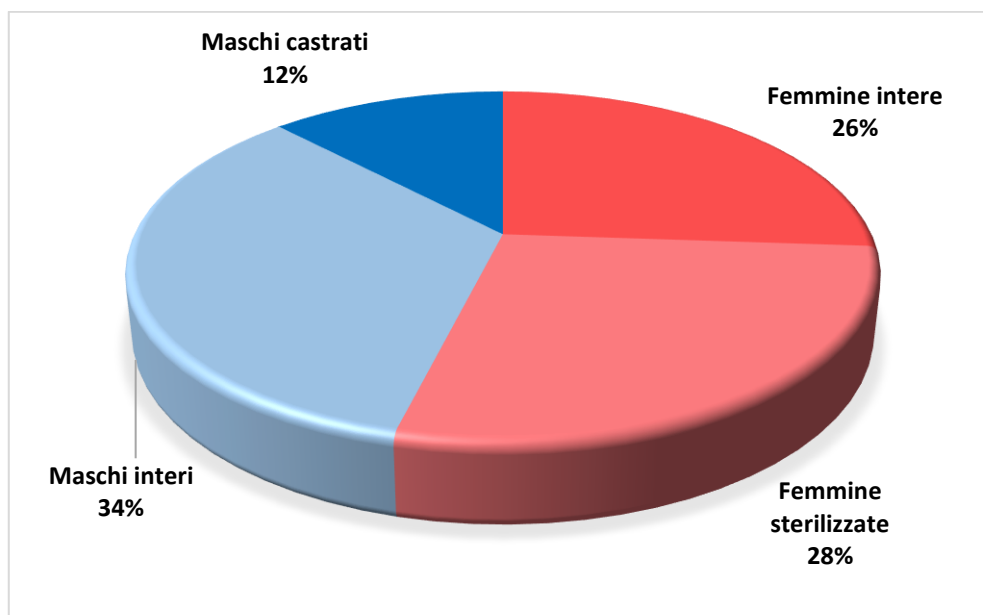


Figura 4.1: rappresentazione della distribuzione del sesso nella popolazione di cani sani.

La popolazione di studio è costituita per il 51% (59/115) da cani meticci e il restante 49% (56/115) da cani di razza, in particolare: 6/56 Labrador Retriever (5%) e 4/56 Pastori tedeschi (3,4%). Quando il numero di rappresentanti per ciascuna razza è risultato minore al 3% queste sono state accorpate nel gruppo “altre razze” in cui sono presenti 46 cani (40,6%), come rappresentato in Figura 4.2.

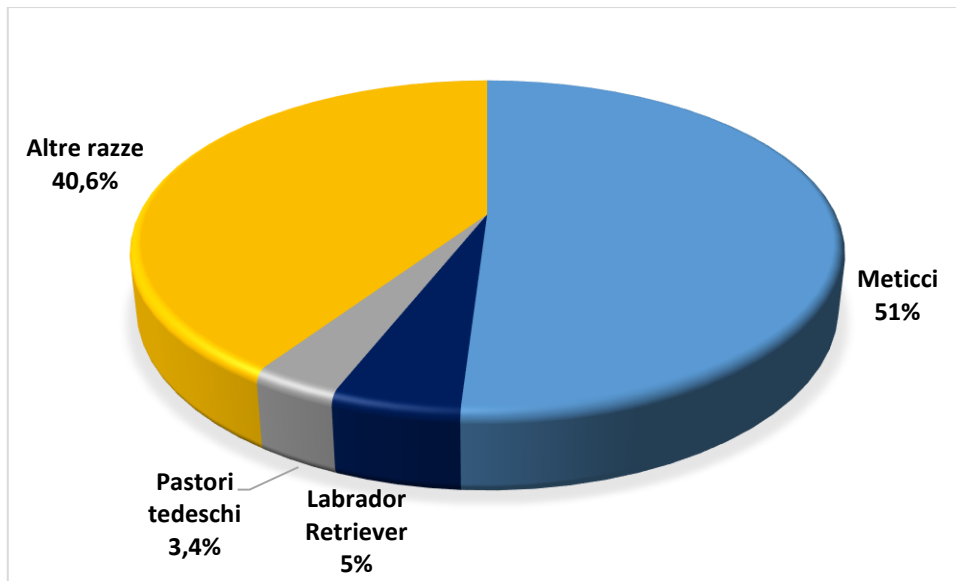


Figura 4.2: Rappresentazione grafica della distribuzione delle razze della popolazione di studio.

Dati clinico-patologici

I risultati dei parametri relativi a emogasanalisi (Figura 4.3), esame emocromocitometrico (Figura 4.4) e profilo chimico sierico (Figura 4.5) sono riportati nelle tabelle seguenti.

	N	Media	DS	Mediana	Minimo	Massimo	IR	DN
pH	107	7,34	0,04	7,34	7,2	7,4	7,39 – 7,44	0,0293
pCO² (mmHg)	107	41	6,6	41	27	63	33,6 – 41,2	0,0395
HCO₃ (mol/L)	107	21	2,2	21	16	28	20,8 – 24,2	0,0927
Ca ionizzato (mmol/L)	106	1,30	0,06	1,32	1,10	1,41	1,22 – 1,35	<0,0001
Anion Gap (mmol/L)	107	9,6	3,6	10,2	-3,1	19,3	9,0 – 22,0	0,0695
Base excess (mmol/L)	106	-3,0	2,1	-3,0	-7,7	4,0	-2,0 – 2,0	0,1984
Cl⁻ (mmol/L)	107	117	2,8	117	110	124	108 – 118	0,0053
Na⁺ (mmol/L)	107	144	2,2	145	138	151	143 – 154	0,0150
K⁺ (mmol/L)	107	4,0	0,2	4,0	3,3	4,6	3,9 – 5,3	0,1047

Figura 4.3 – Risultati dell'emogasanalisi venosa nella popolazione di cani sani. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

	N	Media	DS	Mediana	Minimo	Massim o	IR	DN
Hct (%)	113	49,7	4,7	49,2	36,0	60,7	37 -55	0,3564
Hgb (gr%)	113	17,0	1,6	16,9	12,6	20,6	12 -18	0,4228
Eritrociti (mm³)	113	725575 2	726961	7120000	554000 0	9670000	5500000 – 8500000	0,2227
RDW (%)	113	12,3	0,6	12,3	11,1	14,6	13,0 – 15,7	0,0206
MCV (fL)	113	68,6	2,9	68,6	56,8	74,7	60 – 77	0,0252
MCH (pgr)	113	23,6	1,4	23,6	20,0	34,7	19,5- 24,5	<0,0001
MCHC (gr%)	113	34,3	0,7	34,3	32,8	36,6	32 – 38	0,3294
Reticolociti (mm³)	113	38750	24136	31900	7300	154900	0 – 60000	<0,0001
Piastrine (mm³)	113	238619	55986	236000	131000	385000	160000 – 500000	0,2035
MPV (fL)	113	11,5	2,0	11,3	8,5	16,9	6,6 – 10,9	0,0006
Leucociti	113	8802	2315	8610	4200	16010	6000 – 17000	0,0407
Neutrofili (mm³)	113	5245	1738	4980	2190	12990	1000 – 4800	<0,0001
Linfociti (mm³)	113	2489	908	2280	890	5540	100 – 1400	0,0002
Monociti (mm³)	113	417	188	390	150	1510	3000 – 12000	<0,0001
Eosinofili (mm³)	113	556	436	490	20	2610	0 – 750	<0,0001
Basofili (mm³)	113	70	46	60	10	300	0 – 180	<0,0001

Figura 4.4 – Risultati dell’esame emocromocitometrico nella popolazione di cani sani. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

	N	Media	DS	Mediana	Minimo	Massimo	IR	DN
Creatinina (mg/dL)	113	1,10	0,17	1,09	0,65	1,53	0,65 – 1,35	0,8007
Urea (mg/dL)	113	33	7	33	15	57	18 - 55	0,2993
ALT (U/L)	113	50	34	42	19	256	20 – 55	<0,0001
AST (U/L)	113	35	10	34	18	83	20 – 42	<0,0001
Bilirubina totale (mg/dL)	109	0,20	0,06	0,21	0,08	0,45	0,07 – 0,34	0,0016
GGT (U/L)	108	2,7	1,4	2,5	0,1	9,2	0, 1 – 5,8	0,0003
Fosfatasi alcalina (U/L)	113	99	92	66	10	606	42 – 180	<0,0001
Glucosio (mg/dL)	113	89	12	90	54	116	70 – 125	0,1895
Proteine totali (g/dL)	113	6,4	0,4	6,4	5,4	7,6	5,6 – 7,9	0,7165
Albumine (g/dL)	113	3,2	0,2	3,3	2,5	3,9	2,8 – 3,7	0,4112
Albumina/Globuline	113	1,0	0,3	1,0	0,7	3,3	0,6 – 1,3	<0,0001
Colesterolo totale (mg/dL)	108	239	54	228	146	372	140 – 350	0,0024
P (mg/dL)	113	4,0	0,6	4,0	2,4	5,7	2,6 – 4,9	0,5922
Ca (mg/dL)	113	10,0	0,4	10,1	8,9	11,0	9,0 – 11,8	0,1114
Ca X P	112	40	7	40	24	56	<70	0,4631
Cl (mEq/L)	113	113	2	113	107	120	108 – 118	0,0180
K (mEq/L)	113	4,4	0,2	4,4	3,7	5,0	3,9 – 5,3	0,0767
Na (mEq/L)	113	146	1,9	147	139	152	143 – 154	0,0009
Mg (mg/dL)	113	2,0	0,1	2,0	1,7	2,4	1,6 – 3,2	0,2713
Acido urico (mg/dL)	110	0,19	0,06	0,19	0,01	0,39		0,0124

Figura 4.5 – Risultati del profilo di chimica sierica nella popolazione di cani sani. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

INTERVALLI DI RIFERIMENTO DI VARIABILI DEL PROFILO CHIMICO URINARIO

Measurements		FE_Na_%_
Sample size		112
Lowest value		0,01000
Highest value		1,2100
Arithmetic mean		0,3229
Median		0,2500
Standard deviation		0,2547
Coefficient of Skewness		1,3562 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis		1,5297 (P=0,0157)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution		W=0,8721 reject Normality (P<0,0001)
95% Reference interval, Right-sided		
A. Method based on Normal distribution		
Upper limit		0,7418
90% CI		0,6731 to 0,8106
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		0,9205
90% CI		0,7000 to 1,0600
C. Robust method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		0,6921
90% CI ^a		0,6071 to 0,7767

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978)

Per la FENa si è usata una valutazione *right sided*. L'Intervallo di Riferimento della FENa, calcolato su soggetti sani ed espresso con metodo Robust, risulta essere compreso tra **0 - 0,69 %**.

Figura 4.6- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FENa calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Measurements		FE_Mg_%_
Filter		Sano_patologico=0
Sample size		113
Lowest value		0,1300
Highest value		4,9900
Arithmetic mean		2,2019
Median		2,1100
Standard deviation		1,1624
Coefficient of Skewness		0,2265 (P=0,3097)
Coefficient of Kurtosis		-0,7182 (P=0,0231)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution		W=0,9785 accept Normality (P=0,0649)
95% Reference interval, Double-sided		
A. Method based on Normal distribution		
Lower limit		-0,07637
90% CI		-0,3888 to 0,2361
Upper limit		4,4801
90% CI		4,1676 to 4,7925
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)		
Lower limit		0,2285
90% CI		
Upper limit		4,7000
90% CI		
C. Robust method (CLSI C28-A3)		
Lower limit		-0,1529
90% CI ^a		-0,4297 to 0,1295
Upper limit		4,4936
90% CI ^a		4,1759 to 4,7875

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).

Per la FEMg si è usata una valutazione *double sided*. L'Intervallo di Riferimento della FEMg, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0,2 – 4,7 %**.

Figura 4.7- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE Mg calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Measurements		FE_CI_%
Sample size		110
Lowest value		0,05000
Highest value		1,9000
Arithmetic mean		0,5892
Median		0,5450
Standard deviation		0,3408
Coefficient of Skewness		1,1597 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis		1,8156 (P=0,0079)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution		W=0,9263 reject Normality (P<0,0001)
95% Reference interval, Right-sided		
A. Method based on Normal distribution		
Upper limit		1,1497
90% CI		1,0569 to 1,2426
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		1,2785
90% CI		1,1200 to 1,5100
C. Robust method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		1,0993
90% CI ^a		0,9936 to 1,2052

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Per la FECl si è usata una valutazione *right sided*. L'Intervallo di Riferimento della FECl, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 1,09 %**.

Figura 4.8- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE Cl calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Measurements		FE_iCa
Sample size		107
Lowest value		0,07000
Highest value		1,3400
Arithmetic mean		0,3363
Median		0,2700
Standard deviation		0,2363
Coefficient of Skewness		1,9663 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis		5,1571 (P<0,0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution		W=0,8176 reject Normality (P<0,0001)
95% Reference interval, Right-sided		
A. Method based on Normal distribution		
Upper limit		0,7249
90% CI		0,6596 to 0,7902
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		0,7560
90% CI		0,6600 to 1,3100
C. Robust method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		0,6901
90% CI ^a		0,5842 to 0,7799

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Per la FEiCa si è usata una valutazione *right sided*. L'Intervallo di Riferimento della FEiCa, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,69 %**.

Figura 4.9- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE iCa calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Measurements		FE_Ca_%
Sample size		112
Lowest value		0,03000
Highest value		0,6600
Arithmetic mean		0,1653
Median		0,1400
Standard deviation		0,1119
Coefficient of Skewness		1,8184 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis		4,4691 (P<0,0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution		W=0,8365 reject Normality (P<0,0001)
95% Reference interval, Right-sided		
A. Method based on Normal distribution		
Upper limit		0,3493
90% CI		0,3191 to 0,3795
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		0,3805
90% CI		0,3100 to 0,6000
C. Robust method (CLSI C28-A3)		
Upper limit		0,3309
90% CI ^a		0,2861 to 0,3733

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Per la FECa si è usata una valutazione *right sided*. L'Intervallo di Riferimento della FECa, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,33 %**.

Figura 4.10- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE Ca calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Measurements		FE_urea_%
Sample size		112
Lowest value		16,2300
Highest value		100,0500
Arithmetic mean		63,5336
Median		61,8000
Standard deviation		16,5877
Coefficient of Skewness		-0,2917 (P=0,1956)
Coefficient of Kurtosis		0,5229 (P=0,2366)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution		W=0,9782 accept Normality (P=0,0641)
95% Reference interval, Double-sided		
A. Method based on Normal distribution		
Lower limit		31,0223
90% CI		26,5435 to 35,5011
Upper limit		96,0448
90% CI		91,5660 to 100,5237
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)		
Lower limit		19,7075
90% CI		
Upper limit		95,2182
90% CI		
C. Robust method (CLSI C28-A3)		
Lower limit		30,9331
90% CI ^a		26,5167 to 35,5398
Upper limit		97,3224
90% CI ^a		92,1772 to 101,9045

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Per la FE dell'Urea si è utilizzata una valutazione di tipo *double sided*. L'Intervallo di Riferimento della FE dell'Urea, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **30,9 - 97,3 %**.

Figura 4.11- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE urea calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Measurements	FE_P_%_
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	112
Lowest value	0,2000
Highest value	32,1600
Arithmetic mean	15,3404
Median	15,0050
Standard deviation	6,4014
Coefficient of Skewness	0,3194 (P=0,1577)
Coefficient of Kurtosis	-0,3201 (P=0,4973)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0,9854 accept Normality (P=0,2663)
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit	2,7937
90% CI	1,0653 to 4,5222
Upper limit	27,8870
90% CI	26,1585 to 29,6154
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	4,5647
90% CI	
Upper limit	29,3940
90% CI	
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	2,2133
90% CI ^a	0,6024 to 3,8598
Upper limit	27,7495
90% CI ^a	26,0138 to 29,5873

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).

Figura 4.12- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE P calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Per la FE P si è utilizzata una valutazione di tipo *double sided*. L'Intervallo di Riferimento della FE P, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **2,2 - 27,7 %**.

Measurements	FE_K_%_
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	112
Lowest value	2,2300
Highest value	30,1700
Arithmetic mean	11,2114
Median	10,3800
Standard deviation	5,1119
Coefficient of Skewness	0,9264 (P=0,0002)
Coefficient of Kurtosis	1,4731 (P=0,0182)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0,9545 reject Normality (P=0,0008)
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit	1,1924
90% CI	-0,1879 to 2,5726
Upper limit	21,2305
90% CI	19,8502 to 22,6107
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	2,3295
90% CI	
Upper limit	23,8112
90% CI	
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	0,2756
90% CI ^a	-1,3244 to 1,9410
Upper limit	20,8820
90% CI ^a	18,9953 to 22,5388

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).

Figura 4.13- Elaborazione statistica dell'intervallo di riferimento della FE K calcolata nella popolazione oggetto di studio.

Per la FE K si è utilizzata una valutazione di tipo *double sided*. L'Intervallo di Riferimento della FE K, calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **2,3 – 23,8%**.

Measurements	uP_uCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	113
Lowest value	0.01000
Highest value	1.4300
Arithmetic mean	0.5742
Median	0.5300
Standard deviation	0.2617
Coefficient of Skewness	0.9250 (P=0.0002)
Coefficient of Kurtosis	1.0087 (P=0.0624)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.9470 reject Normality (P=0.0002)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	1.0046
90% CI	0.9342 to 1.0749
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	1.1190
90% CI	0.9700 to 1.3700
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.9708
90% CI*	0.8926 to 1.0473
* Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).	

Per il rapporto fosforo urinario/creatinina urinaria si è utilizzata una valutazione di tipo *right sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,97**.

Figura 4.14 - Intervallo di riferimento del rapporto fosforo urinario/creatinina urinaria calcolati nella popolazione oggetto di studio.

Measurements	uMg_uCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	110
Lowest value	0.01000
Highest value	0.1400
Arithmetic mean	0.04264
Median	0.04000
Standard deviation	0.02329
Coefficient of Skewness	0.8543 (P=0.0007)
Coefficient of Kurtosis	1.7126 (P=0.0102)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.9347 reject Normality (P<0.0001)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	0.08095
90% CI	0.07460 to 0.08730
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.08000
90% CI	0.07000 to 0.1000
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.07968
90% CI*	0.07174 to 0.08708
* Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).	

Per il rapporto magnesio urinario/creatinina urinaria si è utilizzata una valutazione di tipo *right sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,08**.

Figura 4.15 - Intervallo di riferimento del rapporto magnesio urinario/creatinina urinaria calcolati nella popolazione oggetto di studio.

Measurements	uK_uCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	113
Lowest value	0.07000
Highest value	1.5100
Arithmetic mean	0.4705
Median	0.4600
Standard deviation	0.2436
Coefficient of Skewness	1.4105 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	3.4695 (P=0.0002)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.9091 reject Normality (P<0.0001)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	0.8712
90% CI	0.8057 to 0.9367
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.8830
90% CI	0.7500 to 1.3100
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.8383
90% CI*	0.7564 to 0.9163

* Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Figura 4.16 - Intervallo di riferimento del rapporto potassio urinario/creatinina urinaria calcolati nella popolazione oggetto di studio.

Per il rapporto potassio urinario/creatinina urinaria si è utilizzata una valutazione di tipo *right sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,84**.

Measurements	uCrea_sCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	113
Lowest value	37.1300
Highest value	547.1300
Arithmetic mean	272.9825
Median	279.0300
Standard deviation	96.9188
Coefficient of Skewness	0.06778 (P=0.7590)
Coefficient of Kurtosis	-0.1234 (P=0.9021)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.9938 accept Normality (P=0.8983)
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit	83.0250
90% CI	56.9727 to 109.0773
Upper limit	462.9399
90% CI	436.8877 to 488.9922
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	89.7990
90% CI	
Upper limit	467.1225
90% CI	
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit	78.7468
90% CI*	53.8925 to 106.3044
Upper limit	465.4643
90% CI*	439.0871 to 490.4959

Figura 4.17 - Intervallo di riferimento del rapporto creatinina urinaria/creatinina sierica calcolati nella popolazione oggetto di studio.

Per il rapporto creatinina urinaria/creatinina sierica si è utilizzata una valutazione di tipo *double sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **78 - 465**.

Measurements	uCl_uCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	113
Lowest value	0,06000
Highest value	2,5800
Arithmetic mean	0,6312
Median	0,5600
Standard deviation	0,4137
Coefficient of Skewness	1,7721 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis	5,0572 (P<0,0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0,8690 reject Normality (P<0,0001)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	1,3118
90% CI	1,2005 to 1,4230
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	1,4130
90% CI	1,2000 to 2,1500
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	1,2505
90% CI*	1,0945 to 1,3959

* Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Figura 4.18 - Intervallo di riferimento del rapporto cloro urinario/creatinina urinaria calcolati nella popolazione oggetto di studio;

Per il rapporto cloro urinario/creatinina urinaria si è utilizzata una valutazione di tipo *right sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 - 1,2**.

Measurements	uCa_uCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	111
Lowest value	0,003000
Highest value	0,07400
Arithmetic mean	0,01652
Median	0,01400
Standard deviation	0,01273
Coefficient of Skewness	2,3314 (P<0,0001)
Coefficient of Kurtosis	6,9794 (P<0,0001)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0,7690 reject Normality (P<0,0001)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	0,03745
90% CI	0,03400 to 0,04091
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0,04320
90% CI	0,03100 to 0,07300
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0,03490
90% CI*	0,02929 to 0,04021

* Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Figura 4.19 - Intervallo di riferimento del rapporto calcio urinario/creatinina urinaria calcolati nella popolazione oggetto di studio.

Per il rapporto calcio urinario/creatinina urinaria si è utilizzata una valutazione di tipo *right sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,03**.

Measurements	uAcido_urico_uCrea
Filter	Sano_patologico=0
Sample size	113
Lowest value	0.03000
Highest value	0.1500
Arithmetic mean	0.06204
Median	0.06000
Standard deviation	0.02284
Coefficient of Skewness	1.0444 (P=0.0001)
Coefficient of Kurtosis	1.7274 (P=0.0092)
Shapiro-Wilk test for Normal distribution	W=0.9197 reject Normality (P<0.0001)
95% Reference interval, Right-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Upper limit	0.09961
90% CI	0.09347 to 0.1057
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.1000
90% CI	0.09000 to 0.1400
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Upper limit	0.09835
90% CI ^a	0.08963 to 0.1054

^a Bootstrap confidence interval (10000 iterations, random number seed: 978).

Per il rapporto acido urico urinario/creatinina urinaria si è utilizzata una valutazione di tipo *right sided*. L'Intervallo di Riferimento calcolato su soggetti sani, in questo studio risulta essere compreso tra **0 – 0,1**.

Figura 4.20 - Intervallo di riferimento del rapporto acido urico urinario/creatinina urinaria calcolati nella popolazione oggetto di studio;

	N	Media	SD	Mediana	Minimo	Massimo	ND	Limite inferiore IR	90% CI	Limite superiore IR	90% CI
Peso specifico urinario	109	1047	14,6377	1048	1015	1080	0,1088				
UPC	113	0,10	0,04	0,10	0,04	0,36	<0,0001				
FE acido urico (%)	108	34,5	11,5	33,7	3,9	69,6	0,1015	10,4	7,4 – 13,6	56,6	52,9 – 60,0
FE Ca (%)	112	0,16	0,11	0,14	0,03	0,66	<0,0001	0		0,33	0,28 – 0,37
FE Cl (%)	110	0,58	0,34	0,54	0,05	1,90	<0,0001	0		1,09	0,99 – 1,20
FE iCa (%)	107	0,33	0,23	0,27	0,07	1,34	<0,0001	0		0,69	0,58 – 0,77
FE K (%)	111	11,0	4,8	10,3	2,2	27,7	0,0216	2,3		23,8	
FE Mg (%)	112	2,19	1,16	2,09	0,13	4,99	0,0694	0		4,0	3,7 – 4,3
FE Na (%)	112	0,32	0,25	0,25	0,01	1,21	<0,0001	0		0,69	0,60 - 0,77
FE P (%)	111	15,2	6,3	14,9	0,2	32,1	0,2338	2,2	0,6 – 3,8	27,7	26,0 – 29,5
FE urea (%)	112	63,5	16,5	61,8	16,2	100,0	0,0641	30,9	26,5 – 33,5	97,3	92,1 – 101,9

Figura 4.21 – Risultati della chimica urinaria nella popolazione di cani sani. Intervalli di riferimento (IR) calcolati attraverso i dati della popolazione di pazienti sani. DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

	N	Media	SD	Mediana	Minimo	Massimo	ND	Limite inferiore IR	90% CI	Limite superiore IR	90% CI
uAcido urico/ uCreatinina	113	0,06	0,02	0,06	0,03	0,15	<0,0001	0		0,09	0,08 – 0,10
uCa/uCreatinina	111	0,01	0,01	0,01	0,01	0,07	<0,0001	0		0,03	0,002 – 0,004
uCl/uCreatinina	113	0,63	0,41	0,56	0,06	2,58	<0,0001	0		1,25	1,09 – 1,39
uCreatinina/sCreatinina	113	272	96	279	37	547	0,8983	78	53 - 106	465	439 - 490
uGGT/uCreatinina	60	0,09	0,07	0,08	0,01	0,43	<0,0001	0		0,20	0,15 – 0,24
uGlucosio/uCreatinina	112	0,03	0,01	0,04	0,02	0,11	<0,0001	0,02		0,09	
uK/uCreatinina	113	0,47	0,24	0,46	0,07	1,51	<0,0001	0		0,8	0,7 – 0,9
uMg/uCreatinina	113	0,04	0,02	0,04	0,01	0,14	0,0003	0		0,007	0,007 – 0,008
uNa/uCreatinina	113	0,45	0,39	0,35	0,01	2,3	<0,0001	0		1,0	0,8 – 1,1
uP/uCreatinina	113	0,57	0,26	0,53	0,01	1,43	0,0002	0		0,97	0,89 – 1,04

Figura 4.22 – Risultati della chimica urinaria nella popolazione di cani sani. Intervalli di riferimento (IR) calcolati attraverso i dati della popolazione di pazienti sani. DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

CAPITOLO 5

SECONDA PARTE – CANI CON DANNO RENALE ACUTO

Per quanto riguarda la valutazione della popolazione di cani con danno renale è stata effettuata e pubblicata nel Journal Veterinary Internal Medicine nel 2018 (Troia R, Gruarin M, Grisetti C, Serafini F, Magna L, Monari E, Giunti M, Dondi F, 2018). Di seguito l'articolo originale.

Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications.

ABSTRACT

Background: The value of fractional excretion (FE) of electrolytes to characterize and prognosticate acute kidney injury (AKI) is poorly documented in dogs.

Objectives: To evaluate the diagnostic and prognostic roles of FE of electrolytes in dogs with AKI.

Animals: Dogs (n=135) with AKI treated with standard care (February 2014-December 2016).

Methods: Prospective study. Clinical and laboratory variables including FE of electrolytes, were measured upon admission. Dogs were graded according to the AKI-IRIS guidelines and grouped according to AKI features (volume-responsive, VR-AKI; intrinsic, I-AKI) and outcome (survivors/ non-survivors). Group comparison and

regression analyses with hazard ratios (HR) evaluation for IAKI and mortality were performed. $P < .05$ was considered significant.

Results: Fifty-two of 135 (39%) dogs had VR-AKI, 69/135 (51%) I-AKI and 14/135 (10%) were unclassified. I-AKI dogs had significantly higher FE of electrolytes, for example, FE of sodium (FENa, %) 2.39 (range 0.04-75.81) than VR-AKI ones 0.24 (range 0.01-2.21; $P < .001$). Overall, case fatality was 41% (55/135). Increased FE of electrolytes were detected in non-survivors, for example, FENa 1.60 (range 0.03-75.81) compared with survivors 0.60 (range 0.01-50.45; $P = .004$).

Several risk factors for death were identified, including AKI-IRIS grade (HR=1.39, $P = .002$), FE of electrolytes, for example, FENa (HR=1.03, $P < .001$), and urinary output (HR=5.06, $P < .001$). Conclusions and Clinical Importance: Fractional excretion of electrolytes performed well in the early differentiation between VR-AKI and I-AKI, were related to outcome, and could be useful tools to manage AKI dogs in clinical practice.

KEYWORDS

AKI grade, natriuresis, tubular damage, urine chemistry, urine output.

Abbreviations: AKI, acute kidney injury; AUC, area under the curve; BE, base excess; CI, confidence interval; CKD, chronic kidney disease; CRP, C-reactive protein; FE, fractional excretion; FECa, fractional excretion of calcium; FECl, fractional excretion of chloride; FEK, fractional excretion of potassium; FEMg, fractional excretion of magnesium; FENa, fractional excretion of sodium; FEP, fractional excretion of phosphorus; FEurea, fractional excretion of urea; GFR, glomerular filtration rate; HR, hazard ratio; iCa, ionized calcium; ICU, intensive care unit; NA, not applicable; ROC, receiver operator characteristic; SBP, systolic blood pressure; sCr, serum creatinine; SD, standard deviation; UAC, urine albumin to creatinine ratio; uCr, urine creatinine; uCr/sCr, urine creatinine to serum creatinine ratio; uGlucose/uCr, urine glucose to creatinine ratio; UO, urine output; UPC, urine protein to creatinine ratio; USG, urine specific gravity; uUA/uCr, urine uric acid to creatinine ratio; VTH, veterinary teaching hospital.

INTRODUCTION

Acute kidney injury (AKI) is a broad clinical syndrome characterized by sudden renal damage or dysfunction, frequently associated with a reduction in urine output (UO) (Kellum e Lameire, 2013; Brown *et al.*, 2015). The diagnosis of AKI still relies on clinical findings and relative or absolute changes in serum creatinine (sCr) and UO in humans (Kellum e Lameire, 2013). Acute kidney injury is gaining attention in small animal medicine, but universally accepted diagnostic criteria are lacking (Harison *et al.*, 2012; Keir e Kellum, 2015). Recently, an AKI grading system for dogs was proposed by Cowgill, (Cowgill, 2010) accepted by the IRIS group (<http://www.iris-kidney.com/pdf/grading-of-acute-kidney-injury.pdf>), and applied in clinical settings (De Loor *et al.*, 2013; Segev *et al.*, 2015; Nivy *et al.*, 2017; Sigrist *et al.*, 2017). Diagnostic criteria and five AKI grades based on medical data, sCr concentrations, and UO are suggested. Definitions for non-azotemic and volume-responsive AKI are proposed in the guidelines. These criteria are still rarely used for AKI diagnosis in veterinary clinical practice. The terms “volume-responsive” and “intrinsic” AKI have been proposed in human medicine to ameliorate the classification of “prerenal” and “renal” kidney injury (Himmelfarb *et al.*, 2008; Makris e Spanou, 2016). While the concept of intrinsic AKI refers to structural damage to the renal parenchyma, volume-responsive AKI is characterized by a transient reduction of renal function, which can be reversed after short-term fluid administration (Himmelfarb *et al.*, 2008; Makris e Spanou, 2016). Despite its potential reversibility and superior short-term prognosis, when compared with the intrinsic form, volume-responsive AKI is an independent risk factor for mortality in humans (Uchino *et al.*, 2010; Endre *et al.*, 2013). Moreover, clinicopathological or even pathological findings of renal damage have been detected in the latter state (Himmelfarb *et al.*, 2008; Sharfuddin *et al.*, 2011; Endre *et al.*, 2013; Vanmassenhove *et al.*, 2014). Studies designed to compare these conditions are lacking in dogs. Serum and urine chemistry, including the evaluation of the fractional excretion (FE) of electrolytes, are used in the assessment of human AKI aiming to differentiate between functional and structural kidney injury and give prognostic

information (Makris e Spanou, 2016). Specifically, volume-responsive AKI is characterized by low (<1%) FE of sodium (FENa), increased (>35%) FE of urea (FEurea), and increased urine creatinine (uCr) to sCr ratio (uCr/sCr; >40) (Makris e Spanou, 2016). The validity of this diagnostic paradigm in clinical practice, however, has been questioned due to the impact of different confounders (diuretic or vasopressor administration, fluid therapy, or specific AKI etiologies) (Prowle *et al.*, 2012; Bagshaw *et al.*, 2013; Vanmassenhove *et al.*, 2014). Fractional excretion of electrolytes have been recently reevaluated in dogs with AKI as readily available and cost-effective markers of tubular damage and kidney function (Brown *et al.*, 2015; Segev *et al.*, 2015). Fractional excretion of sodium was an early and accurate predictor of AKI in a population of dogs with naturally occurring heatstroke despite fluid resuscitation (Segev *et al.*, 2015). Additionally, a recent investigation valued the prognostic value of sequential changes of glomerular filtration rate (GFR), UO, and renal solute excretion in 10 dogs with naturally occurring AKI (Brown *et al.*, 2015). Increased GFR and UO, and decreased FENa during hospitalization were associated with renal recovery and predicted survival in this population (Brown *et al.*, 2015). The main objective of the current study was to evaluate the performance of clinical and clinicopathological variables, focusing on the FE of electrolytes and urea, in early differentiation between volume-responsive and intrinsic AKI in a population of dogs with naturally occurring AKI and to investigate their potential for outcome prediction at the time of hospital admission. In addition, the prognostic power of an AKI grading system for dogs (<http://www.iris-kidney.com/pdf/grading-of-acute-kidney-injury.pdf>) (Cowgill, 2010) was assessed. Our hypothesis was that the FE of electrolytes and urea could predict the occurrence of volume-responsive or intrinsic AKI in dogs early, and that the AKI grade and urine chemistry were of prognostic value during AKI.

MATERIALS AND METHODS

Study design

This was a prospective, observational case-control study with intensive care unit (ICU) follow-up performed at a Veterinary Teaching Hospital (VTH), between February 2014 and December 2016.

Animals

Dogs with naturally occurring AKI hospitalized in the ICU of our VTH were considered for the study. Inclusion criteria were acute onset of clinical signs (<7 days) and signalment; history; and clinical, clinicopathological, and imaging findings suggesting AKI (Cowgill e Langston, 2011). In particular, sCr >1.6 mg/dL (azotemic AKI) or a progressive non-azotemic ≥ 0.3 mg/dL increase in sCr from baseline within 48 hours, persistent oliguria/anuria (UO <1 mL kg⁻¹ h⁻¹) over 6 hours, or both criteria were required, as previously reported (<http://www.iris-kidney.com/pdf/grading-of-acutekidney-injury.pdf>) (Cowgill, 2010; Cowgill e Langston, 2011). Dogs with historical, clinical, laboratory, and imaging findings consistent with chronic kidney disease (CKD), AKI on CKD, postrenal AKI (eg, uroabdomen, urinary tract obstruction), and dogs who received treatments known to increase urinary electrolyte excretion (eg, diuretics, hypertonic saline) before the admission to the ICU were excluded from the study. Additionally, dogs that were euthanized for reasons other than ethical ones were also excluded.

Grouping

Dogs were graded (I-V) according to the IRIS grading system for AKI at the time of AKI diagnosis and through the overall study period. Volume-responsive or intrinsic AKI were classified according to the IRIS guidelines for AKI (<http://www.iris-kidney.com/pdf/grading-ofacute-kidney-injury.pdf>) (Cowgill, 2010). Specifically, volume-responsive AKI was defined as an increase in urine production above 1 mL kg⁻¹ h⁻¹ over 6 hours of adequate fluid therapy, or a decrease in sCr concentrations to baseline over 48 hours. On the contrary, intrinsic AKI was defined as persistent azotemia for longer than 48 hours, inappropriate oligo/anuria despite appropriate fluid therapy once any volume deficit had been restored and euvolemia achieved, or

both. Furthermore, dogs were classified according to their outcome as survivors if discharged alive and as nonsurvivors if they died despite medical treatment or were humanely euthanized for ethical reasons. For all dogs, the total number of days spent in the ICU was recorded. In addition, 14-day survival and 1-month follow-up were recorded for survivors.

A group of dogs (n=81) considered healthy according to history, physical examination, and clinicopathological and imaging data were included as controls.

Clinical and clinicopathological data

Complete clinical and laboratory data were collected and analyzed at the time of AKI diagnosis; clinical monitoring was performed and recorded during the overall duration of hospital stay. The Apple Fast score for illness severity was calculated (Hayes *et al.*, 2010). Daily recorded clinical data included body weight, body temperature, heart rate, respiratory rate, noninvasive systolic blood pressure (SBP) measured using Doppler (Minidop ES-100VX Hadecco Inc, Kawasaki, Japan) or an oscillometric device (petMAPTM graphic, Ramsey Medical, Inc, Tampa, Florida) according to the ACVIM guidelines (Brown *et al.*, 2007), hydration/volume status, fluid input, and UO (mL). For the purpose of the study, UO was measured at the time of hospital admission to achieve AKI diagnosis. Only once fluid resuscitation had been performed and fluid therapy instituted for at least 6 hours, UO was used to classify AKI (intrinsic/volume-responsive) and then during the overall hospital stay. Dogs received medical management and supportive care based on the assessment made by the ICU team and the nephrologists. Treatments were targeted to each dog individually, depending on the severity of clinical signs, hydration/volume status, UO, presence of specific organ dysfunction and electrolytes abnormalities, and presumptive or confirmed etiology of AKI. Leptospirosis was considered a differential diagnosis in dogs with known risk factors exposure and indicative clinical and laboratory findings, and diagnosed by means of a single microagglutination test titer $\geq 1:800$ for nonvaccinal serovars or by the evidence of a 4-fold increase in the titer in paired serum samples (convalescent titer). Sepsis was diagnosed in cases of systemic inflammatory response syndrome (Hauptman *et al.*, 1997) and evidence of a septic

focus by means of cytology or microbiology. Discontinuation of fluid therapy and diuretic administration were performed in cases of oligo/anuria attributed to intrinsic AKI, presence of fluid overload, or both conditions. Treatment of AKI was provided through conventional medical therapy (n=134) and peritoneal dialysis (n=1). Blood specimens were collected by standard venipuncture using blood vacuum collection systems; concurrent urine specimens were obtained by means of cystocentesis, spontaneous voiding, or catheterization. Samples were collected and analyzed within 1 hour after inclusion. The following analyses were performed: venous or arterial blood gas analysis including pH, base excess (BE), anion gap, lactate, and ionized calcium (iCa) concentration; CBC; and chemistry profile including sCr, albumin, total proteins, glucose, alanine transaminase, aspartate transaminase, alkaline phosphatase, total bilirubin, g-glutamyltransferase, cholesterol, sodium, potassium, magnesium, chloride, total calcium, phosphorus, C-reactive protein (CRP), and uric acid. Urinalysis included urine specific gravity (USG), dipstick examination, microscopic evaluation of the urine sediment, uCr, urine protein to creatinine ratio (UPC), urine albumin to creatinine ratio (UAC), urinary electrolytes, urea and uric acid to creatinine ratio (uUA/uCr). Pigmented urine specimens were excluded from UAC and UPC measurements. The study was approved by the local Scientific Ethical Committee for Animal Testing.

Laboratory methods

CBC was obtained using an automated hematology system (ADVIA 2120, Siemens Healthcare Diagnostics, Tarrytown NY). C-reactive protein (CRP OSR6147, Olympus/Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland) and urinary albumin (MICROALBUMIN OSR6167, Olympus/ Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland) were measured using immunoturbidimetric assays previously validated in our laboratory for dogs (Gentilini *et al.*,2005). Blood gas analysis was determined by a blood gas analyzer (ABL 800 Flex, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, Denmark). Urine specific gravity was measured by a hand refractometer (American Optical, Buffalo, New York). Urinary proteins and uCr were measured using commercially available colorimetric methods (Urinary/CSF Protein, OSR6170, Olympus/Beckman

Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland; Creatinine OSR6178, Olympus/Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland). Fractional excretion of electrolytes including FENa, FE of potassium (FEK), FE of chloride (FECl), calcium (FECa), phosphate (FEP), magnesium (FEMg), and FEurea were calculated according to the equation reported previously (Brown *et al.*, 2015), as follows:

$$FEX = \frac{uX}{sX} \frac{sCr}{uCr} \quad (\text{based on spot urine sample})$$

where uX and sX were the concentrations of a specific analyte in urine and serum, respectively. Urinary uric acid concentrations were measured using a colorimetric method (URIC ACID OSR6098 Olympus/Beckman Coulter, O'Callaghan's Mills, Ireland) and expressed as the uUA/uCr ratio. The uCr/sCr ratio was calculated. All analyses were performed using an automated chemistry analyzer (OLYMPUS AU 400, Olympus/Beckman Coulter, Brea, California).

Statistical Analysis

Data were expressed by standard descriptive statistics and presented as mean ± standard deviation (SD) or median and (range), based on their distribution. Normality was assessed graphically and by using the D'Agostino-Pearson test. The Mann-Whitney U test and Kruskal-Wallis test with compensated post hoc analysis were used to evaluate differences between groups (intrinsic AKI, volume-responsive AKI and control dogs; survivors and nonsurvivors). Unclassified dogs in respect to AKI categories ($n=14$) were excluded from the comparison. Categorical variables were compared using the chi-squared test. Logistic regression and Cox proportional regression analyses (using univariate and multivariate models) were performed to evaluate risk factors for the presence of intrinsic AKI and outcome (death/survival at discharge; stepwise approach), respectively. Results were presented as hazard ratios (HR) and 95% confidence intervals (CI). Overall model fit was assessed by the percentage of outcome correctly classified by receiver operator characteristic (ROC) curve analysis and by the chi-squared test for the relationship between time and all the covariates in the model. Receiver operator characteristic curves were used to find optimal cut-off values with the maximal sum of sensitivity and specificity for variables

discriminating between volume-responsive AKI and healthy controls, between volume-responsive and intrinsic AKI, and between survivors and nonsurvivors. The area under the ROC curve (AUC) was calculated. Results of all statistics were considered significant if $P < .05$. Statistical analyses were performed using an online available statistical software (MedCalc Statistical Software version 13.3.1 [MedCalc Software bvba, Ostend, Belgium; <http://www.medcalc.org>; 2014]).

RESULTS

A total of 135 dogs with AKI were included in the study. Median age was 7 years (0.3–16), and median body weight was 19.4 kg (1.3–69.6). Sex distribution was as follows: 54/135 (40%) intact males, 13/135 (10%) castrated males, 39/135 (29%) intact females, and 29/135 (21%) spayed females. Mixed-breed dogs were 49/135 (36%), while purebred dogs were 86/135 (64%). Median length of hospitalization was 5 days (1–20).

Characterization of dogs with AKI

According to the IRIS grading of AKI, the following AKI grades of severity were documented in the study population: 32/135 dogs (24%) AKI grade I, 39/135 (29%) AKI grade II, 25/135 (18%) AKI grade III, 27/135 (20%) AKI grade IV, and 12/135 (9%) AKI grade V. Continuous UO monitoring was obtained by means of an indwelling urinary catheter connected to a closed urinary drainage system ($n=100$) or through voided urine collection and quantification ($n=25$). Urine specimens and UO monitoring were not available in 10/135 cases because of complete anuria. Oligo/anuria was present in 47/135 (35%) dogs at the time of inclusion in the study: 37/135 dogs had inappropriate oligo/anuria and were in the intrinsic-AKI group, 5/135 dogs had appropriate oligo/anuria and were classified as volume-responsive AKI based on sCr changes. Five additional dogs had oligo/anuria at the initial stages of hospitalization, but early death precluded any further classification in regard to UO. Attempts to convert oligo/anuria to polyuria were made through diuretic therapy in 32/37 dogs with inappropriate oligo/anuria: in 10 dogs, UO response after furosemide administration was noticed. In the remaining 22 dogs, mannitol,

diltiazem, or both drugs were considered in the absence of contraindications, without any significant increase in urine production.

Fifty-two of 135 dogs (39%) were diagnosed as having volume-responsive AKI, while intrinsic AKI was recognized in 69/135 (51%) dogs. AKI classification was not performed in 14/135 (10%) cases because of early death. Causes of AKI and comorbidities in the study population are reported in Table 1. Overall, 80/135 (59%) dogs were classified as survivors and 55/135 (41%) as nonsurvivors. All survivors were also alive at 14 and 30 days of follow-up. Significantly higher frequencies of death were detected in dogs with intrinsic compared with volume-responsive AKI (52.2% versus 17.3%, $P < .001$), and in dogs with oligo/anuria, as previously defined, compared with nonoliguric ones (69.8% versus 23.9%, $P < .001$). Frequency of death was significantly higher in dogs with oligo/anuria than in dogs with intrinsic AKI dogs ($P = .007$).

TABLE 1 Recognized causes and diseases associated with AKI in the study population

AKI etiologies/comorbidities	Volume-responsive AKI (n = 52)	Intrinsic AKI (n = 69)	Unclassified AKI (n = 14)
Leptospirosis		26	1
Toxic			
Nonsteroidal anti-inflammatory drugs		4	
Ethylene glycol		4	
Noninfectious inflammatory diseases	18	11	3
Neoplasia	2	3	1
Sepsis	21	6	3
Trauma	6	3	1
Diabetic ketoacidosis		3	
Heatstroke	2	1	3
Gastric dilatation-volvulus	3	1	
Undetermined etiology/miscellanea		7	2

Acute kidney injury group comparison

Results and main significant differences among dogs with volume-responsive AKI, dogs with intrinsic AKI, and healthy controls are reported in Table 2. Specifically, dogs diagnosed with intrinsic AKI had significantly increased SBP, AKI grade, sCr, urea, magnesium, phosphorus, total bilirubin, anion gap, FE of electrolytes, and UPC and significantly decreased blood pH, iCa, USG, uCr, and uCr/sCr compared with dogs with volume-responsive AKI and control dogs (Table 2 and Supporting Information Table S5). Dogs with volume-responsive AKI had significantly higher lactate concentration

and uUA/uCr than dogs with intrinsic AKI and controls. No statistically significant difference was detected for CRP and Apple Fast score between dogs with intrinsic and volume-responsive AKI (Table 2 and Supporting Information Table S5). Results of univariate and multivariate logistic regression analysis for the risk of having intrinsic AKI at the time of AKI diagnosis are reported in Figure 1. Acute kidney injury grade and BE were the only variables retained in the multivariate model. Nonsurvivors had significantly higher AKI grade, sCr, urea, potassium, phosphorus, magnesium, total bilirubin, anion gap, FE of electrolytes, UPC, and Apple Fast score values and significantly lower hemoglobin, iCa, BE, pH, and uCr/sCr values than survivors (Table 3 and Supporting Information Table S7).

TABLE 2 Descriptive statistics and comparison among intrinsic AKI, volume-responsive AKI, and control dogs for clinical and clinicopathological variables

Variable	AKI (n = 135)	Intrinsic AKI (n = 69)	Volume-responsive AKI (n = 52)	Controls (n = 81)	P value
Clinical variables and scores					
AKI IRIS grading	2 (1-5)	4 (1-5) ^b	2 (1-4)	NA	<.001
UO (mL kg ⁻¹ h ⁻¹ ; over 12 h)	1.2 (0.0-7.0)	1.4 ± 1.2	1.3 (0.6-7.0)	NA	.061
APPLE fast score	23.2 ± 6.3 ^a	22 (12-44) ^a	21.7 ± 6.4 ^a	11 (7-15)	<.001
SBP (mm Hg)	154 ± 35 ^a	160 ± 34 ^{ab}	148 ± 35 ^a	128 ± 11	<.001
Serum chemistry (n = 135)					
Creatinine (mg/dL)	2.41 (0.57-21.39) ^a	5.22 (1.41-21.39) ^{ab}	1.79 ± 1.69 ^a	1.07 ± 0.15	<.001
Urea (mg/dL)	139 (16-785) ^a	233 (30-785) ^{ab}	85 (16-441) ^a	34 ± 8	<.001
Urea/creatinine (mg/mg)	41.7 (16.6-139.7) ^a	40.5 (17.8-95.2) ^a	43.3 (18.5-137.8) ^a	32.8 ± 8.9	<.001
Phosphate (mg/dL)	7.7 (0.8-42.2) ^a	11.4 (1.1-42.2) ^{ab}	5.9 ± 2.7 ^a	3.7 ± 0.6	<.001
Albumin (mg/dL)	2.75 ± 0.69 ^a	2.78 ± 0.64 ^a	2.70 ± 0.76 ^a	3.27 ± 0.28	<.001
Chloride (mmol/L)	104 (59-123) ^a	105 ± 15 ^{ab}	109 (71-122) ^a	113 (107-119)	<.001
Sodium (mmol/L)	143 (116-163) ^a	142 (116-154) ^{ab}	144 ± 6 ^a	146 ± 3	<.001
Potassium (mmol/L)	4.2 (2.3-8.7) ^a	4.4 (2.3-8.7) ^b	4.0 ± 0.6 ^a	4.5 (3.8-5.3)	<.001
Magnesium (mg/dL)	2.70 (1.11-6.10) ^a	3.08 (1.43-6.10) ^{ab}	2.30 (1.11-5.60) ^a	2.04 ± 0.22	<.001
CRP (mg/dL)	8.08 (0.44-45.48) ^a	7.07 (0.44-45.48) ^a	8.83 (0.90-38.85) ^a	0.22 (0.01-0.5)	<.001
Blood gas analysis (n = 135)					
pH	7.30 (6.90-7.50) ^a	7.30 (6.90-7.50) ^a	7.32 ± 0.09	7.35 ± 0.03	.017
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	17.5 (6.6-40.0) ^a	17.2 ± 6.5 ^a	18.4 (9.1-40.0) ^a	20.9 ± 1.6	.002
BE (mmol/L)	-7.1 (-28.0-43.0) ^a	-8.6 ± 7.6 ^a	-5.8 (-17.2-43.0) ^a	-3.4 ± 1.3	.001
Anion gap (mmol/L)	20.7 ± 7.3 ^a	23.0 ± 7.8 ^{ab}	17.8 ± 5.6 ^a	6.8 (3.6-15.0)	<.001
Ionized calcium (mmol/L)	1.16 (0.49-1.41) ^a	1.03 ± 0.24 ^{ab}	1.18 ± 0.13 ^a	1.29 (1.07-1.36)	<.001
Lactate (mmol/L)	2.2 (0.3-20.0) ^a	1.7 (0.3-20.0) ^{ab}	3.2 ± 1.9 ^a	0.9 ± 0.3	<.001
Urinalysis (n = 125)					
USG	1020 (1007-1074) ^a	1016 (1008-1050) ^{ab}	1028 (1007-1074) ^a	1044 ± 14	<.001
uCr (mg/dL)	92.0 (7.6-769.8) ^a	75.3 (7.6-422.5) ^{ab}	130 (18-770) ^a	316 ± 145	<.001
UPC (mg/mg)	1.62 (0.09-72.00) ^a	2.21 (0.09-72.00) ^{ab}	1.00 (0.10-10.15) ^a	0.07 (0.04-0.28)	<.001
UAC (mg/mg)	0.41 (0.00-55.71) ^a	0.44 (0.02-55.71) ^a	0.40 (0.00-5.11) ^a	0.00 (0.00-0.03)	<.001
FENa (%)	0.94 (0.01-75.81) ^a	2.36 (0.04-75.81) ^{ab}	0.24 (0.01-2.21)	0.20 (0.02-1.11)	<.001
FECl (%)	0.89 (0.03-83.45) ^a	2.70 (0.06-83.45) ^{ab}	0.22 (0.03-3.14) ^a	0.42 (0.04-1.71)	<.001
FEK (%)	41.7 (1.6-399.7) ^a	74.9 (5.3-399.7) ^{ab}	23.3 (1.6-74.1) ^a	9.47 ± 3.68	<.001
FEca (%)	1.04 (0.05-70.02) ^a	4.1 (0.1-70.0) ^{ab}	0.3 (0.1-3.7) ^a	0.08 (0.02-0.82)	<.001
FEMg (%)	5.6 (0.3-131.8) ^a	10.2 (0.9-80.9) ^{ab}	2.9 (0.3-13.8) ^a	1.61 (0.04-6.30)	<.001
FEP (%)	25.8 (0.4-233.5) ^a	38.4 ± 24.9 ^{ab}	17.9 ± 13.4	13.24 (0.17-45.91)	<.001
FEurea (%)	39.9 (2.5-533.8) ^a	45.0 (2.5-121.2) ^a	38.7 ± 17 ^a	57.91 ± 12.60	<.001
uUA/uCr (mg/mg)	0.07 (0.00-2.56) ^a	0.05 (0.01-0.81) ^b	0.14 (0.00-2.56)	0.05 (0.02-0.15)	<.001
uGlucose/uCr (mg/mg)	0.21 (0.01-58.19) ^a	0.32 (0.01-58.19) ^{ab}	0.09 (0.01-0.93) ^a	0.03 (0.01-0.11)	<.001
uCr/sCr (mg/mg)	34 (1-546) ^a	14 (1-218) ^{ab}	78 (10-546) ^a	285 (50-780)	<.001

Data are reported as mean±SD or median and (range) based on their distribution.

Abbreviations: AKI, acute kidney injury; BE, base excess; CRP, C-reactive protein; FEca, fractional excretion of calcium; FECl, fractional excretion of chloride; FEK, fractional excretion of potassium; FEMg, fractional excretion of magnesium; FENa, fractional excretion of sodium; FEP, fractional excretion of phosphate; FEurea, fractional excretion of urea; NA, not applicable; SBP, systolic blood pressure; UAC,

urine albumin to creatinine ratio; uCr, urine creatinine; uCr/sCr, urine creatinine to serum creatinine ratio; uGlucose/uCr, urine glucose to creatinine ratio; UO, urinary output; UPC, urine protein to creatinine ratio; USG, urinary specific gravity; uUA/uCr, urine uric acid to creatinine ratio.

^aSignificantly different from control dogs.

^bSignificantly different from dogs with volume-responsive AKI.

These findings were mainly confirmed when the comparison between survivors (n=33) and nonsurvivors (n=36) was performed in dogs having intrinsic AKI (Supporting Information Table S8). Several variables were associated with an increased risk of death in the overall population of dogs with AKI. Base excess, total bilirubin, and iCa were retained in the multivariate model (Figure 2 and Supporting Information Table S9). Results of ROC curve analyses evaluating the FE of electrolytes and uCr/sCr for the discrimination between volume-responsive AKI and healthy controls, volume-responsive and intrinsic AKI, and survivors and non survivors are reported in Table 4.

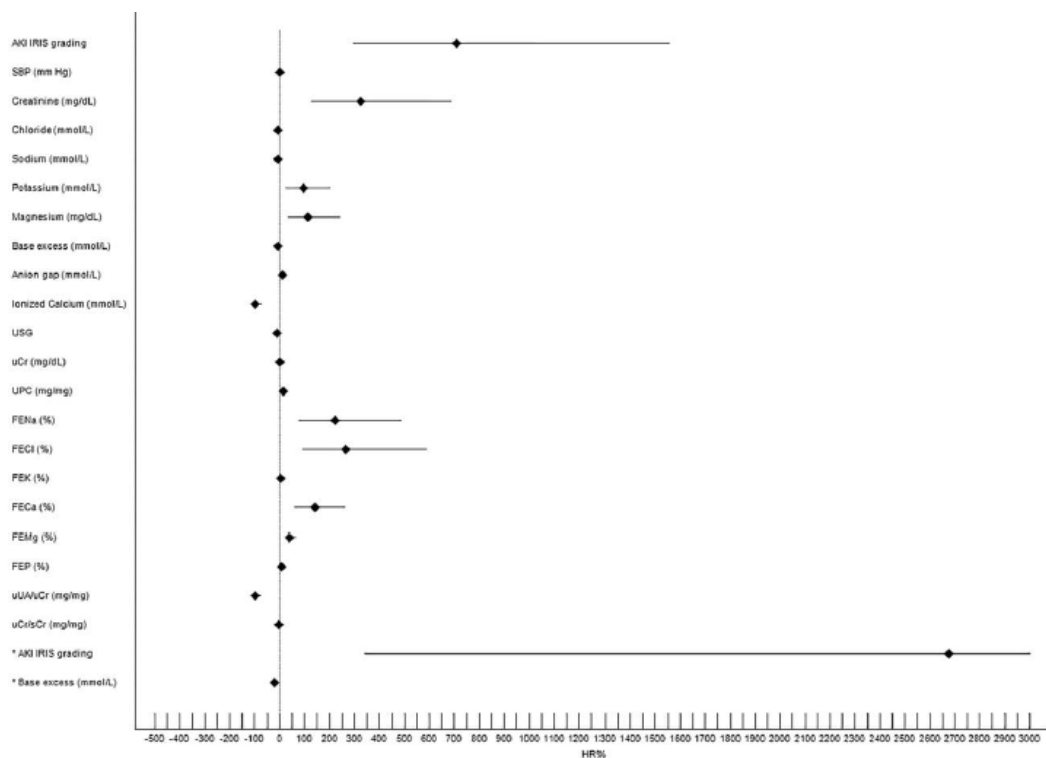


FIGURE 1 Forest plot showing results of the univariate and multivariate logistic regression analyses for the prediction of intrinsic AKI in the study population. Black rhombus represents HR reported as percentage of risk (HR%). The horizontal black line indicates the 95% confidence interval values. Asterisk indicates variables retained in the multivariate model. The upper limit of 95% Confidence Interval for AKI grade in the multivariate model was 17392, and the horizontal line was truncated at 3000 for graphical reasons (see Table 3 in Supporting Information for details). Only variable with P<.05 are reported. FE_{Ca}, fractional excretion of calcium; FE_{Cl}, fractional excretion of chloride; FE_K, fractional excretion of potassium; FE_{Mg}, fractional excretion of magnesium; FE_{Na}, fractional excretion of sodium; FE_P, fractional excretion of phosphate; HR, hazard ratio; SBP, systolic blood pressure; uCr, urine creatinine; uCr/sCr, urine creatinine to serum creatinine ratio; UPC, urine protein to creatinine ratio; USG, urine specific gravity; uUA/uCr, urine uric acid to urine creatinine ratio; uCr/sCr, urine creatinine to serum creatinine ratio.

DISCUSSION

Our study characterized clinical and clinicopathological features of AKI occurring in a wide population of critically ill dogs. The prevalence rates of intrinsic and volume-responsive AKI were similar in the study population. Causes and diseases associated with AKI were various and mainly related to septic and noninfectious inflammatory conditions. These results are in partial contrast with the available veterinary literature, as volume-responsive AKI seems to be poorly represented, and AKI during sepsis or systemic inflammation is scarcely documented in dogs (Kenney *et al.*, 2010; Cowgill e Langston, 2011; Ateca *et al.*, 2014; Giunti *et al.*, 2015; Keir e Kellum, 2015). On the contrary, systemic inflammation and sepsis are the most common conditions associated with AKI in humans (Endre *et al.*, 2013; Keir e Kellum, 2015). Our findings might be due to a different case series composition and case selection based on the novel and more sensitive diagnostic criteria for AKI used. Several clinical and clinicopathological variables could discriminate between intrinsic and volume-responsive AKI at the time of diagnosis in the study population. In particular, higher SBP, a more severe reduction of renal function, and a lower urinary concentrating ability associated with higher concentrations of urine proteins and greater electrolytes losses, were significantly related to the presence of intrinsic AKI. These results suggest that the structural integrity of renal tubules and parenchyma are more severely compromised during intrinsic AKI, with subsequent uremic toxin accumulation and more serious acid/base derangements (Devarajan, 2017). Fractional excretion of various electrolytes performed similarly and well overall in the differentiation between intrinsic and volume-responsive AKI, being potentially promising and easy to obtain at the time of AKI diagnosis. Interestingly, the cut-off values of FENa and uCr/sCr detected in the current study are in line with the ones recognized and recommended in humans (Makris e Spanou, 2016). Fractional excretion of urea was not different between intrinsic and volume-responsive AKI and control dogs, refuting our initial hypothesis. Species-specific differences due to urea metabolism, renal handling, and dietary supply might potentially account for the lack of its diagnostic significance, in contrast to the data

reported in humans (Vanmassenhove *et al.*, 2013; Makris e Spanou, 2016), and warrant further investigations. Significant increases in blood lactate concentration and uUA/uCr were documented in dogs with volume-responsive AKI compared with those with intrinsic AKI and healthy dogs. A more severe grade of tissue hypoperfusion characterizing volume-responsive AKI might explain our findings. Urinary uric acid has been proposed as a marker of tissue hypoxia in humans (Kosmadakis *et al.*, 2009; Ozanturk *et al.*, 2016), and an increase in uUA/uCr occurs in dogs with volume-responsive AKI and systemic inflammation combined with alterations in variables of low tissue perfusion (Troia *et al.*, 2016). Fractional excretion of urea was not different between intrinsic and volume-responsive AKI and control dogs, refuting our initial hypothesis.

TABLE 3 Comparison of clinical and clinicopathological variables between surviving (n=80) and nonsurviving (n=55) dogs with AKI

Variable (n = 135)	Survivors	Nonsurvivors	P value
Clinical variables and scores			
AKI IRIS grading	2 (1-5)	3 (1-5)	.003
UO (mL kg ⁻¹ h ⁻¹ ; over 12 hours)	1.4 (0.2-7.0)	0.7 (0.0-4.7)	<.001
APPLE fast score	21.6 ± 5.3	26.5 ± 6.9	<.001
Serum chemistry (n = 135)			
Creatinine (mg/dL)	2.2 (0.6-11.8)	4.4 (0.8-21.4)	.002
Phosphate (mg/dL)	6.6 (0.8-30.0)	11.2 (1.8-42.2)	<.001
Calcium (mg/dL)	9.9 ± 0.9	9.1 ± 1.6	.009
Potassium (mmol/L)	4.1 (2.3-8.0)	4.3 (2.7-8.7)	.011
Chloride (mmol/L)	107 (60.5-123)	97 (59-120)	.039
Magnesium (mg/dL)	2.52 (1.11-5.60)	3.04 (1.64-6.10)	.017
Blood gas analysis (n = 135)			
pH	7.31 ± 0.08	7.26 ± 0.12	.027
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	18.5 (8.5-40.0)	14.7 (6.6-38.1)	.005
BE (mmol/L)	-5.9 (-17.2-43.0)	-9.6 (-28.0-10.7)	.003
Anion gap (mmol/L)	18.8 ± 6.9	23.5 ± 6.9	.002
Ionized calcium (mmol/L)	1.19 (0.64-1.41)	1.09 (0.49-1.38)	.003
Urinalysis (n = 125)			
UPC (mg/mg)	1.4 (0.1-14.7)	2.7 (0.2-72.0)	.001
FENa (%)	0.60 (0.01-50.45)	1.60 (0.03-75.81)	.004
FECI (%)	0.57 (0.05-49.24)	2.57 (0.03-83.45)	.004
FEK (%)	34.3 (1.6-215.9)	59.9 (5.3-399.7)	<.001
FECa (%)	0.6 (0.1-56.1)	4.0 (0.1-70.0)	<.001
FEMg (%)	4.8 (0.3-70.6)	12.0 (0.3-131.8)	<.001
uGlucose/uCr (mg/mg)	0.13 (0.01-17.37)	0.45 (0.01-58.19)	.001
uCr/sCr (mg/mg)	45.5 (1.9-545.9)	17.4 (1.2-377.2)	.006

Only statistically significant variables (P<.05) are reported.

Abbreviations: AKI, acute kidney injury; BE, base excess; FECa, fractional excretion of calcium; FECI, fractional excretion of chloride; FEK, fractional excretion of potassium; FEMg, fractional excretion of magnesium; FENa, fractional excretion of sodium; uCr/sCr, urine creatinine to serum creatinine ratio; uGlucose/uCr, urine glucose to creatinine ratio; UO, urinary output; UPC, urine protein to creatinine ratio.

Species-specific differences due to urea metabolism, renal handling, and dietary supply might potentially account for the lack of its diagnostic significance, in contrast to the data reported in humans (Vanmassenhove *et al.*, 2013; Makris e Spanou, 2016), and warrant further investigations. Significant increases in blood lactate concentration and uUA/uCr were documented in dogs with volume-responsive AKI compared with those with intrinsic AKI and healthy dogs. A more severe grade of tissue hypoperfusion characterizing volume-responsive AKI might explain our findings. Urinary uric acid has been proposed as a marker of tissue hypoxia in humans (Kosmadakis *et al.*, 2009; Ozanturk *et al.*, 2016), and an increase in uUA/uCr occurs in dogs with volume-responsive AKI and systemic inflammation combined with alterations in variables of low tissue perfusion (Troia *et al.*, 2016). Our study documented a significantly lower frequency of death in dogs with volume-responsive AKI than in those with intrinsic AKI. According to our diagnostic criteria, dogs with volume-responsive AKI had an apparently less severe impairment of renal function documented by a lower AKI grade and sCr upon admission. Although GFR could not be correctly estimated by sCr during AKI, this hypothesis might explain the lower case fatality rate noticed in this group. Discriminating intrinsic versus volume-responsive AKI could not have any apparent therapeutic implication (Bellomo *et al.*, 2007). However, the early differentiation of transient volume-responsive kidney injury from the intrinsic form could add clinical and prognostic information. In this regard, both the veterinary clinician and the animal owner could be supported in the decision-making process and the management of the AKI patient (eg, predicting the reversibility of kidney failure, or proposing adequate therapies depending on the expected “renal outcome”).

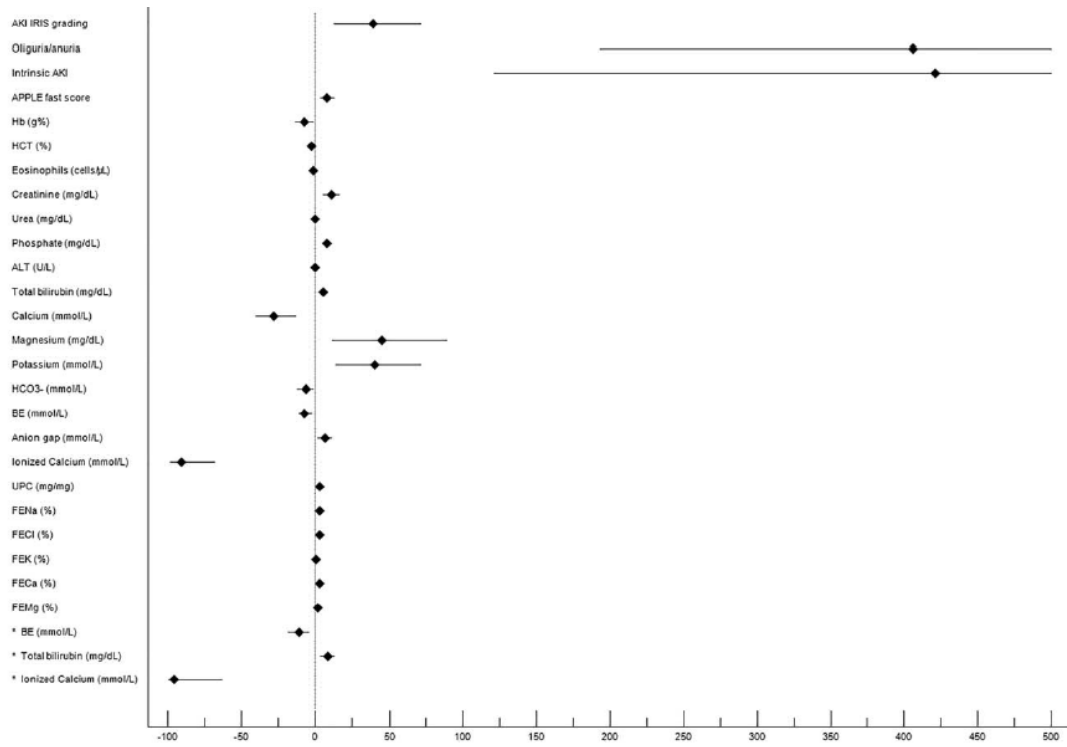


FIGURE 2 Forest plot reporting results of univariate and multivariate Cox regression analyses for the prediction of mortality in dogs with AKI. Black rhombus represents HR reported as percentage of risk (HR%). The horizontal black line indicates the 95% confidence interval values. Asterisk indicates variables retained in the multivariate model. In the univariate model, the horizontal lines indicating the upper limit of 95% confidence interval for intrinsic AKI (1131) and oligo/anuria (773) were truncated at 500 for graphical reasons (see Table 5 in supporting information for details). Only variables with P<.05 are reported. ALT, alanine transaminase; BE, base excess; FECa, fractional excretion of calcium; FECI, fractional excretion of chloride; FEK, fractional excretion of potassium; FEMg, fractional excretion of magnesium; FENa, fractional excretion of sodium; Hb, hemoglobin concentration; HCT, hematocrit value; HR, hazard ratio; UPC, urine protein to creatinine ratio. Oliguria/anuria defined as urinary output <1 mL kg⁻¹ h⁻¹ for at least 6 hours.

The potential of urine chemistry to distinguish between these conditions quickly at the time of AKI diagnosis is, therefore, of value and supports its evaluation in the clinical practice. The performances of urine chemistry and FE of electrolytes with respect to AKI diagnosis were variable in our study. In this regard, FECa, FEK, and uCr/sCr performed excellently (Table 4), showing that lower FEs and higher uCr/sCr values should be expected in healthy dogs with normal renal function. On the contrary, and unexpectedly, FENa was not different between volume-responsive AKI and control dogs. These latter results are difficult to compare with the available veterinary literature due to the paucity of data and the lack of inclusion of healthy control dogs (Lefebvre *et al.*, 2008; Giunti *et al.*, 2015; Segev *et al.*, 2015). Moreover there is evidence that AKI in the course of sepsis and systemic inflammation can trigger severe sodium retention in humans (Prowle *et al.*, 2012; Vitorio e Maciel, 2014). For these reasons, the diagnostic value of FE of electrolytes other than sodium

could be more suitable for the diagnosis and prediction of AKI in similar settings in dogs. The case fatality in our study was 41% and is partially in line with the previous case fatality rates for dogs with AKI (Segev *et al.*, 2008; Thoen e Kerl, 2011; Segev *et al.*, 2016). Although dogs with volume-responsive and intrinsic AKI showed similar grades of disease severity at the time of hospital admission, as indicated by similar Apple Fast scores, dogs with intrinsic AKI had higher IRIS AKI grades and higher frequencies of death, as previously stated. This result underlines the significant impact of intrinsic kidney damage on the overall patient outcome, independently of the final diagnosis. However, reversibility of renal dysfunction does not define the absence of mortality risk, as nearly 20% of the enrolled dogs with volume-responsive AKI died in our study. Limited studies have reported various variables as potential risk factors for mortality in dogs with AKI, including hypercalcemia, hyperphosphatemia, proteinuria, anemia, and different grading systems to reflect AKI severity, while the prognostic role of azotemia at the time of hospital admission remains controversial (Behrend *et al.*, 1996; Vaden *et al.*, 1997; Mastroilli *et al.*, 2007; Cowgill e Langston, 2011; Lee *et al.*, 2011). Recently, increased GFR and UO and decreased FENa over the course of hospitalization were associated with renal recovery and predicted survival in a population of 10 dogs with naturally occurring AKI mainly managed using hemodialysis (Brown *et al.*, 2015). Several clinical and clinicopathological variables were associated with mortality in our population of dogs with AKI, including FE of electrolytes; overall, they were mainly indexes of renal dysfunction and tubular impairment. In particular, FECa had the best diagnostic and prognostic accuracy among the FEs evaluated in the study. Moreover, sCr and uCr/sCr upon admission had a prognostic value in our cohort. These results might have been influenced by case series composition and AKI etiologies or mainly by the lack of renal replacement therapy in our setting. Nevertheless, the prognostic impact of variables that could reflect renal damage/dysfunction independently of the therapeutic management available, such as FE of electrolytes, was shown to be more useful in dogs with AKI, as previously suggested (Brown *et al.*, 2015). Urinary volume was predictive of death in previous studies in dogs (Behrend *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 2015) and maintains a

prognostic role in humans (Kellum *et al.*, 2015). Frequencies of death were significantly higher in dogs with oligo/anuria (UO <1 mL kg⁻¹ h⁻¹ for at least 6 hours in the face of euolemia), and presence of oligo/anuria was among the variables retained in the univariate survival analysis. Since most of the dogs showing oligo/anuria at the time of inclusion in the study had intrinsic AKI, hence the most severe form of renal disease, this result might be expected in our cohort. However, frequency of death was significantly higher in dogs with oligo/anuria than in dogs with intrinsic AKI, confirming the prognostic role of UO alone when conventional treatment for AKI is performed. These statements corroborate the clinical usefulness of the IRIS grading system for AKI, in which UO is combined with other clinical and laboratory variables for AKI diagnosis and classification. According to the survival analysis, BE, iCa, and total bilirubin were significantly associated with mortality. These data are preliminary and partially in line with the available literature on AKI in dogs (Vaden *et al.*, 1997). In addition, the prognostic role of hyperbilirubinemia, metabolic acidosis, and hypocalcemia has been suggested previously in critically ill dogs in different clinical settings, particularly during sepsis (Luschini *et al.*, 2010; Conti-Patara *et al.*, 2012; Giunti *et al.*, 2015; Goggs *et al.*, 2015). For these reasons, in our cohort, their prognostic role might have been influenced by factors other than renal damage, as well as by AKI etiology (eg, leptospirosis, sepsis), and requires further assessment. There are some limitations to acknowledge when interpreting our results. No clearance study was performed for our study. Although clearance techniques using timed urine collection are considered gold standard to assess the daily urinary solute excretions (Finco *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 2008; Pressler, 2013), a recent study suggested that FE can be used in clinical practice as a reliable surrogate for fractional clearance of urinary solutes in dogs (Brown *et al.*, 2015). Although unlikely due to the historical, laboratory, and imaging findings of the dogs in our study, pre-existing renal disease cannot be completely ruled out. Additionally, specimens and data collected through the overall hospitalization period to assess full renal recovery were not analyzed for our study nor were novel biomarkers of kidney damage aimed at a better characterization of volume-responsive AKI.

TABLE 4 Results of ROC curve analyses evaluating the FE of electrolytes and uCr/sCr for discrimination between study groups

Variable	AUC	Cut-off	Sensitivity (%)	Specificity (%)	P value
(a) Volume-responsive AKI versus healthy controls					
FENa (%)	0.556	<0.64	25	96.3	.336
FECl (%)	0.660	<0.22	55.3	80.0	.004
FEMg (%)	0.685	<3.16	50.0	81.5	<.001 ^a
FEca (%)	0.901	<0.16	91.5	77.5	<.001 ^{a, b, c}
FEK (%)	0.870	<17.79	70.8	98.8	<.001 ^{a, b, c}
uCr/sCr (mg/mg)	0.883	>163	83.3	81.5	<.001 ^{a, b, c}
(b) Intrinsic versus volume-responsive AKI					
FENa (%)	0.856	>0.90	83.3	75.8	<.001
FECl (%)	0.872	>0.53	78.7	83.9	<.001
FEMg (%)	0.879	>4.93	82.6	83.6	<.001
FEca (%)	0.885	>0.55	76.6	90.3	<.001
FEK (%)	0.868	>33.9	77.1	85.5	<.001
uCr/sCr (mg/mg)	0.883	<33.6	87.5	90.0	<.001
(c) Survivors versus nonsurvivors					
FENa (%)	0.654	>4.38	41.7	93.4	.004
FECl (%)	0.657	>7.49	38.3	94.7	.005
FEMg (%)	0.697	>11.64	51.1	85.3	<.001
FEca (%)	0.701	>3.41	55.3	81.6	<.001
FEK (%)	0.692	>130	35.4	96.1	<.001
uCr/sCr (mg/mg)	0.646	≤7.36	41.7	93.5	.008

Cut-off values with the maximal sum of sensitivity and specificity are provided to identify controls (a), intrinsic AKI (b) and non-survivors (c).

Abbreviations: AUC, area under the curve; FEca, fractional excretion of calcium; FECl, fractional excretion of chloride; FEK, fractional excretion of potassium; FEMg, fractional excretion of magnesium; FENa, fractional excretion of sodium; ROC, receiver operator characteristic; uCr/sCr, urine creatinine

to serum creatinine ratio. P value refers to the ROC curve analysis for single variables.

^aSignificantly different from FENa in the ROC curve comparison.

^bSignificantly different from FECl in the ROC curve comparison.

^cSignificantly different from FEMg in the ROC curve comparison.

Finally, previous or ongoing fluid therapy was not considered as an exclusion criteria for the study. Although only a minority of dogs was included while on intravenous fluid therapy (data not shown), the impact of fluid administration on FE values should be considered, especially in the comparison between AKI and control dogs. In conclusion, our study contributes to the characterization of AKI in a wide population of critically ill dogs. Volume-responsive and intrinsic AKI seem to be related to numerous etiologies, mainly of inflammatory and septic origin. Fractional excretion of electrolytes and of uCr/sCr in particular show good performances for the differentiation between volume-responsive and intrinsic AKI at the time of diagnosis and could also act as prognostic tools. Their measurement could be suggested in daily practice, as they are feasible and cost-effective biomarkers of tubular integrity and function. The clinical application of both sCr and UO criteria to diagnose AKI and grade the disease in dogs, as performed in our study, could be strongly recommended

in veterinary practice, to raise the suspicion of the disease in high-risk patients and to obtain prognostic information, with significant implications in research and clinical fields.

CAPITOLO 6

TERZA PARTE - CANI CON MALATTIA RENALE CRONICA

DATI EPIDEMIOLOGICI

Nel periodo oggetto di studio sono stati selezionati 67 pazienti affetti da CKD. Il gruppo di soggetti incluso è costituito da una popolazione eterogenea per età, sesso, peso e razza. L'età mediana è di 116 mesi (7-209 mesi) mentre la mediana del peso è di 19,4 kg (3-45 kg).

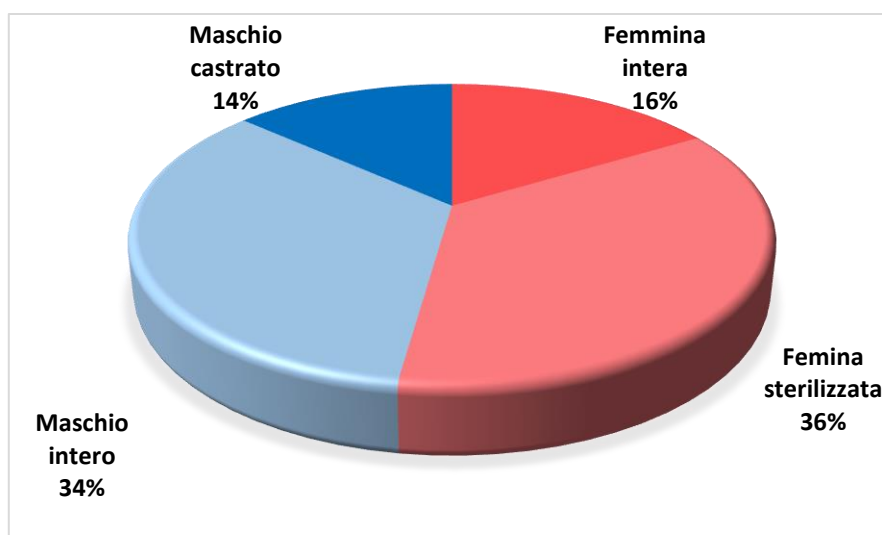


Figura 6.1: rappresentazione della distribuzione del sesso nella popolazione di cani con CKD.

All'interno della popolazione canina analizzata le femmine compongono il 52% (35/67) di cui il 16% (11/35) sono femmine intere e il 36% (24/35) femmine sterilizzate. Il restante 48% (32/67) è costituito da pazienti di sesso maschile di cui il 34% (23/32) sono maschi interi e il 15% (9/32) sono maschi castrati (Figura 6.1).

La popolazione di studio è costituita per il 28% (19/67) da cani meticci e il restante 72% (48/67) da cani di razza, così distribuiti: 4/48 Cavalier King Charles Spaniel (6%), 4/48 Boxer (6%), 4/48 Pastori Tedeschi (6%), 4/48 Jack Russell Terrier (6%), 3/48

Border Collie (4%), 3/48 Setter Inglese (4%), 3/48 Labrador Retriever (4%), 3/48 Sharpei (4%). Quando il numero di rappresentanti per ciascuna razza è risultato minore del 5% queste sono state accorpate nel gruppo “altre razze” in cui sono presenti 20 cani su 48 (30%), come rappresentato in Figura 6.2.

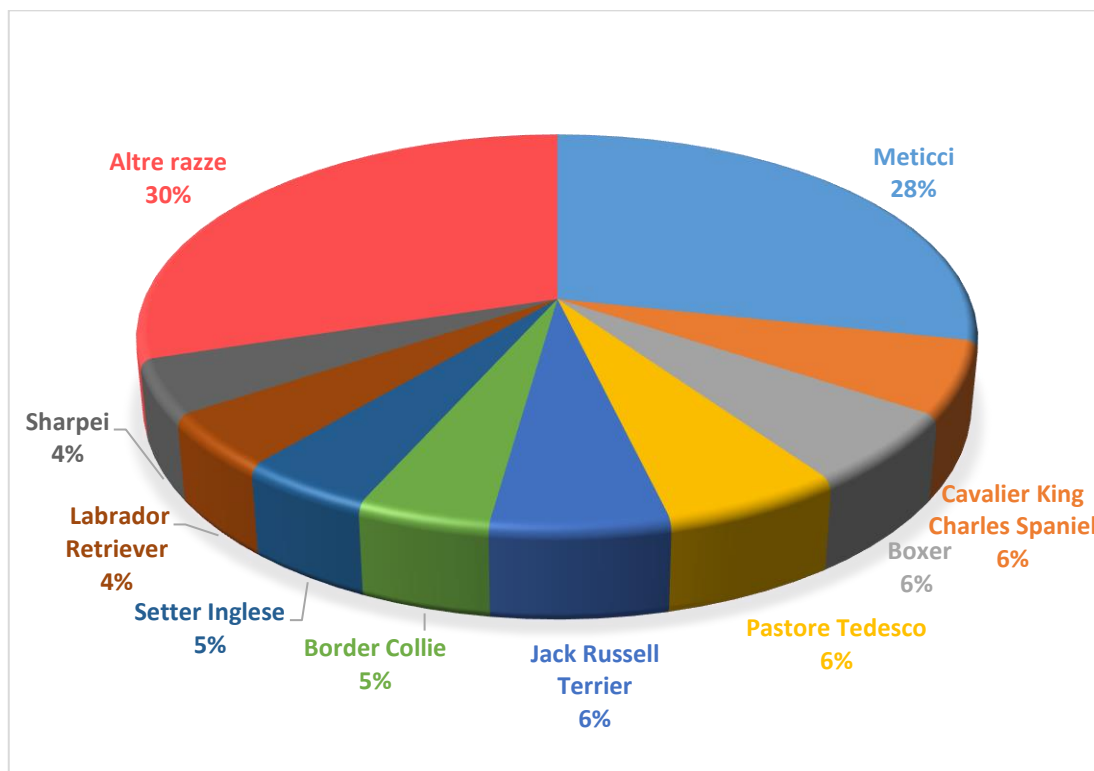


Figura 6.2: Rappresentazione grafica della distribuzione delle razze della popolazione di studio.

Il 55% (37/67) dei soggetti CKD inclusi nello studio presenta delle comorbidity. Le patologie più frequentemente associate a CKD in questi pazienti sono state: parodontopatia nel 46% (17/37) dei pazienti, gastroenteropatia cronica nel 29% (11/37) dei pazienti, epatopatia nel 19% (7/37) dei pazienti, cardiopatia nel 16% (6/37) dei pazienti, infezioni del tratto urinario nel 14% (5/37) dei pazienti, sindrome di Cushing nel 8% (3/37) dei pazienti, nefrolitiasi nel 8% (3/37) dei pazienti, polmonite nel 8% (3/37) dei pazienti, allergie o intolleranze nel 8% (3/37) dei pazienti, leishmaniosi nel 8% (3/37) dei pazienti, anomalie congenite nel 5% (2/37) dei pazienti, malattia immunomediata nel 5% (2/37) dei pazienti, cistolitiasi nel 3% (1/37)

dei pazienti, trombosi nel 3% (1/37) dei pazienti (Figura 6.3). Il 45% (30/67) dei pazienti CKD non presenta patologie concomitanti.

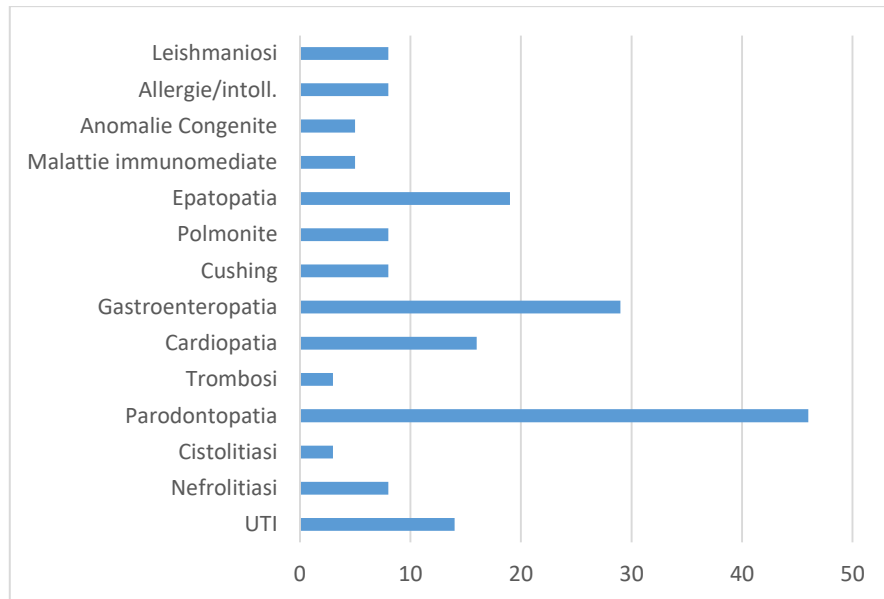


Figura 6.3: rappresentazione grafica delle comorbidity presentate dai pazienti con CKD inclusi nello studio. Sull'asse delle x i valori sono espressi in %.

I sintomi riportati dai proprietari dei cani con malattia renale cronica inclusi nello studio sono stati: poliuria/polidipsia (Pu/Pd) nel 33% (22/67) dei pazienti, disoressia nel 25% (17/67) dei pazienti, vomito occasionale nel 19% (13/67) dei pazienti, perdita di peso nel 16% (11/67) dei pazienti, letargia nel 10% (7/37) dei pazienti, tremori nel 10% (7/37) dei pazienti, incontinenza urinaria nel 8% (5/67) dei casi, alterazioni del mantello nel 9% (6/67) dei pazienti (Figura 6.4).

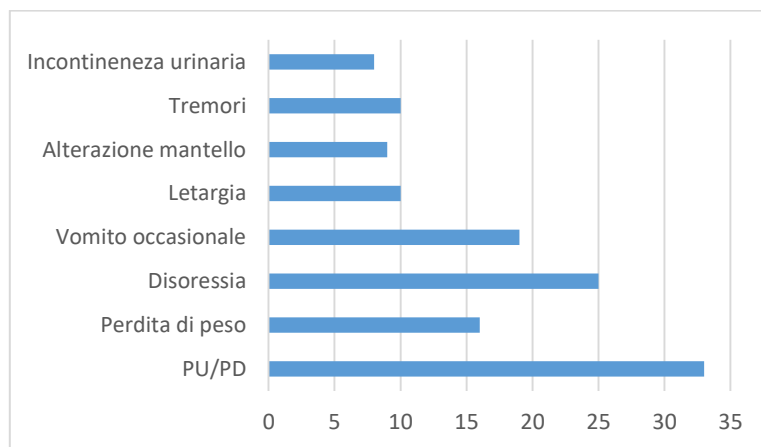


Figura 6.4: rappresentazione grafica di sintomi riscontrati dai proprietari dei cani con malattia renale cronica inclusi nello studio. Sull'asse delle x i valori sono espressi in %.

Ai pazienti con malattia renale cronica inclusi nello studio venivano somministrate le seguenti terapie: dieta renale nel 69% (46/67) dei pazienti, inibitori dell'Angiotensina II (ACEi) nel 40% (27/67) dei pazienti, calcio antagonisti nel 9% (6/67) dei pazienti, chelanti del fosforo nel 19% (13/67) dei pazienti, inibitori di pompa protonica nel 22% (15/67) dei pazienti, antiemetici nel 6% (4/67) dei pazienti, ipodermoclisi nel 19% (13/67) dei pazienti, acidi grassi polinsaturi (PUFA) nel 30% (20/67) dei pazienti, somministrazione di darbepoetina nel 1,5% (1/67) dei pazienti (figura 6.5).

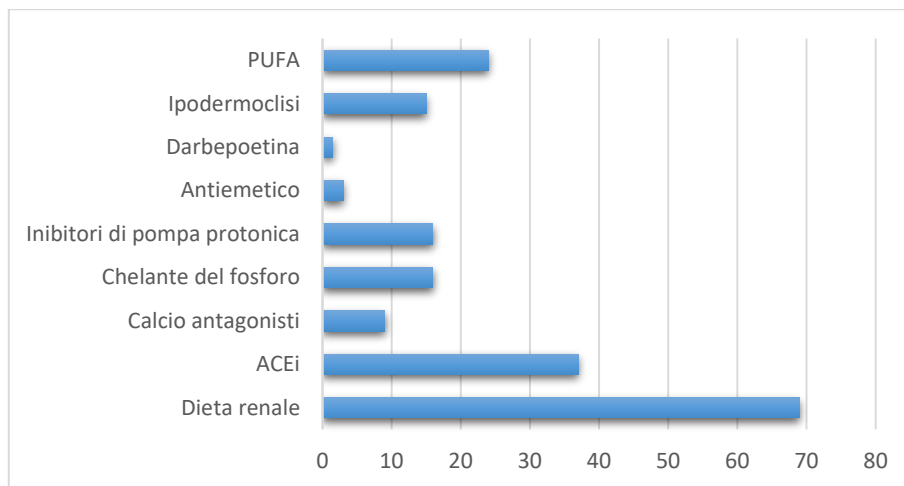


Figura 6.5: rappresentazione grafica delle terapie somministrate ai pazienti al momento dell'inclusione nello studio, espressi in termini di percentuale nel gruppo CKD oggetto di studio.

La stadiazione della CKD proposta dal gruppo IRIS è stata eseguita per tutti i soggetti inclusi.

La mediana della concentrazione di creatinina sierica dei pazienti inclusi nello studio era di 2,5 mg/dL (0,6- 14,2 mg/dL). Il peso specifico urinario mediano è di 1013 (1006-1062). I risultati della stadiazione IRIS sono riportati in Figura 6.6. Il 55% (37/67) dei soggetti inclusi nello studio appartenevano allo stadio IRIS 3 e 4.

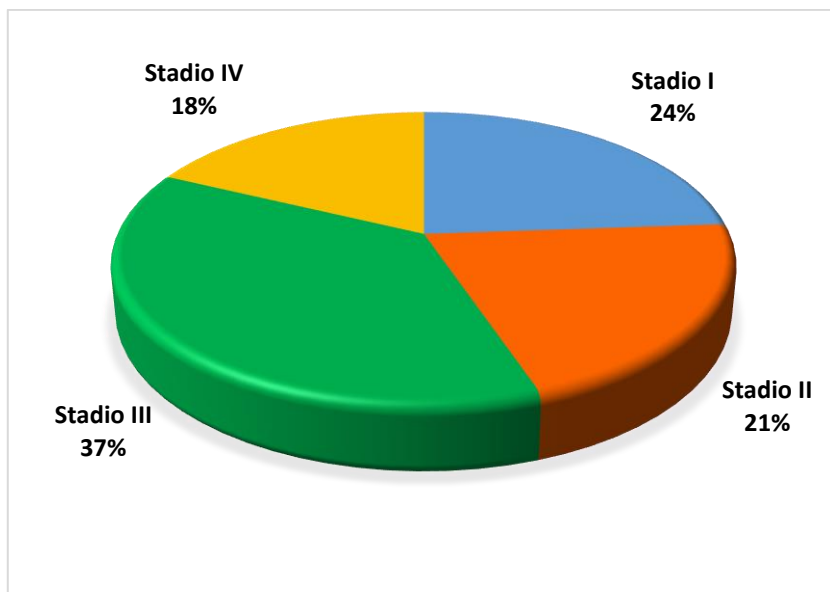


Figura 6.6: Rappresentazione grafica della divisione in stadi IRIS della popolazione di cani oggetto di studio.

La popolazione è stata, inoltre, suddivisa secondo la sottostadiazione IRIS per la proteinuria: i soggetti proteinurici erano il 61% (41/67), i soggetti proteinurici borderline erano il 19% (13/67), i soggetti non proteinurici erano il 18% (12/67). Il valore mediano dell'UPC era 1 (range: 0,08-7,9).

La pressione arteriosa è stata misurata nel 94% dei soggetti (63/67). Secondo la sottostadiazione IRIS dell'ipertensione i pazienti sono stati suddivisi in: normotesi 41% (26/63), ipertesi borderline 16% (10/63), ipertesi 22% (14/63) e gravemente ipertesi 21% (13/63) (Tabella 4.3). La mediana della pressione arteriosa sistolica è di 160 mmHg (125-215 mmHg).

DESCRITTIVA POPOLAZIONE – DATI CLINICO-PATOLOGICI

Nelle successive tabelle sono mostrati i risultati delle variabili relative ad esami emogasanalitico (**figura 6.7**), emocromocitometrico (**figura 6.8**), chimica sierica (**figura 6.9**), esame delle urine e delle frazioni di escrezione e dei rapporti degli analiti su creatinina urinaria (**figura 6.10**) della popolazione con CKD.

La popolazione di cani con CKD inclusi nello studio mostrava alterazioni all'emogasanalisi venosa riguardanti il pH sierico, in cui la mediana evidenziava una lieve acidosi con 7,33 (7,09 – 7,50), una riduzione dei bicarbonati con 18 mmol/L (9 - 26) ed una diminuzione del *base excess* con -5,5 mmol/L (-18,6 – 1,4). L'esame emocromocitometrico non riporta alterazioni significative. Il profilo chimico ha evidenziato un aumento del valore mediano della creatinina sierica 2,34 mg/dl (0,65 – 1,35) e dell'urea 103 mg/dl (18 - 55) rispetto all'intervallo di riferimento. La valutazione dell'analisi urinaria verrà ampiamente discussa in seguito.

Emogasanalisi

	N	Media	DS	Mediana	Minimo	Massimo	IR	DN
pH	62	7,30	0,07	7,33	7,09	7,50	7,39 – 7,44	0,0010
pCO ₂ (mm/Hg)	62	37,5	5,5	37,3	23,5	52,4	33,6 – 41,2	0,5982
HCO ₃ (mmol/L)	63	18	4	18	9	26	20,8 – 24,2	0,2009
Ca ionizzato (mmol/L)	62	1,29	0,10	1,31	0,85	1,47	1,22 – 1,35	<0,0001
Anion Gap (mmol/L)	63	14,4	4,2	13,7	8,7	26,8	9,0 – 22,0	0,0009
Base excess (mmol/L)	58	-5,8	4,3	-5,5	-18,6	1,4	-2,0 – 2,0	0,0137
Cl ⁻ (mmol/L)	62	117	4,4	117	108	129	108 – 118	0,4057
Na ⁺ (mmol/L)	62	145	2	146	136	154	143 – 154	0,0276
K ⁺ (mmol/L)	62	4,5	0,6	4,4	3,5	7,3	3,9 – 5,3	0,0001

Figura 6.7 – Risultati dell'emogasanalisi venosa nella popolazione di cani con CKD oggetto dello studio. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

Esame emocromocitometrico

	N	Media	DS	Mediana	Minimo	Massimo	IR	DN
Hct (%)	67	36,7	8,3	37,9	19,3	54,3	37 -55	0,0664
Hgb (gr%)	66	12,5	2,8	12,8	6,5	18,7	12 -18	0,2066
Eritrociti (mm³)	67	5548507	1412907	5870000	2700000	8390000	5500000 – 8500000	0,0823
RDW (%)	67	12,8	0,8	12,6	11,3	15,7	13,0 – 15,7	0,0029
MCV (fL)	66	66,9	5,4	66,8	52,7	80,1	60 – 77	0,5607
MCH (pgr)	67	22,6	1,8	22,5	16,8	27,2	19,5- 24,5	0,2109
MCHC (gr%)	67	33,8	0,9	33,9	30,9	36,0	32 – 38	0,1681
Reticolociti (%)	64	0,6	0,3	0,5	0,1	1,9		<0,0001
Reticolociti (mm³)	64	34970	18208	30700	2800	86100	0 – 60000	0,0005
Piastrine (mm³)	67	378298	173820	344000	50000	1064000	160000 – 500000	0,0002
MPV (fL)	67	11,9	3,1	11,2	7,4	29,2	6,6 – 10,9	<0,0001
Leucociti (mm³)	67	8777	2834	8650	4110	18610	6000 – 17000	0,0121
Neutrofili (%)	66	68,5	8,9	68,8	41,0	87,5		0,7821
Linfociti (%)	66	20,6	7,4	19,9	7,1	47,6		0,0799
Monociti (%)	66	4,9	1,4	5,0	1,6	7,9		0,5245
Eosinofili (%)	66	5,2	4,2	4,6	0,2	26,7		<0,0001
Basofili (%)	66	0,3	0,2	0,3	0,1	1,6		<0,0001
Neutrofili (mm³)	67	6061	2383	5710	2910	16280	1000 – 4800	<0,0001
Linfociti (mm³)	67	1800	783	1690	300	4220	100 – 1400	0,2454
Monociti (mm³)	67	429	186	400	70	1010	3000 – 12000	0,0259
Eosinofili (mm³)	67	427	373	350	30	2360	0 – 750	<0,0001
Basofili (mm³)	67	29	27	20	1	180	0 – 180	<0,0001

Figura 6.8 – Risultati dell'esame emocromocitometrico nella popolazione di cani con CKD oggetto dello studio. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

Profilo chimico sierico

	N	Media	DS	Mediana	Minimo	Massimo	IR	DN
Creatinina (mg/dL)	67	3,26	2,54	2,34	0,59	14,21	0,65 – 1,35	<0,0001
Urea (mg/dL)	67	123	90	103	18	402	18 - 55	<0,0001
ALT (U/L)	67	67	63	48	10	429	20 – 55	<0,0001
AST (U/L)	67	36	17	31	16	146	20 – 42	<0,0001
Bilirubina totale (mg/dL)	66	0,19	0,05	0,19	0,08	0,32	0,07 – 0,34	0,0781
GGT (U/L)	66	3,4	2,6	2,6	0,1	13,0	0, 1 – 5,8	<0,0001
Fosfatasi alcalina (U/L)	67	221	303	88	20	1481	42 – 180	<0,0001
Glucosio (mg/dL)	67	96	12	98	60	119	70 – 125	0,1051
Proteine totali (g/dL)	67	6,1	0,6	6,2	3,6	7,5	5,6 – 7,9	0,0050
Albumine (g/dL)	67	2,7	0,4	2,8	1,1	3,7	2,8 – 3,7	0,0096
Albumina/ Globuline	67	0,8	0,1	0,8	0,4	1,1	0,6 – 1,3	0,2076
CRP (mg/dL)	11	1,9	2,9	0,9	0,01	9,7	0 – 0,5	0,0001
Colesterolo (mg/dL)	66	297	98	284	154	588	140 – 350	0,0063
P (mg/dL)	66	5,8	2,8	4,9	2,6	15,4	2,6 – 4,9	<0,0001
Ca (mg/dL)	66	10,5	0,9	10,5	7,8	13,3	9,0 – 11,8	0,1592
Ca X P	66	62,4	33,5	50,1	25,9	204,8	<60	<0,0001
Cl (mEq/L)	66	112	4	112	102	127	108 – 118	0,4198
K (mEq/L)	67	4,9	0,6	5,0	3,8	7,5	3,9 – 5,3	0,0161
Mg (mEq/L)	66	2,2	0,4	2,1	0,8	3,9	1,6 – 3,2	0,0045
Na (mEq/L)	67	147	2	147	140	154	143 – 154	0,1671
Acido urico (mEq/L)	65	0,20	0,20	0,17	0,01	1,67		<0,0001

Figura 6.9 – Risultati del profilo chimico sierico nella popolazione di cani con CKD oggetto dello studio. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

Profilo chimico urinario

	N	Media	SD	Mediana	Minimo	Massimo	IR	DN
Peso specifico urinario	67	1016	11	1013	1004	1062	>1030	<0,0001
UPC	67	1,5	1,6	1,0	0,08	7,9	<0.4	<0,0001
FE acido urico (%)	65	47,03	46,39	34,61	8,05	329,34		<0,0001
FE Ca (%)	66	1,27	1,68	0,49	0,04	8,20	<1%	<0,0001
FE Cl (%)	66	2,67	3,47	1,32	0,10	17,89	<1%	<0,0001
FE iCa (%)	62	2,68	3,63	0,98	0,09	15,18	<1%	<0,0001
FE K (%)	67	38,9	29,2	29,9	3,4	113,1	<20%	<0,0001
FE Na (%)	67	1,81	2,51	0,88	0,08	12,65	<1%	<0,0001
FE P (%)	66	28,4	16,7	26,9	0,1	83,6	<39%	0,0130
FE Mg (%)	65	9,0	6,6	6,9	0,3	29,1	<4%	0,0013
FE urea (%)	66	48,0	16,2	47,2	13,3	108,0		0,1398
uAcido urico/uCreatinina	67	0,03	0,04	0,02	0,01	0,33		<0,0001
uCa/uCreatinina	64	0,03	0,03	0,03	0,01	0,25		<0,0001
uCl/uCreatinina	67	0,84	0,59	0,68	0,04	2,57		0,0002
uCreatinina/sCreatinina	67	54,4	64,4	29,8	4,6	343,8		<0,0001
uK/uCreatinina	67	0,64	0,33	0,59	0,15	1,91		0,0013
uNa/uCreatinina	67	0,68	0,53	0,58	0,08	2,47		<0,0001
uP/uCreatinina	66	0,58	0,29	0,57	0,12	1,51		0,0004
uGGT/uCreatinina	57	0,12	0,22	0,0003	0,00002	0,91		<0,0001
uGlucosio/uCreatinina	66	0,33	1,66	0,04	0,01	13,47		<0,0001
uMg/ uCreatinina	66	0,06	0,04	0,06	0,01	0,19		0,0005

Figura 6.10 – Risultati del profilo chimico urinario nella popolazione di cani con CKD oggetto dello studio. Intervalli di riferimento (IR) utilizzati presso il nostro laboratorio (CLINLAB). DS, deviazione standard; DN, distribuzione normale.

RISULTATI DELLE INDAGINI CLINICO-PATOLOGICHE DEGLI STADI IRIS DELLA CKD A CONFRONTO CON I SANI

Di seguito vengono rappresentati, in grafici *box-and-whiskers*, alcuni parametri clinico-patologici statisticamente significativi nel confronto tra 4 stadi IRIS della CKD e i soggetti sani.

Confronto dei risultati dell'emogasanalisi tra i pazienti sani e i 4 stadi IRIS della CKD.

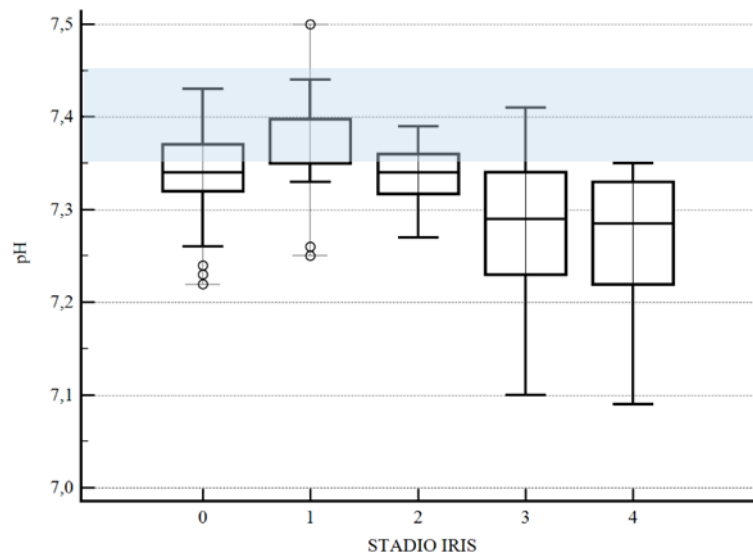


Figura 6.11 - Confronto del pH tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

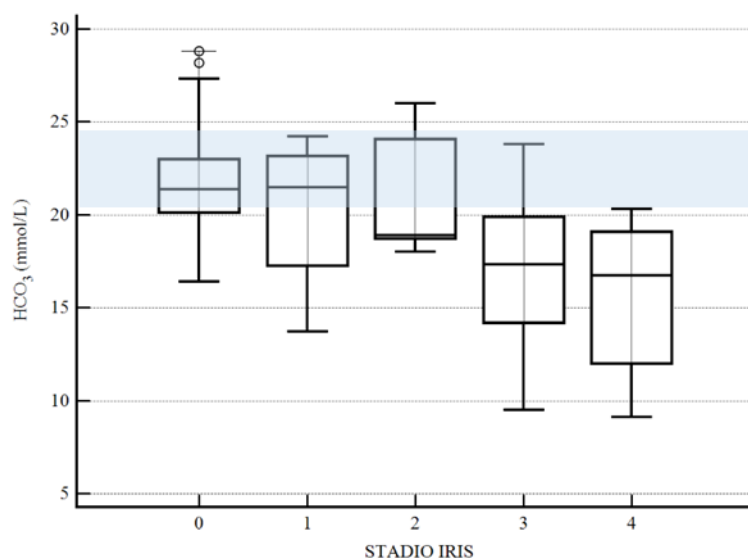


Figura 6.12. Confronto della concentrazione di HCO_3^- tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

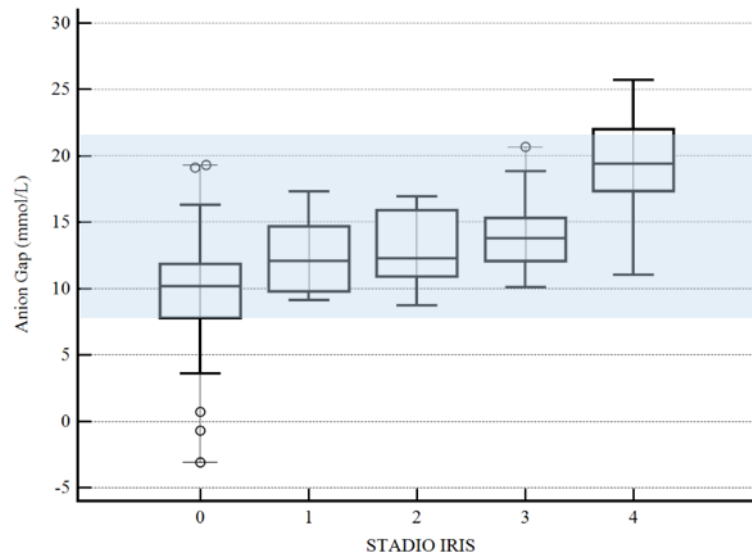


Figura 6.13 - Confronto dell'*anion gap* tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 4 e stadi 1-2-3.

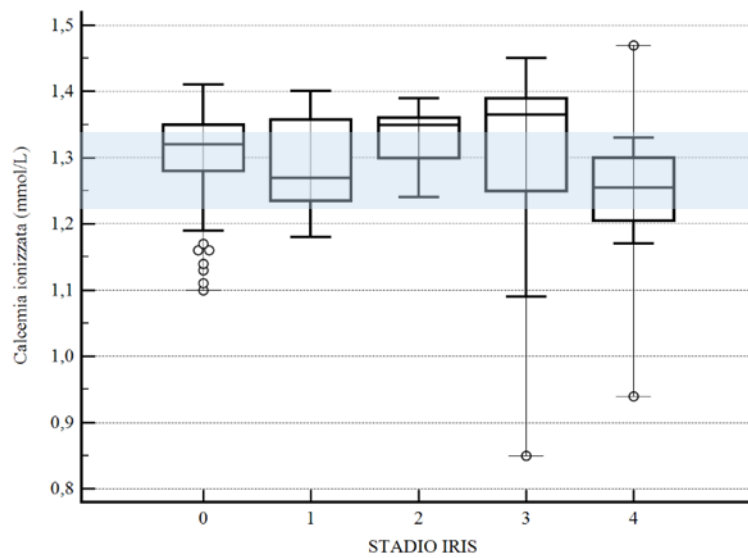


Figura 6.14 - Confronto della calcemia ionizzata tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: stadio 4 e sani, stadi 2-3.

Confronto di alcuni parametri dell'esame emocromocitometrico tra i pazienti sani e i 4 stadi IRIS della CKD.

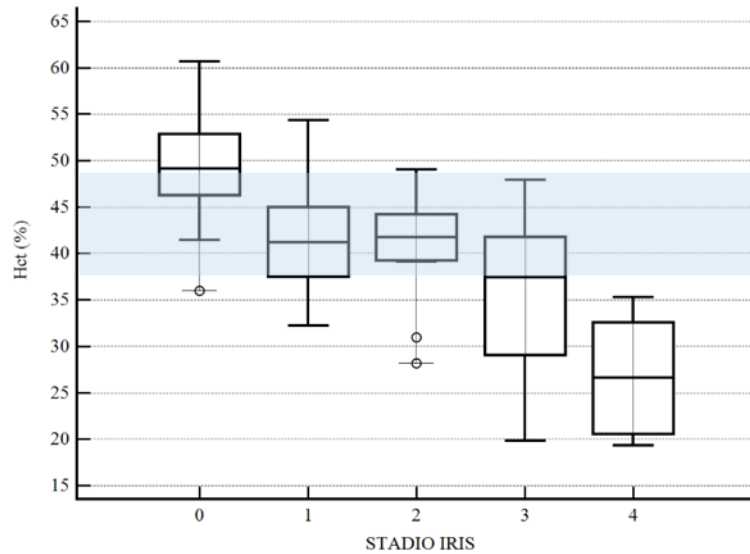


Figura 6.15 - Confronto dell'ematocrito tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadio 4.

Comparazione di alcuni valori della chimica sierica tra i pazienti sani e i 4 stadi IRIS della CKD

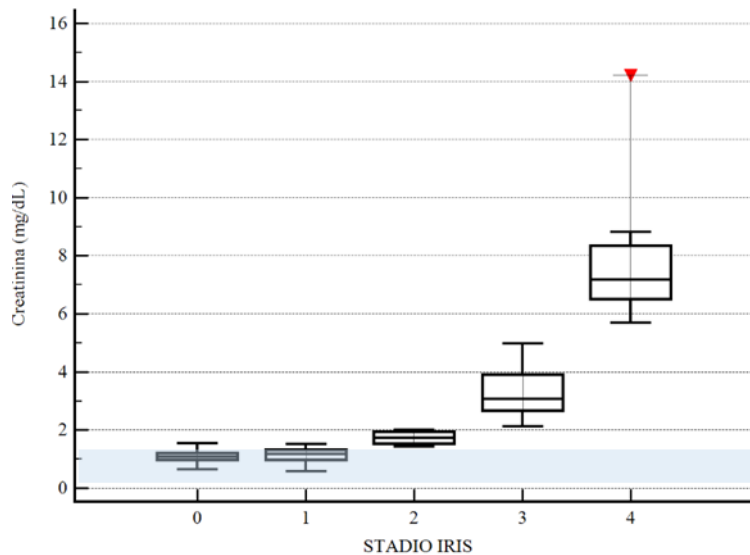


Figura 6.16 - Confronto della concentrazione di creatinina sierica tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4.

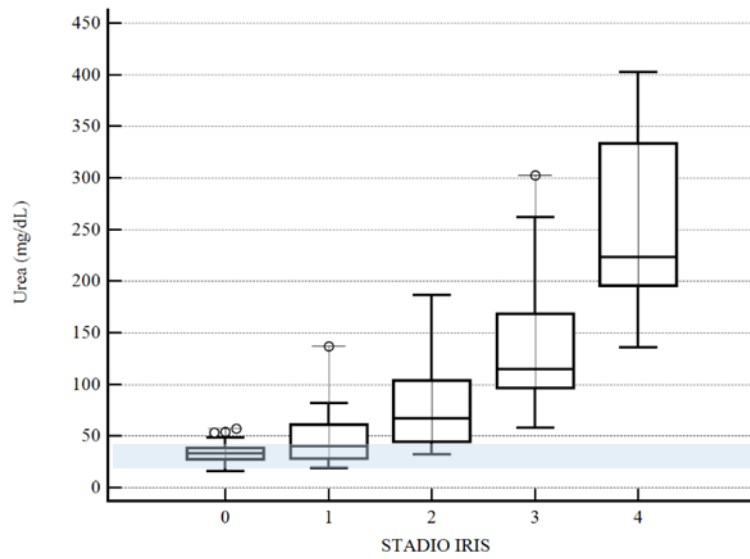


Figura 6.17 - Confronto della concentrazione di urea tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4; stadio 2 e stadi 1-3-4.

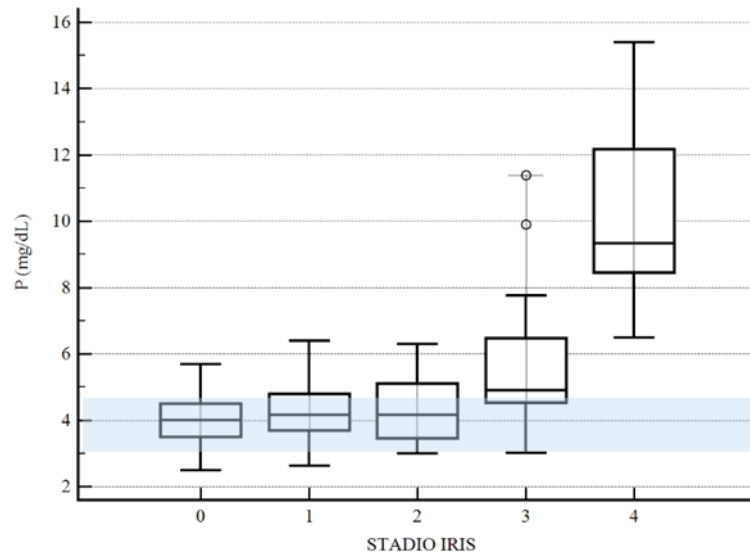


Figura 6.18 - Confronto della concentrazione di fosforo sierico tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: stadio 3 e sani, stadi 1-2-4; stadio 4 e sani, stadi 1-2-3.

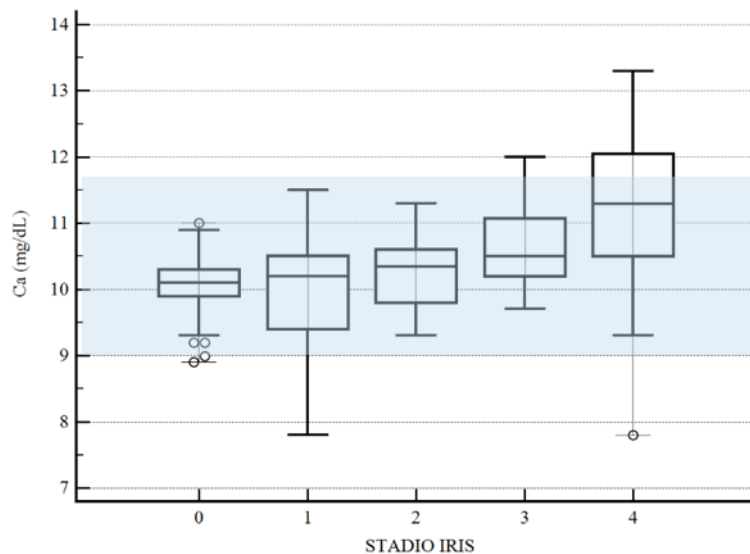


Figura 6.19 - Confronto della concentrazione di calcio totale sierico tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadio 4.

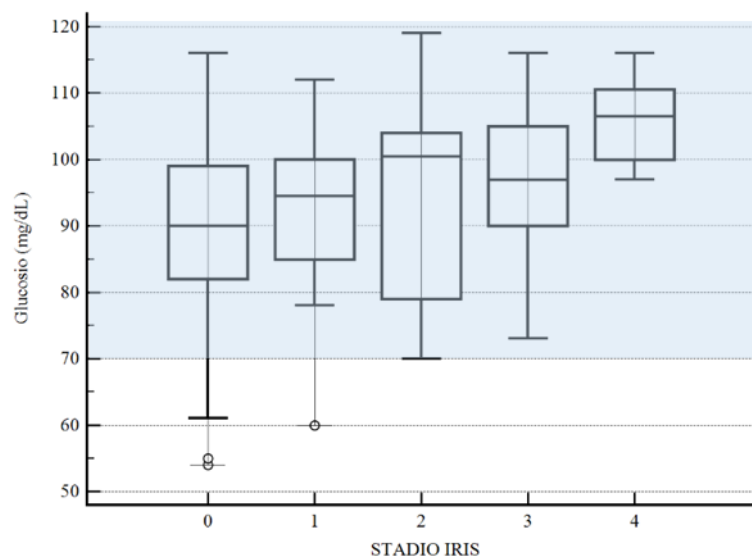


Figura 6.20 - Confronto della concentrazione di glucosio sierico tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 3-4; stadio 4 e stadi 1-2-3.

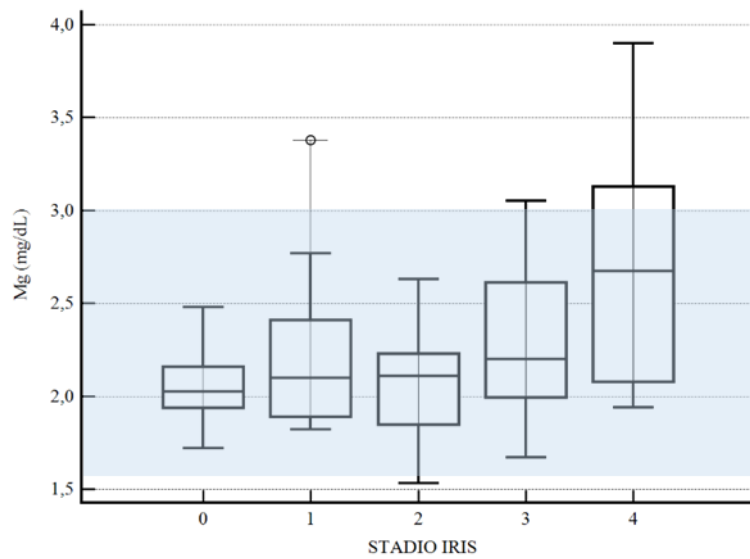


Figura 6.21 - Confronto della concentrazione di magnesio sierico tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 3-4; stadio 4 e stadi 1-2.

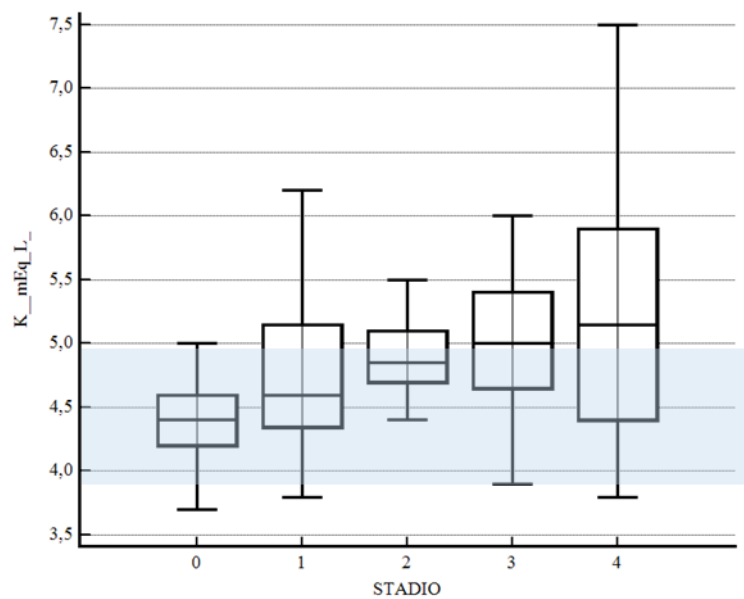


Figura 6.22 - Confronto della concentrazione di potassio sierico tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4.

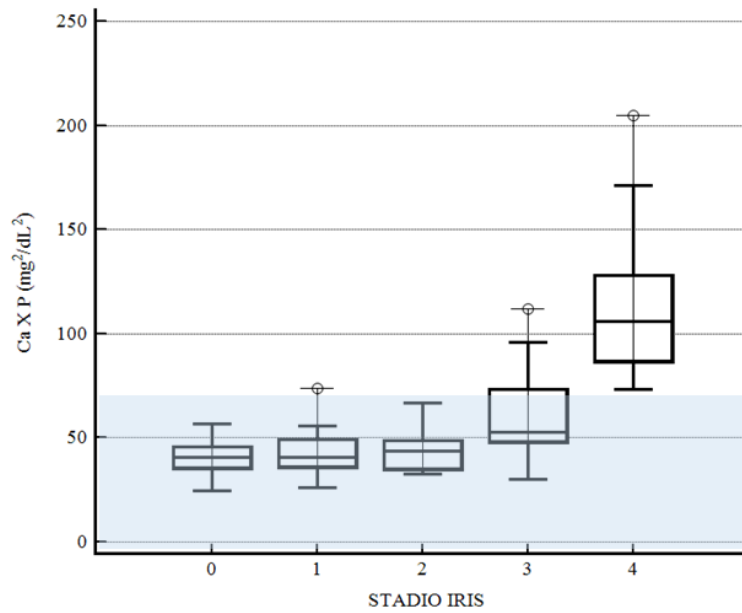


Figura 6.23 - Confronto del prodotto calcio-fosforo sierico tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: stadio 3 e sani, stadi 1-2-4; stadio 4 e sani, stadi 1-2-3.

La concentrazione sierica di sodio e cloro non presenta variazioni significative nei vari stadi della CKD.

Comparazione di alcuni valori della chimica urinaria tra i pazienti sani e i 4 stadi IRIS della CKD

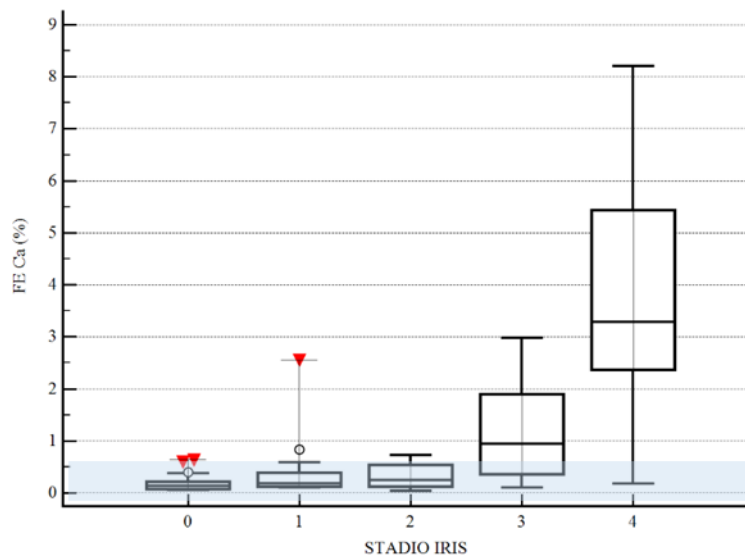


Figura 6.24 - Confronto della FE Ca tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

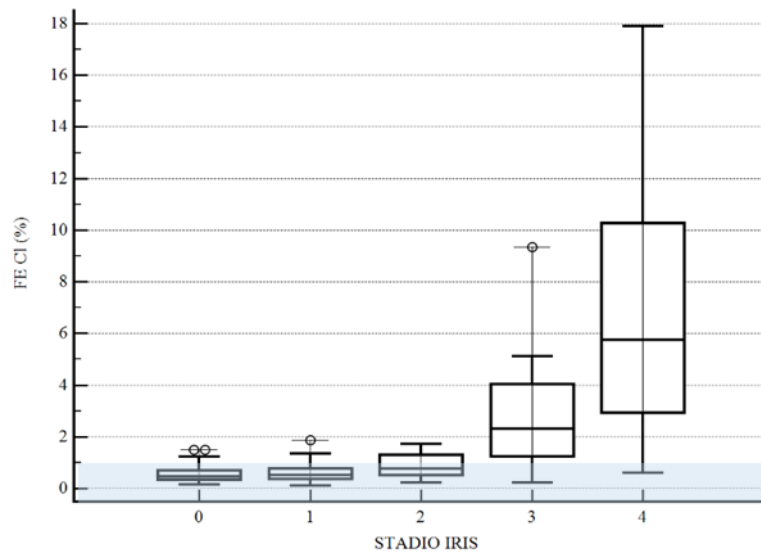


Figura 6.25 - Confronto della FECl tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

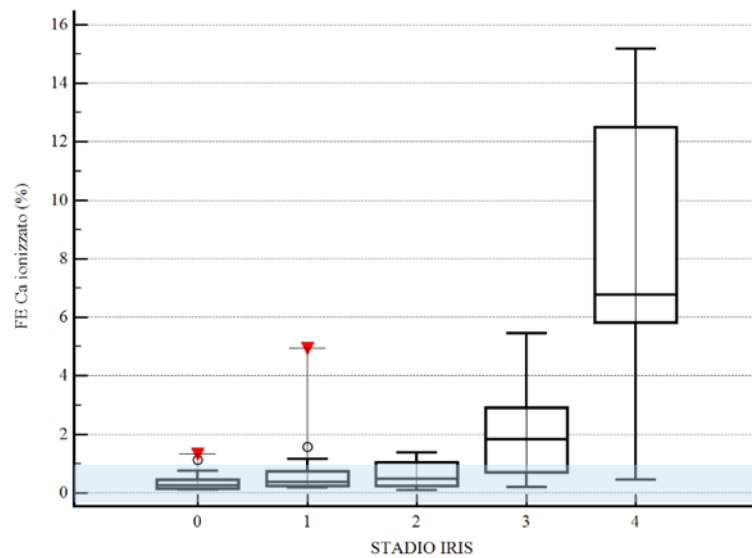


Figura 6.26 Confronto della FE calcio ionizzato (FE iCa) tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

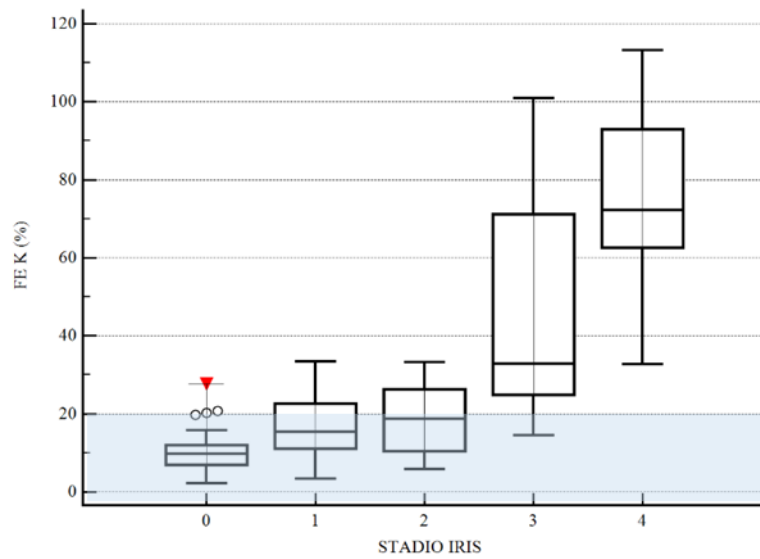


Figura 6.27 - Confronto della FEK tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

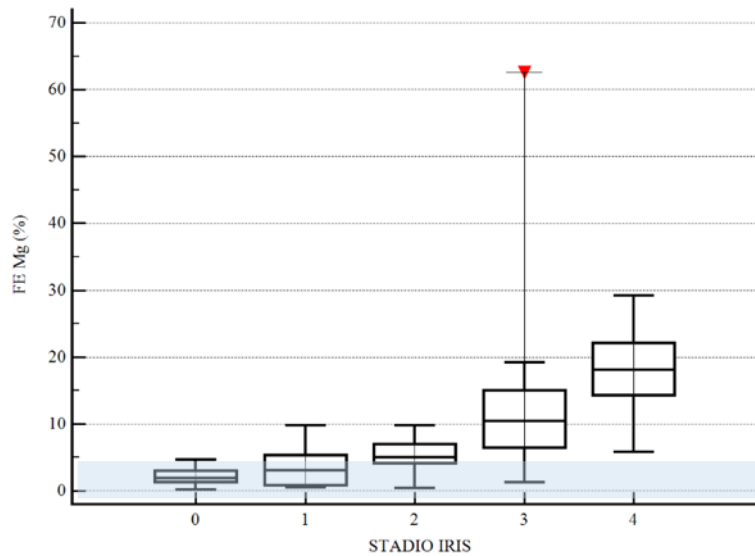


Figura 6.28 - Confronto della FEMg tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4; stadio 2 e stadio 4.

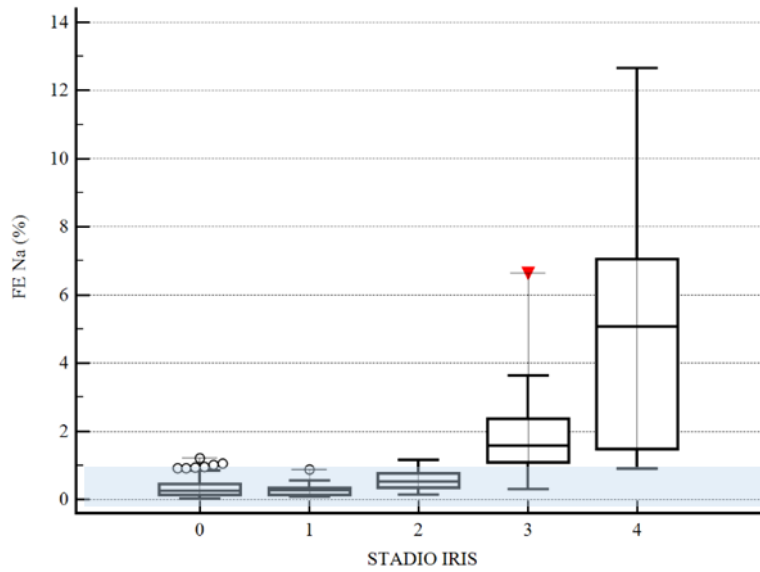


Figura 6.29 - Confronto della FENa tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

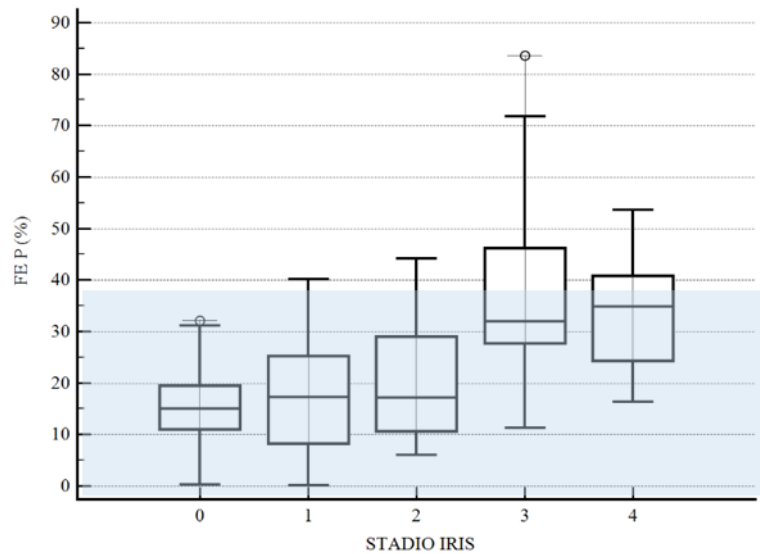


Figura 6.30 - Confronto della FEP tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P<0,05$) si hanno tra: sani e stadi 3-4; stadio 1 e stadi 3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

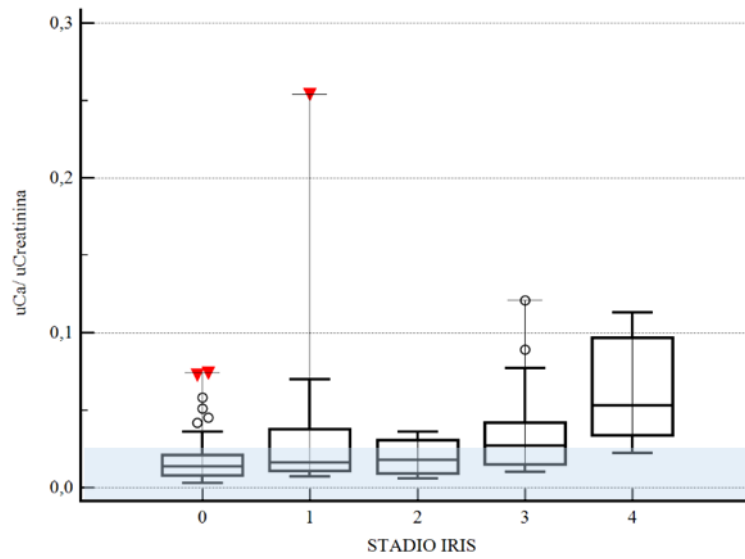


Figura 6.31 - Confronto del rapporto uCa/uCreatinina tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-3-4; stadio 1 e stadio 4; stadio 2 e stadio 4; stadio 3 e stadio 4.

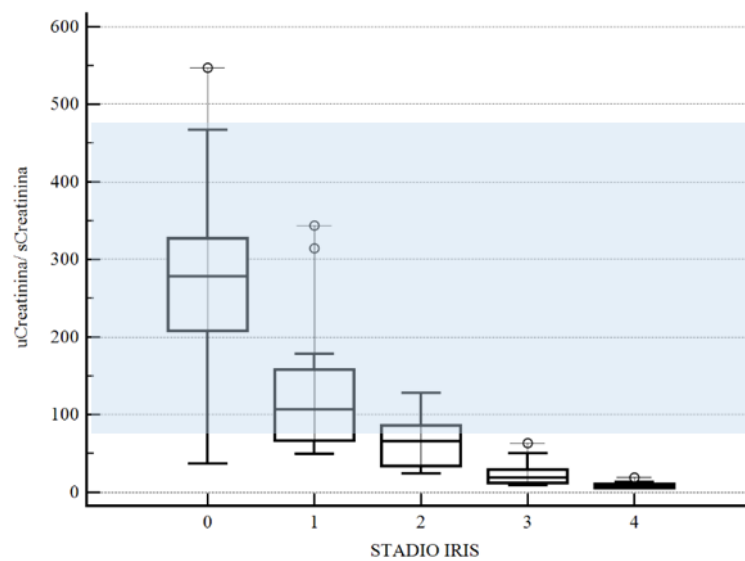


Figura 6.32 - Confronto del rapporto uCreatinina/sCreatinina tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4; stadio 2 e stadi 3-4.

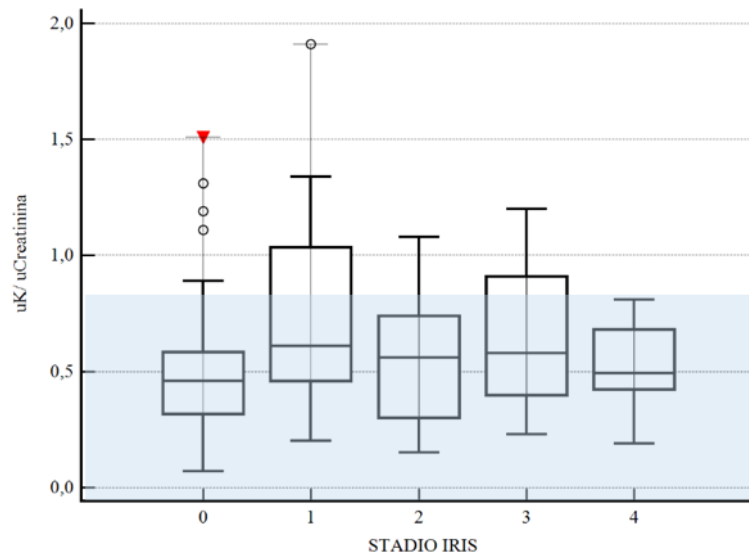


Figura 6.33 - Confronto del rapporto uK/uCreatinina tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-3.

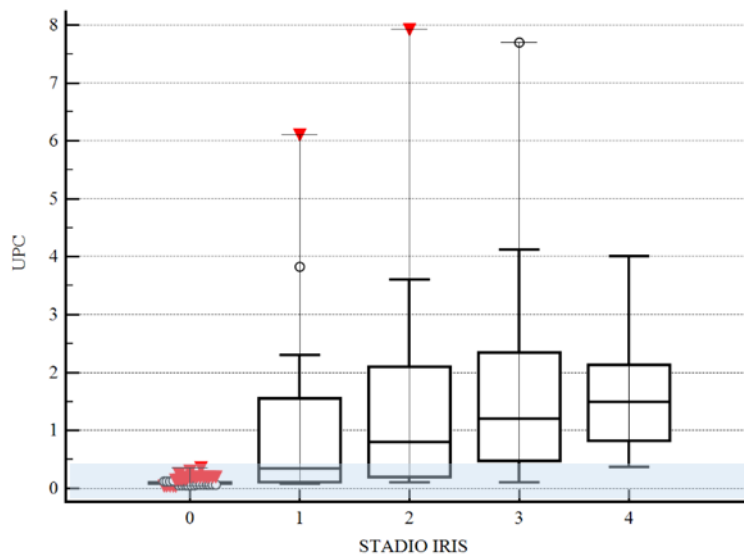


Figura 6.34 - Confronto del rapporto proteine urinarie/ creatinina urinaria (UPC) tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4.

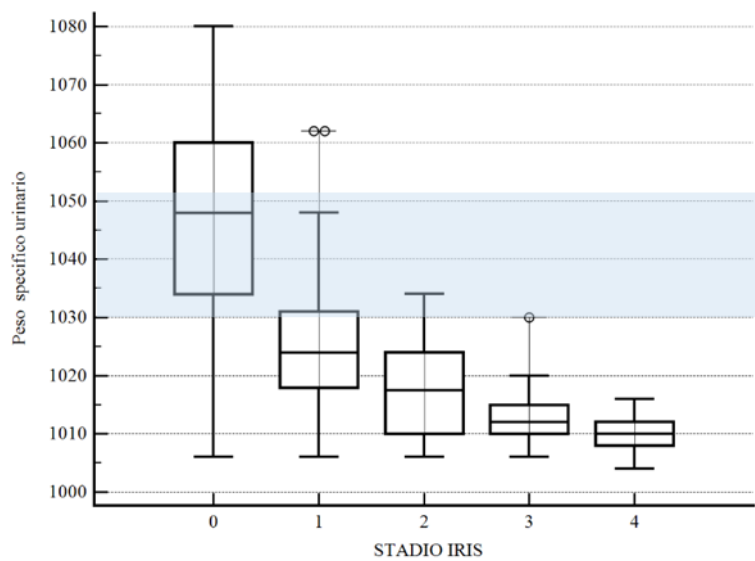


Figura 6.35 - Confronto del peso specifico urinario tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 1-2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4.

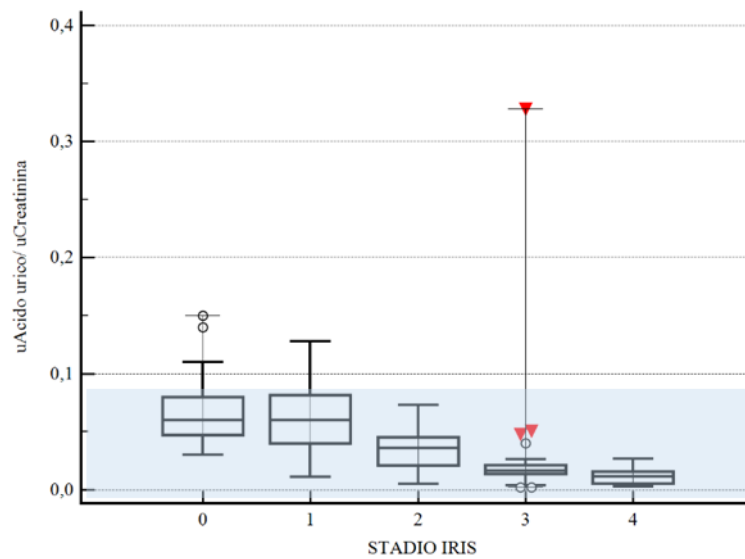


Figura 6.36 - Confronto del rapporto uAcido urico/uCreatinina tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 2-3-4; stadio 1 e stadi 2-3-4; stadio 2 e stadio 4.

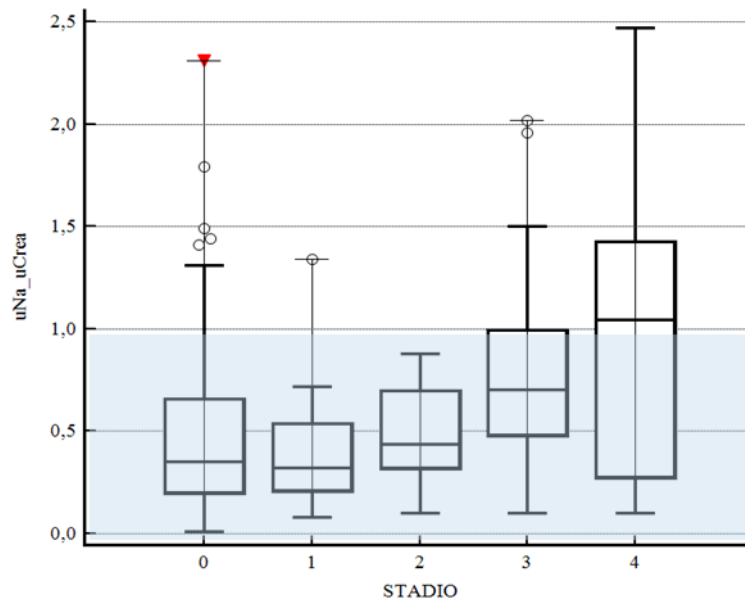


Figura 6.37 - Confronto del rapporto uNa/uCreatinina tra i sani e i 4 stadi IRIS della CKD (sani =0; stadio 1=1; stadio 2=2; stadio 3=3; stadio 4=4). Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e stadi 2-3-4; stadio 1 e stadi 3-4.

La FE dell'urea presenta differenze statisticamente significative tra sani e i vari stadi della CKD, mentre il rapporto uCloro/uCreatinina differisce tra sani e cani in stadio 3-4, uMg/uCreatinina presenta differenze statisticamente significative tra sani e pazienti in stadio 2-3-4. Per quanto riguarda il rapporto uP/uCreatinina non presenta differenze statisticamente significativa tra i diversi stadi.

RISULTATI DELLE INDAGINI CLINICO-PATOLOGICHE DEI PAZIENTI CKD CONFRONTATI CON PAZIENTI SANI E PAZIENTI CON DANNO RENALE ACUTO (AKI)

Di seguito vengono rappresentati, in grafici *box-and-whiskers*, alcuni parametri clinico-patologici statisticamente significativi nel confronto tra sani, cani con CKD e soggetti in AKI.

Confronto dei risultati dell'emogasanalisi tra i pazienti sani, con CKD e AKI.

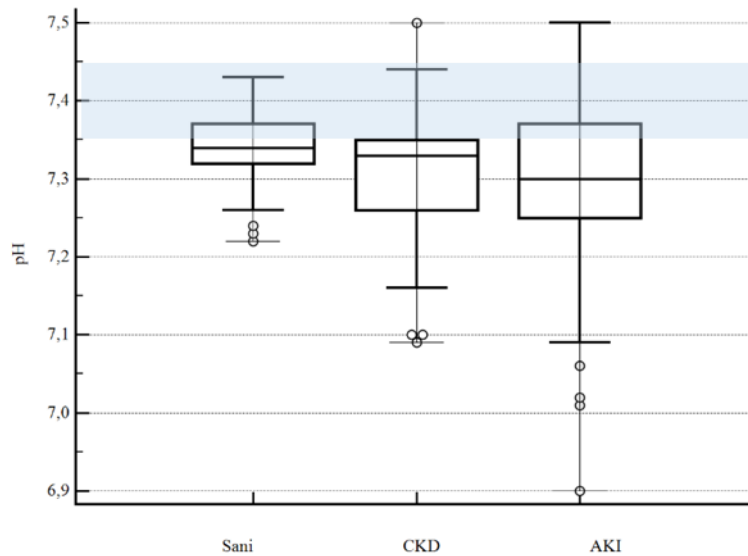


Figura 6.38 - Confronto del valore pH tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

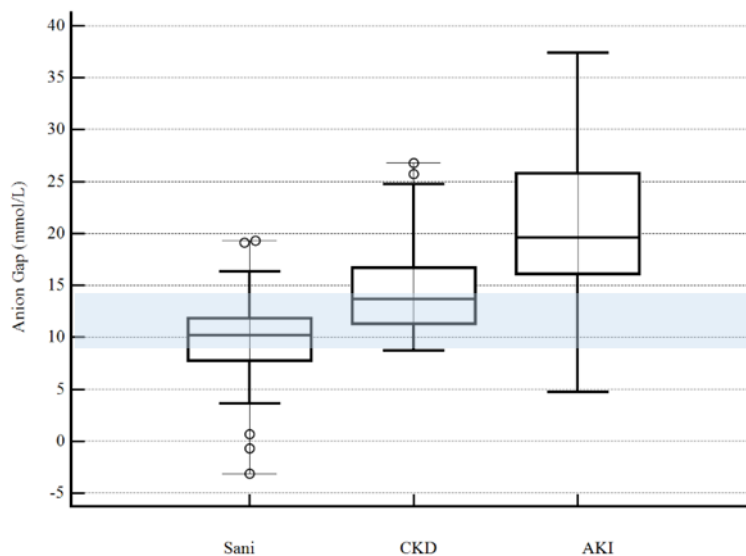


Figura 6.39 - Confronto del valore di *anion gap* tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

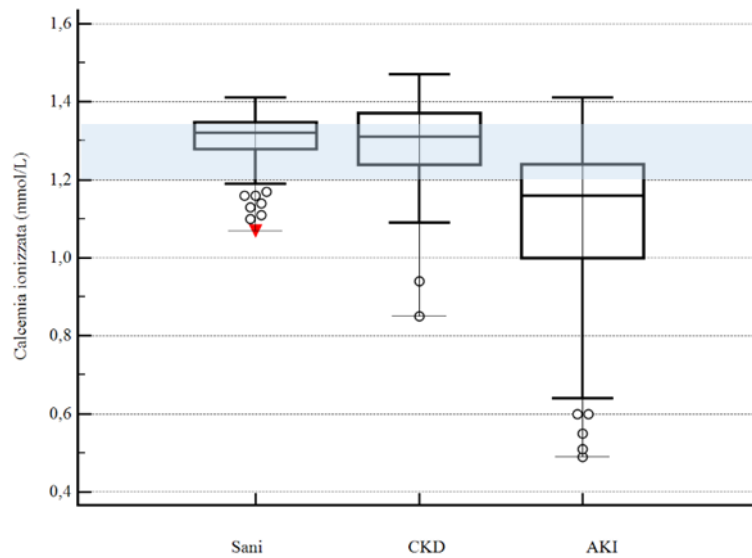


Figura 6.40 - Confronto della concentrazione di calcio ionizzato tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e AKI; AKI e CKD.

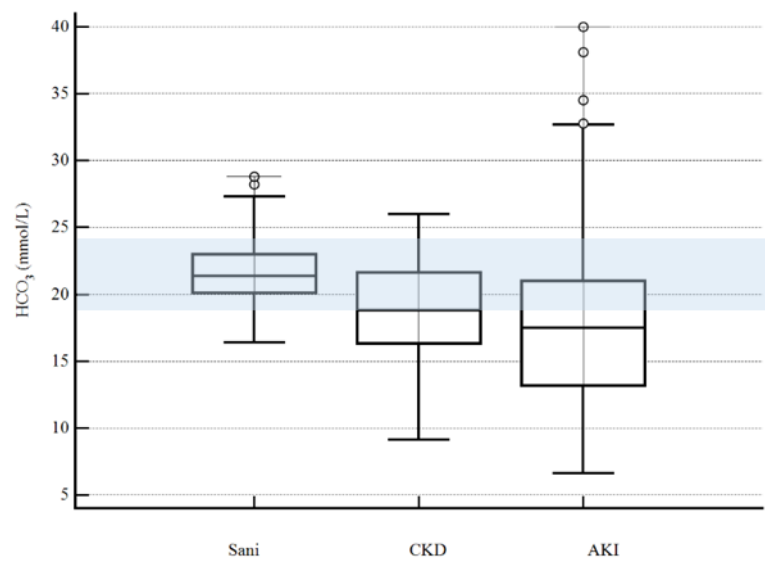


Figura 6.41 - Confronto della concentrazione di HCO_3^- tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

Confronto dei risultati dell'esame emocromocitometrico tra i pazienti sani, con CKD e AKI.

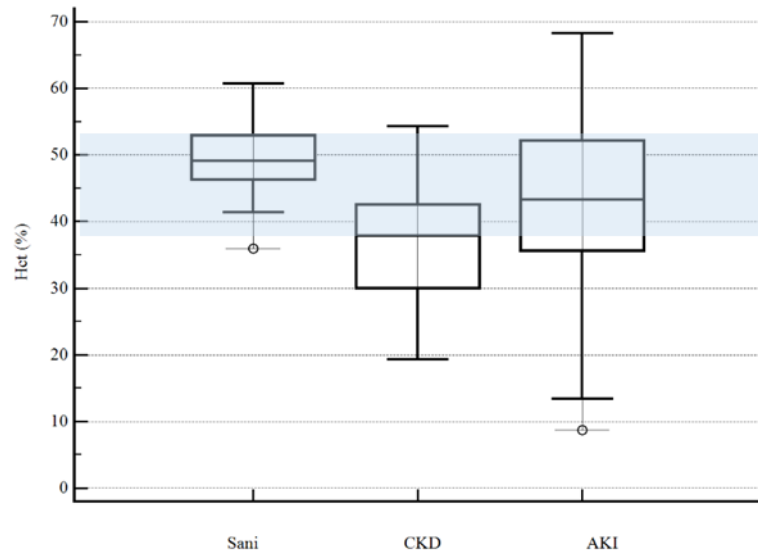


Figura 6.42 - Confronto del valore di ematocrito tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

Confronto dei risultati dell'esame emocromocitometrico tra i pazienti sani, con CKD e AKI.

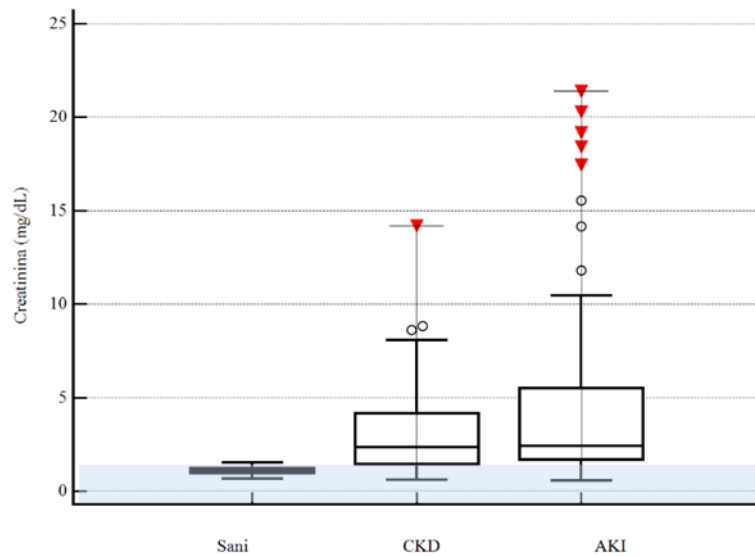


Figura 6.43 - Confronto della concentrazione di creatinina sierica tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

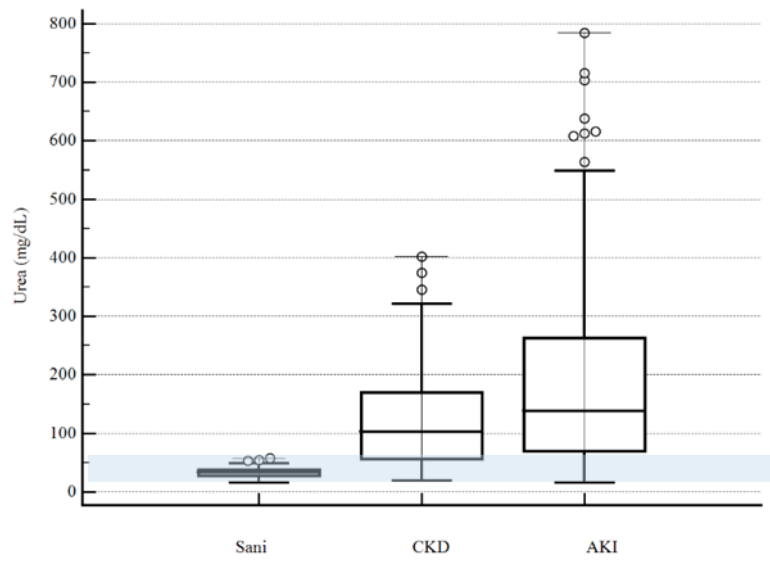


Figura 6.44 - Confronto della concentrazione di urea sierica tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

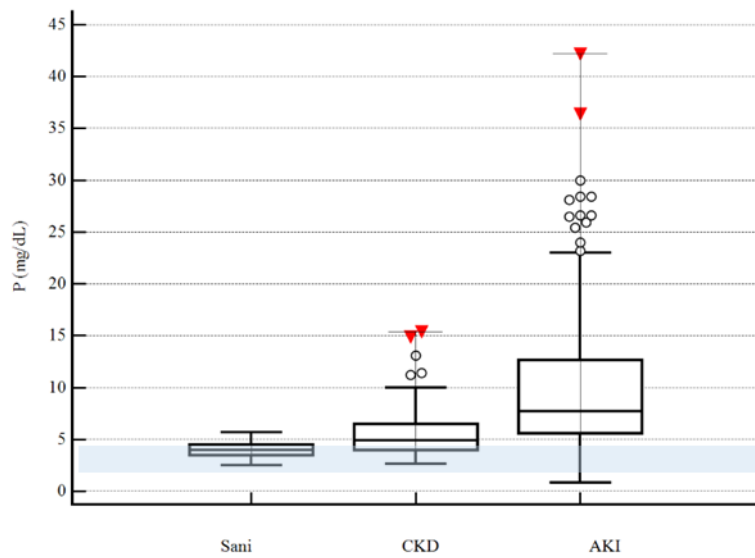


Figura 6.45 - Confronto della concentrazione di fosforo sierico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

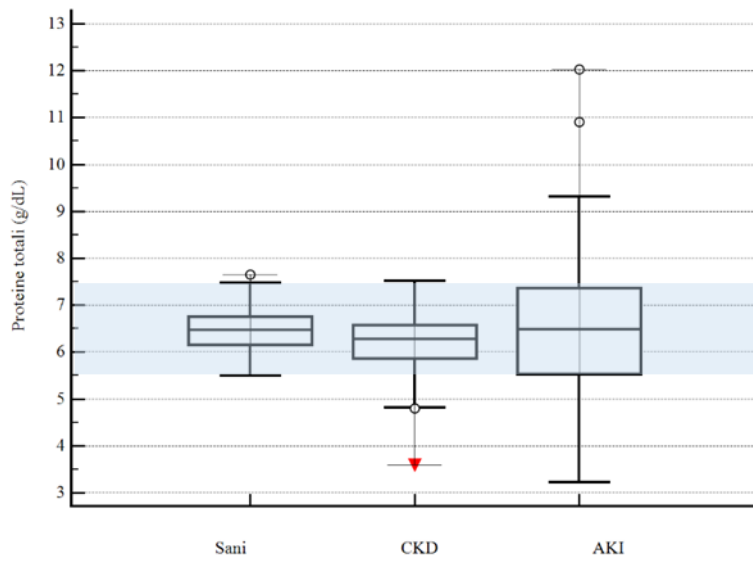


Figura 6.46 - Confronto della concentrazione di proteine totali tra i sani, CKD e AKI. Non sono presenti differenze statisticamente significative.

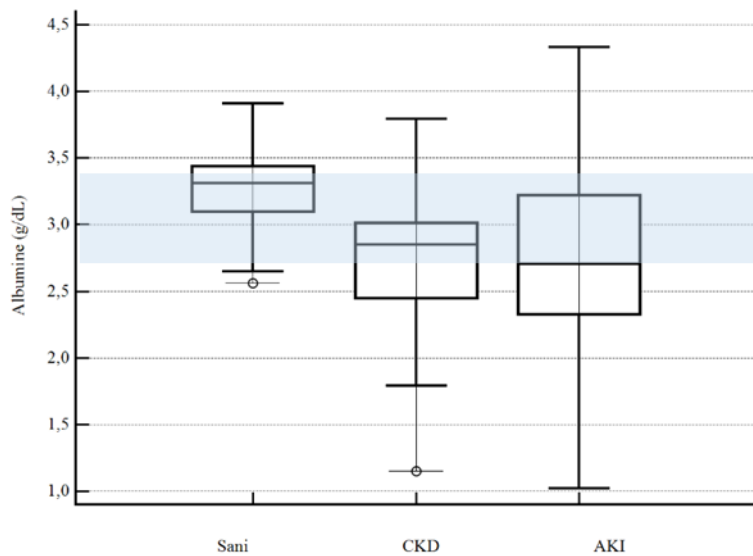


Figura 6.47 - Confronto della concentrazione di albumina sierica tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

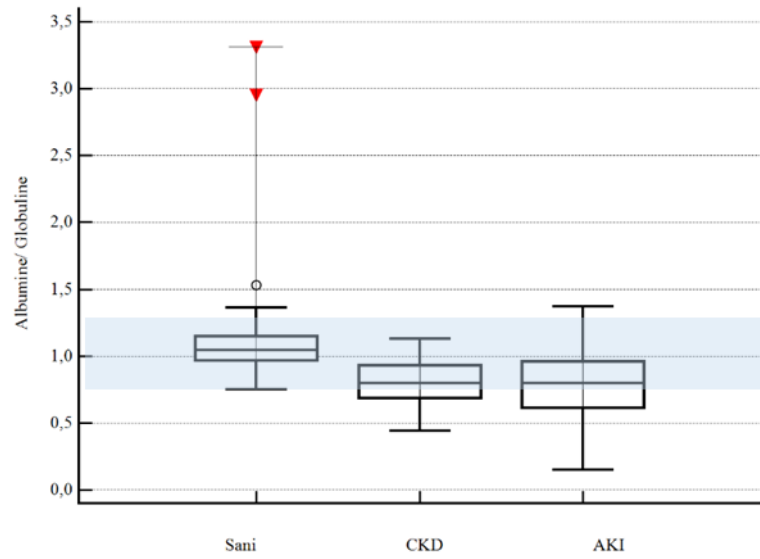


Figura 6.48 - Confronto del rapporto albumine /globuline tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

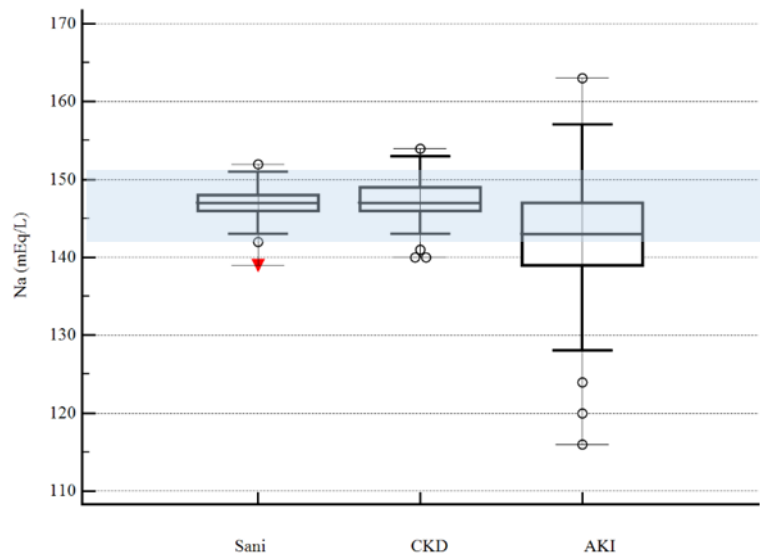


Figura 6.49 - Confronto della concentrazione di Na sierico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: AKI e sani, CKD.

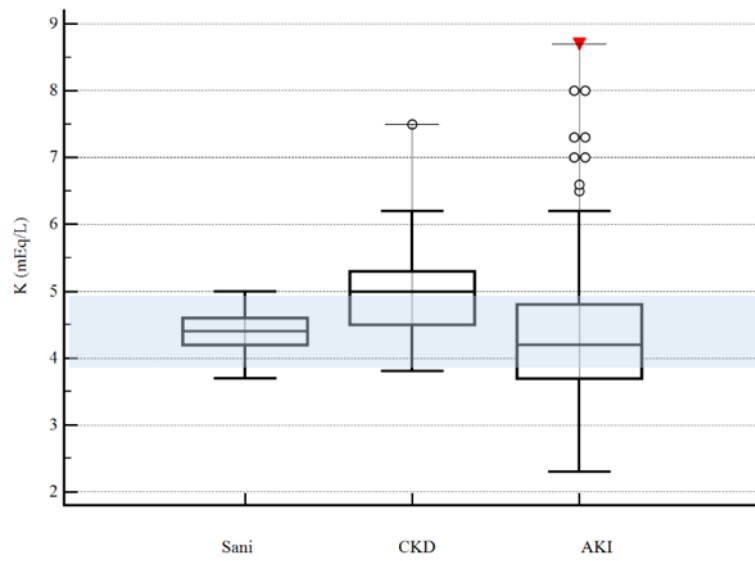


Figura 6.50 - Confronto della concentrazione di potassio sierico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: CKD e sani, AKI.

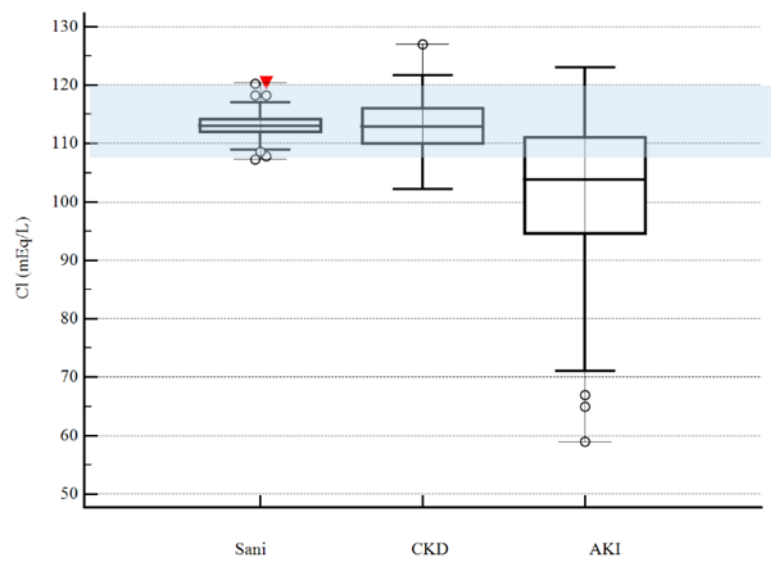


Figura 6.51 - Confronto della concentrazione di cloro sierico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: AKI e sani, CKD.

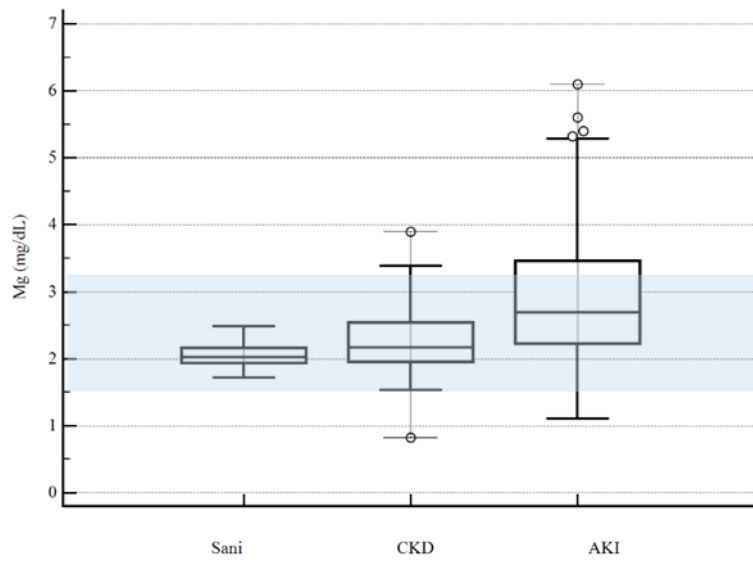


Figura 6.52 - Confronto della concentrazione di magnesio sierico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

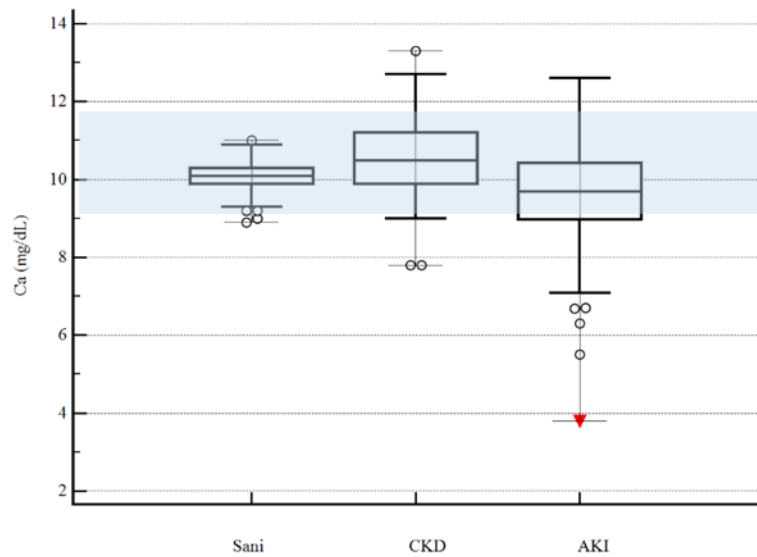


Figura 6.53 - Confronto della concentrazione di calcio totale sierico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

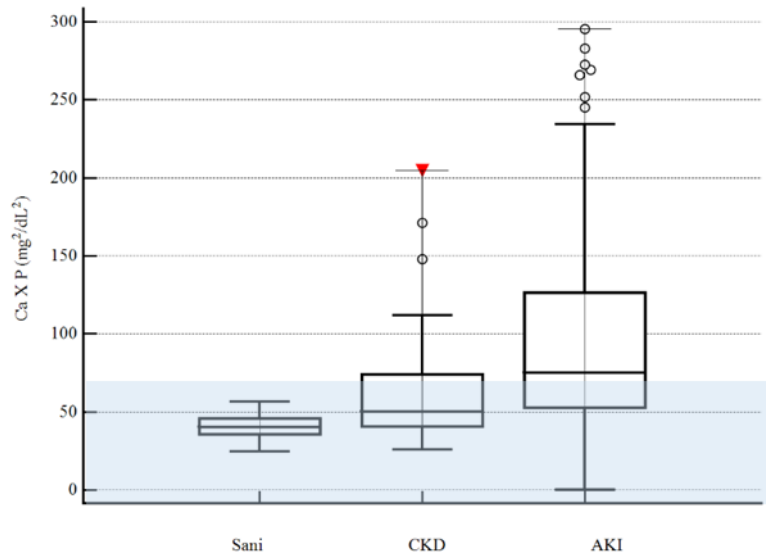


Figura 6.54 - Confronto del prodotto calcio-fosforo tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

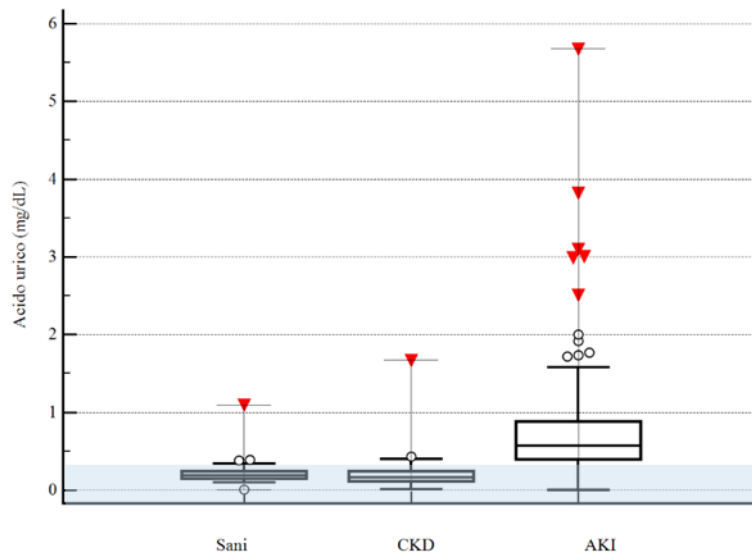


Figura 6.55 - Confronto della concentrazione di acido urico tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: AKI e sani, CKD.

Confronto dei risultati del profilo chimico urinario tra i pazienti sani, con CKD e AKI.

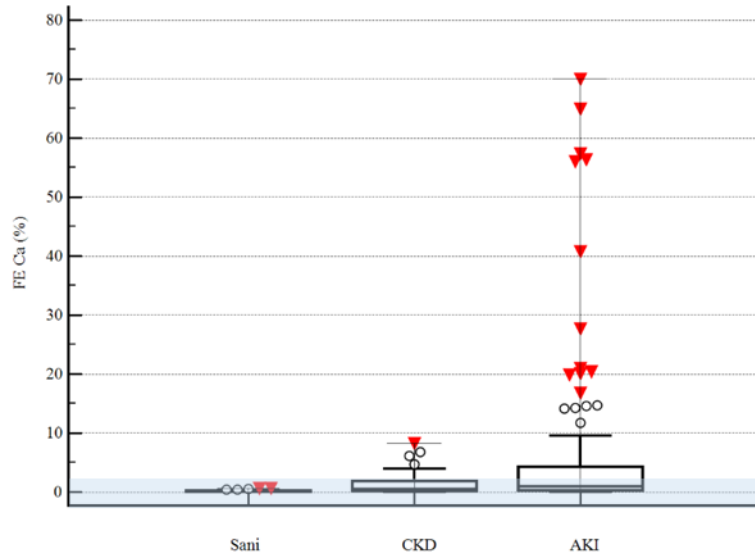


Figura 6.56 - Confronto della frazione di escrezione di calcio totale tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

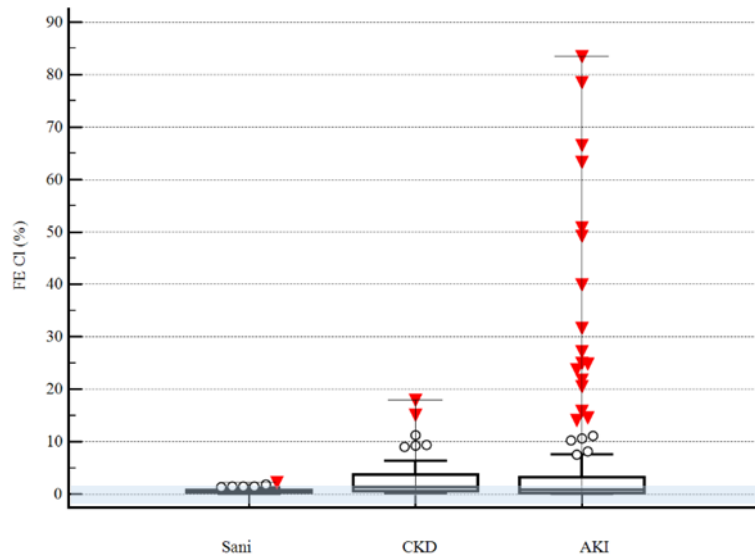


Figura 6.57 - Confronto della frazione di escrezione di cloro tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

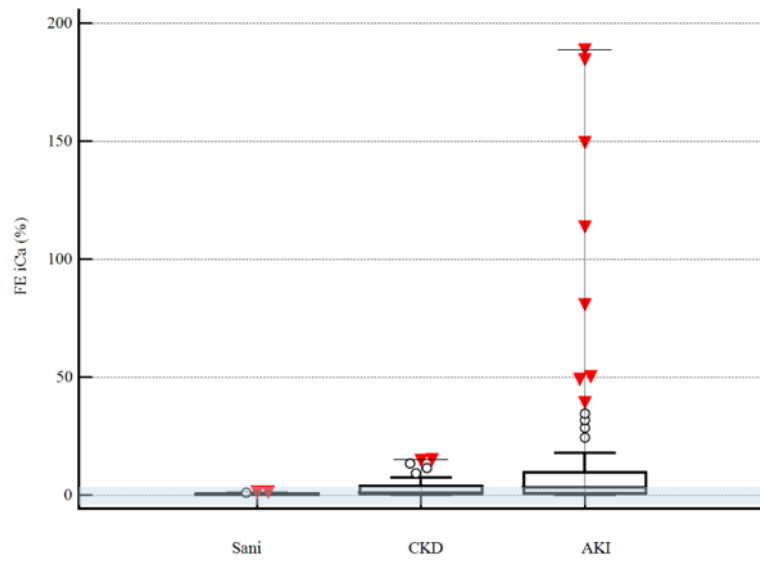


Figura 6.58 - Confronto della frazione di escrezione di calcio ionizzato tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

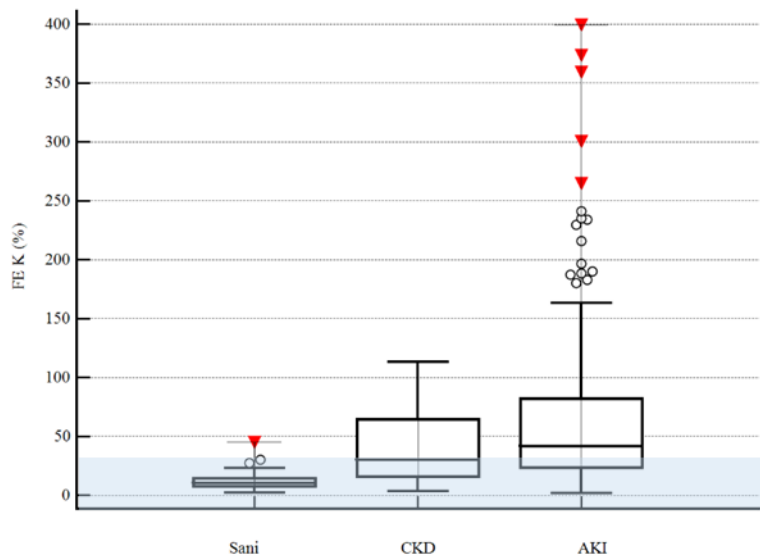


Figura 6.59 - Confronto della frazione di escrezione di potassio tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

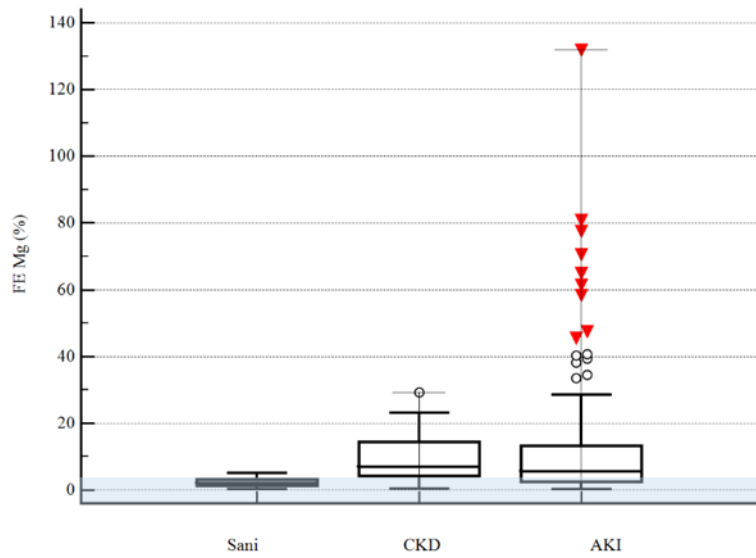


Figura 6.60 - Confronto della frazione di escrezione di magnesio tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

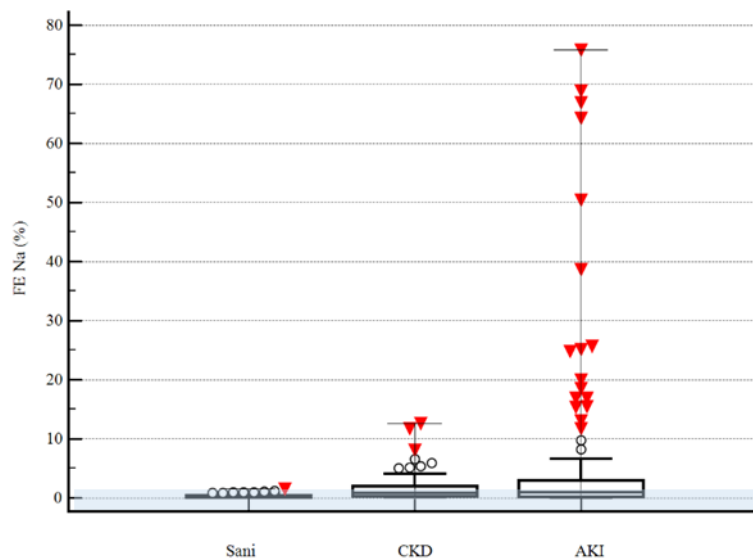


Figura 6.61 - Confronto della frazione di escrezione di sodio tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

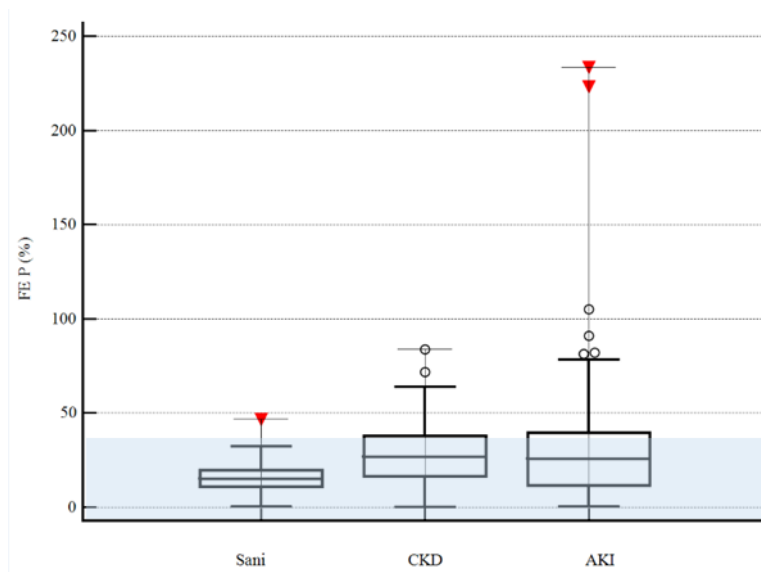


Figura 6.62 - Confronto della frazione di escrezione di fosforo tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

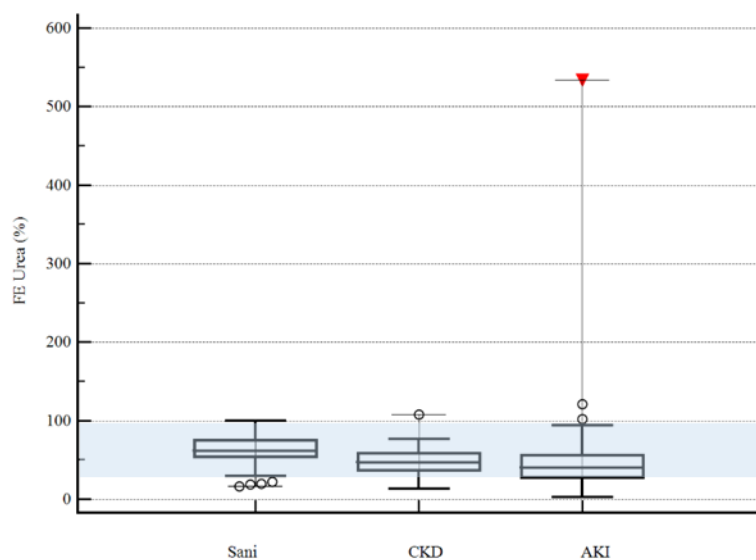


Figura 6.63 - Confronto della frazione di escrezione dell'urea tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

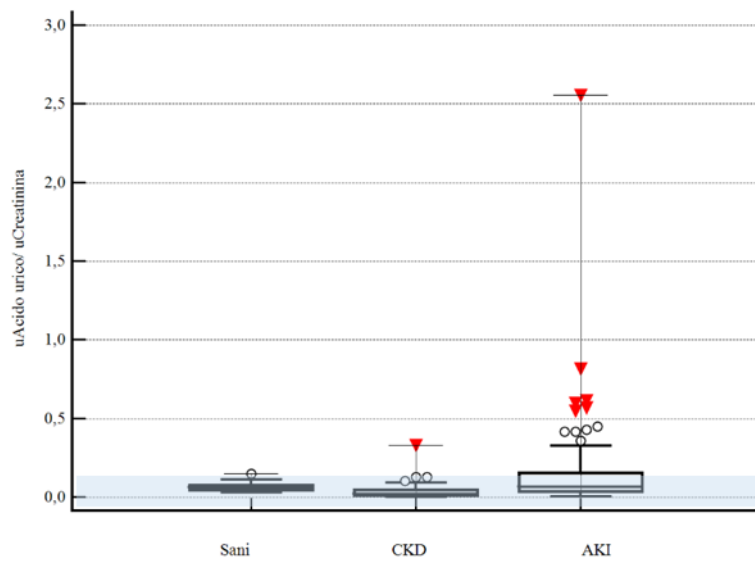


Figura 6.64 - Confronto del rapporto uAcido urico/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: CKD e sani, AKI.

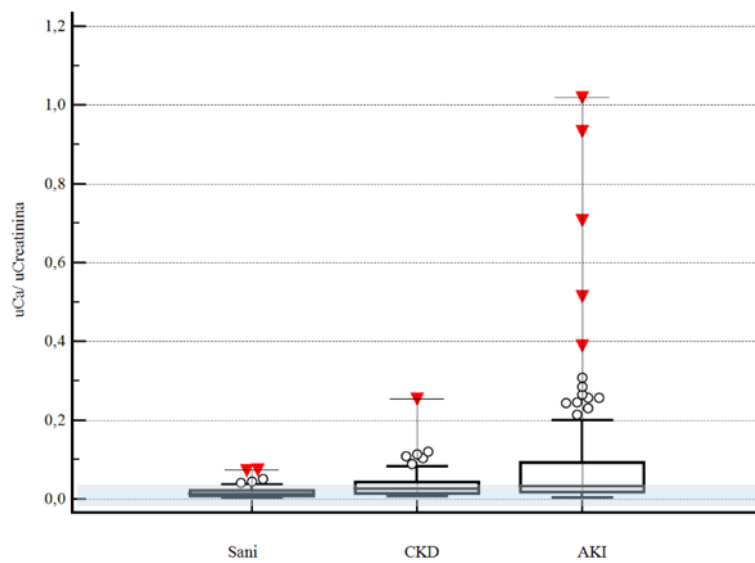


Figura 6.65 - Confronto del rapporto uCa/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

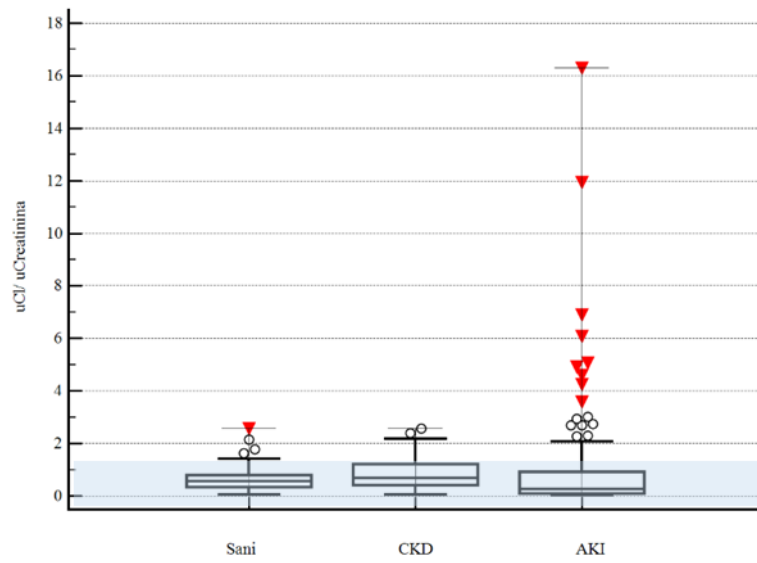


Figura 6.66 - Confronto del rapporto uCl/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: AKI e sani, CKD.

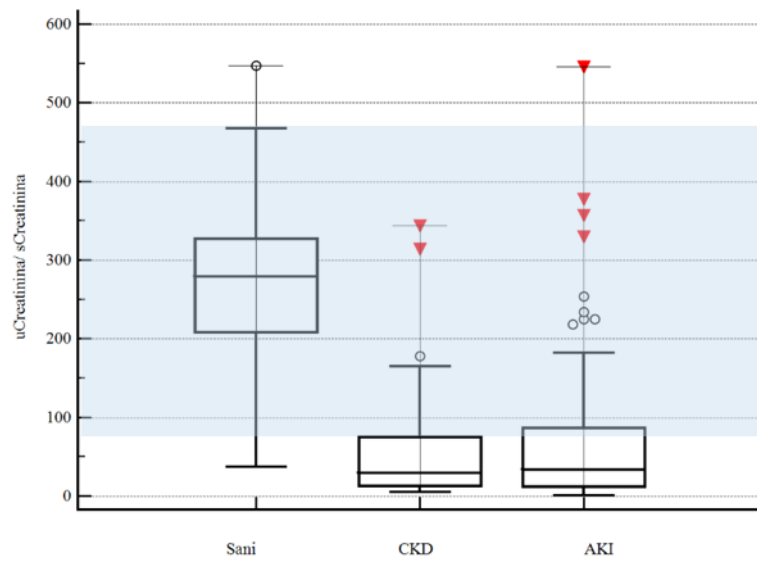


Figura 6.67 - Confronto del rapporto uCreatinina/ sCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

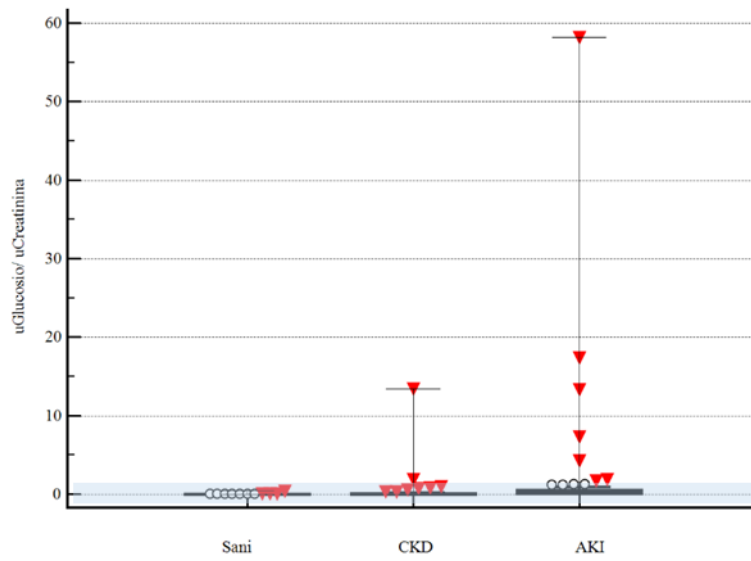


Figura 6.68 - Confronto del rapporto uGlucosio/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI; CKD e AKI.

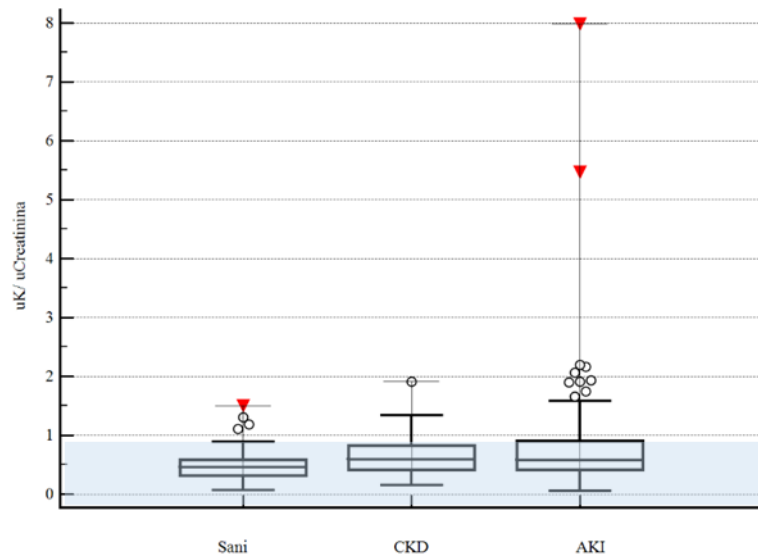


Figura 6.69 - Confronto del rapporto uK/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

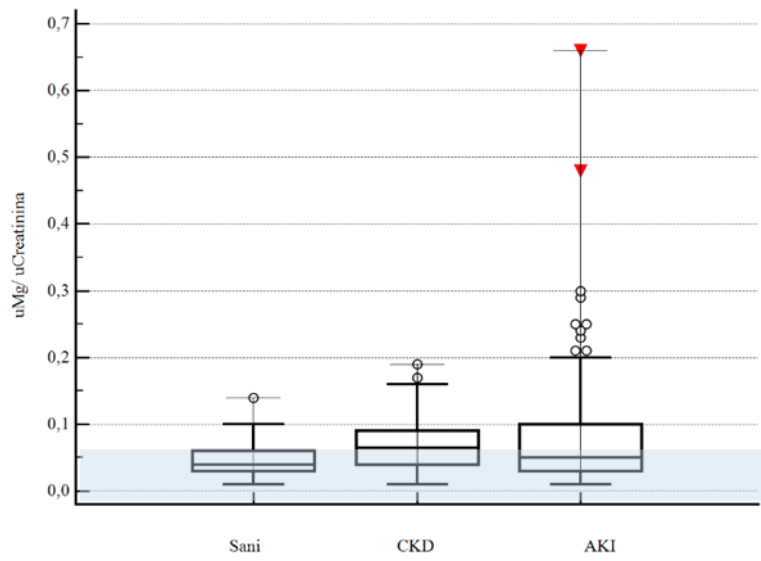


Figura 6.70 - Confronto del rapporto uMg/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD, AKI.

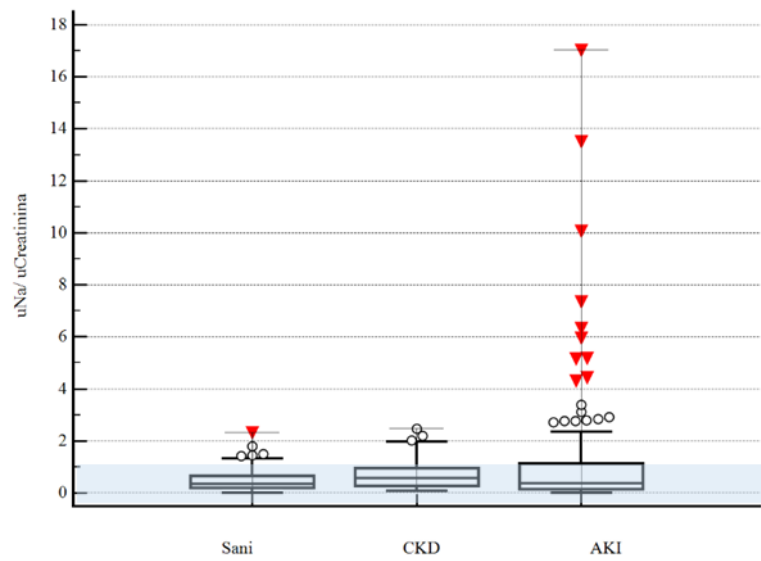


Figura 6.71 - Confronto del rapporto uNa/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Le differenze statisticamente significative ($P < 0,05$) si hanno tra: sani e CKD.

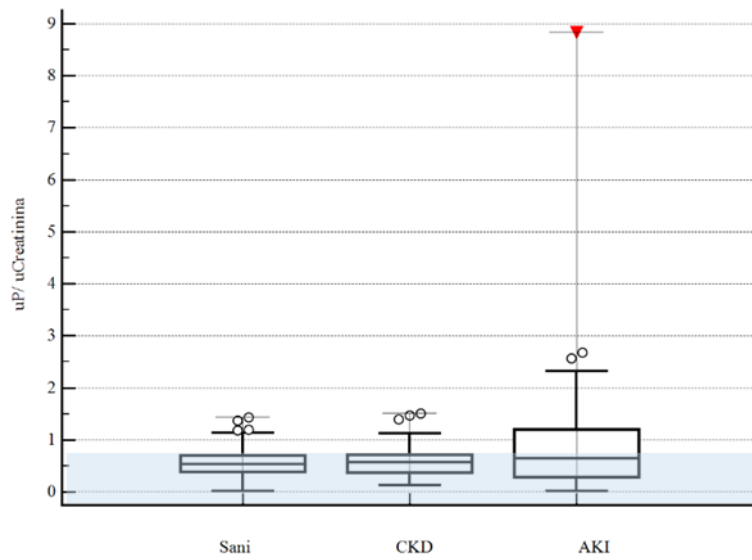


Figura 6.72 - Confronto del rapporto uP/ uCreatinina tra i sani, CKD e AKI. Non sono presenti differenze statisticamente significative.

Analisi tramite curva di ROC di alcuni parametri per valutare il potere discriminativo tra i pazienti con malattia renale cronica e quelli con danno renale acuto

Sono state prese in considerazione alcune variabili della chimica urinaria risultate statisticamente differenti nelle tre popolazioni prese in esame.

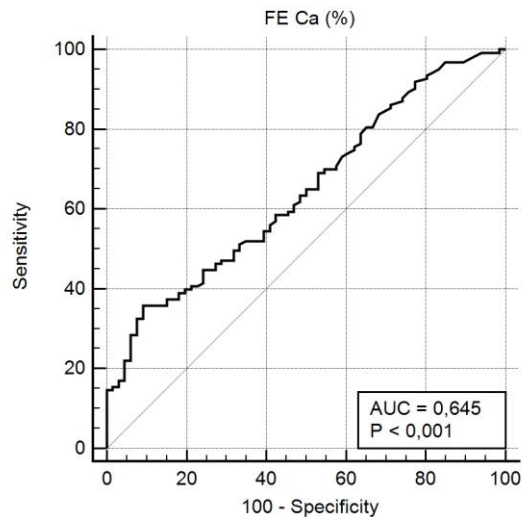


Figura 6.73 - curva di ROC sul confronto della FE Ca per la discriminazione tra AKI e CKD. L'area sotto la curva (AUC) è di 0,64. Specificità 90,9% e sensibilità 35,8%.

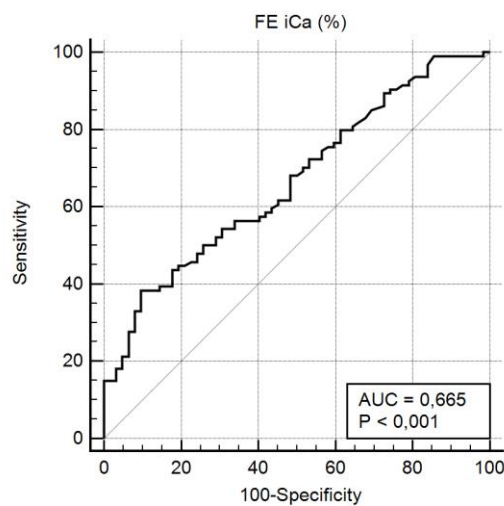


Figura 6.74 - curva di ROC sul confronto della FE iCa per la discriminazione tra AKI e CKD. L'area sotto la curva (AUC) è di 0,66. Specificità 90,3% e sensibilità 38,3%.

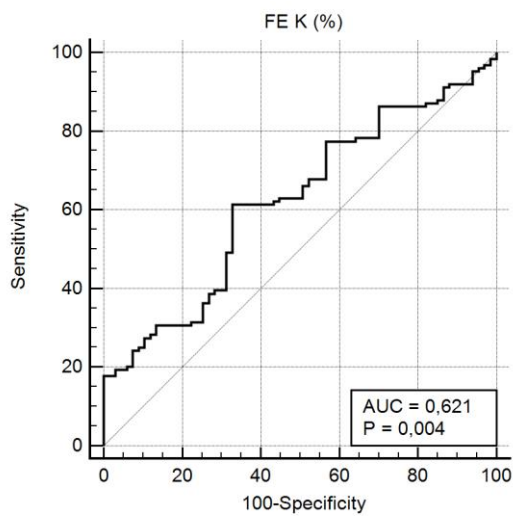


Figura 6.75 - curva di ROC sul confronto della FE K per la discriminazione tra AKI e CKD. L'area sotto la curva (AUC) è di 0,62. Specificità 67,2% e sensibilità 61,3%.

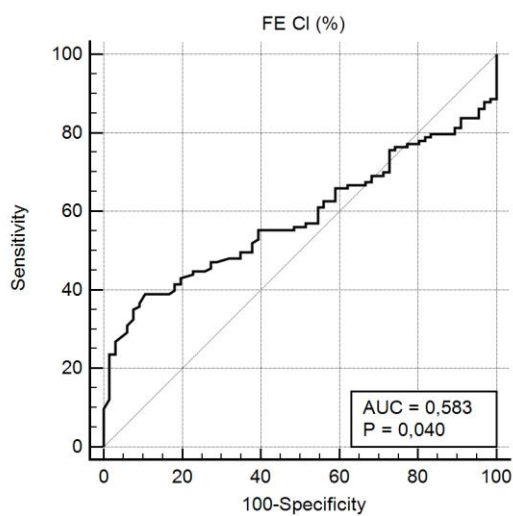


Figura 6.76 - curva di ROC sul confronto della FE Cl per la discriminazione tra AKI e CKD. L'area sotto la curva (AUC) è di 0,58. Specificità 89,4% e sensibilità 39,0%.

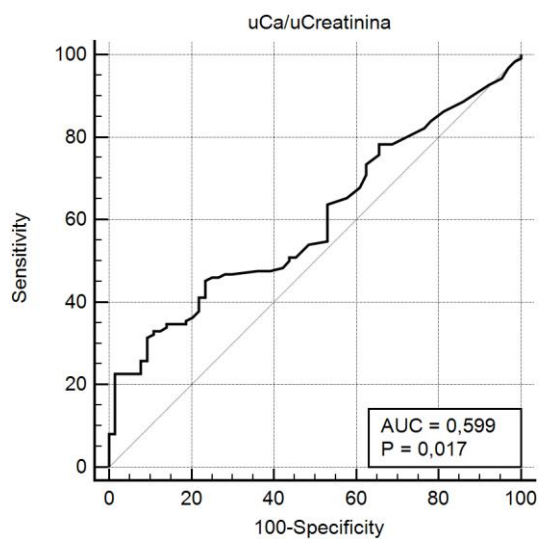


Figura 6.77 - curva di ROC sul confronto del rapporto tra calcio urinario e creatinina urinaria per la discriminazione tra AKI e CKD. L'area sotto la curva (AUC) è di 0,59. Specificità 89,1% e sensibilità 33,1%.

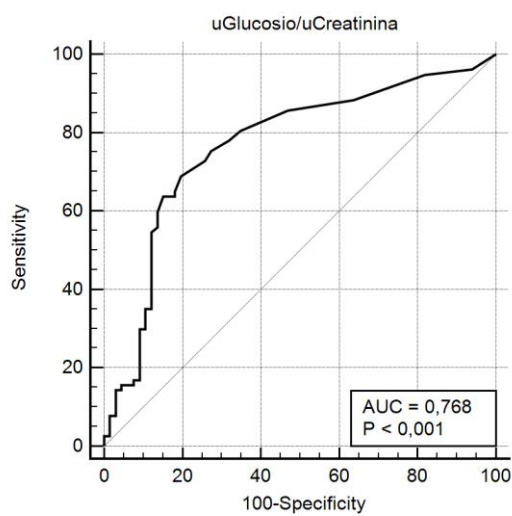


Figura 6.78 - curva di ROC sul confronto del rapporto tra glucosio urinario e creatinina urinaria per la discriminazione tra AKI e CKD. L'area sotto la curva (AUC) è di 0,76. Specificità 80,3% e sensibilità 68,8%.

CAPITOLO 7

DISCUSSIONE

L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di ricercare dei potenziali marker di danno renale acuto e malattia renale cronica, idealmente capace di discriminare i due eventi e di avere ruolo prognostico in corso di AKI. In letteratura sono tanti i biomarker che vengono sempre più studiati a questo scopo (Pressler, 2013; Hokamp 2016). Alcuni dei quali hanno scarsa stabilità, altri sono *time consuming* e spesso richiedono strumentazioni particolari, non di routine nei comuni laboratori e tempistiche di refertazione prolungate. Proprio per questo abbiamo cercato di analizzare, ricercare ed evidenziare la capacità diagnostica, prognostica e discriminativa della chimica urinaria, con particolare riferimento alle frazioni di escrezione e ai rapporti tra gli analiti urinari e la concentrazione di creatinina urinaria.

Il primo *step* è stato quello di creare degli intervalli di riferimento delle frazioni di escrezione degli elettroliti e dei rapporti nei cani sani.

In letteratura, per la definizione degli intervalli di riferimento di un determinato parametro, (Friedrich *et al.*, 2012), è necessario cominciare dalla selezione di pazienti sani della specie in esame. Tali soggetti possono essere selezionati con vari criteri tra cui il solo esame clinico, l'esame clinico ed esami di laboratorio, esame clinico, esami di laboratorio e test specifici inseriti nell'area clinica o clinicopatologica da esplorare. Nel presente lavoro i cani sani per l'ottenimento di una popolazione di riferimento sono stati selezionati tra il gruppo di cani donatori di sangue, tra cani portati in visita presso il nostro ospedale per procedure di routine (es. vaccinazioni) o tra cani di proprietà di studenti e personale facente parte dello staff dell'Ospedale Veterinario Universitario portati a visita per controlli di *screening*. Tali animali sono stati considerati sani sulla base di esame clinico, esami clinicopatologici approfonditi ed eventuali esami di diagnostica per immagini. In particolare, per escludere con maggiore certezza una patologia renale, anche subclinica, oltre agli esami sopra

riportati e all'esame chimico-fisico e del sedimento urinario, è stata eseguita una quantificazione della proteinuria che è risultata ampiamente nell'intervallo di riferimento. Tale valutazione, ad oggi, rappresenta uno dei parametri migliori in grado, se normale, di escludere con ragionevole certezza la presenza di una nefropatia. Tuttavia nessuno dei parametri succitati da solo è in grado di consentire tale obiettivo, ma la combinazione di essi consente una valutazione estremamente più accurata che ci ha consentito di includere i cani selezionati nel gruppo sani e pertanto adatti all'ottenimento di validi intervalli di riferimento.

I cani inclusi nello studio sono stati alimentati con diete non standardizzate per rispecchiare al meglio la reale popolazione di cani, normalmente condotti a visita. Il giorno del prelievo sono stati tenuti a digiuno per almeno 12 ore e sono state, inoltre, campionate le prime urine del mattino. Per stabilire gli intervalli delle frazioni di escrezione degli elettroliti è raccomandato il digiuno prolungato per ridurre l'effetto legato all'*intake* di tali elettroliti attraverso la dieta. Questo intervallo di tempo è stato ricavato dallo studio di Corea et al., che aveva evidenziato come l'escrezione post-prandiale di fosfati organici aumenti 8 ore dopo il pasto per poi diminuire marcatamente. Allo stesso modo la sodiuria (FENa) presenta il picco di escrezione 4-8 ore dopo il pasto e per poi ridursi ai valori minimi 12-15 ore post pasto (Corea et al., 1996; Mochel et al., 2014). L'escrezione di potassio, invece, presenta un meccanismo differente con un picco di escrezione circa 12 ore dopo il pasto. Lo stesso studio mostra come l'escrezione di Na e K siano altamente influenzati dalla dieta e dal ritmo circadiano (Mochel et al., 2014).

La valutazione più accurata della funzionalità renale include la misurazione del GFR e della clearance plasmatica degli elettroliti, che è basata sul campionamento di urine delle 24 ore. Tuttavia, questi metodi sono *time-consuming* e richiedono in alcuni casi l'inserimento di un catetere urinario. La frazione di escrezione è il modello matematico equivalente alla clearance plasmatica degli elettroliti e può essere calcolata utilizzando campioni di plasma e urine spot. Le frazioni di escrezione, infatti, sono state analizzate in una popolazione di cani con AKI e hanno mostrato una buona

correlazione con la clearance plasmatica in questo *setting* di pazienti (Brown *et al.*, 2015).

In letteratura veterinaria solo pochi studi si sono posti come obiettivo quello di determinare dei valori di riferimento per le frazioni di escrezione degli elettroliti in animali sani, e principalmente sono stati condotti su determinate razze (es. Greyhounds) e in determinate categorie di età (cuccioli di razza Beagle) (Lefebvre *et al.*, 2008) e includendo un numero ridotto di pazienti.

La popolazione di cani sani inclusa in questo studio (n=115) presenta un ampio range di età (1-10 anni) e una buona proporzione maschi-femmine (46%-54% rispettivamente), cercando di essere il più rappresentativa possibile di una popolazione di cani adulti. Di seguito è riportata una tabella riassuntiva dei nostri intervalli di riferimento:

	Limite inferiore dell'intervallo di riferimento	Limite superiore dell'intervallo di riferimento
uCreatinina (mg/dL)	83	506
uTP (mg/dL)	0	49
FE acido urico (%)	10,4	56,6
FE Ca (%)	0	0,33
FE Cl (%)	0	1,09
FE iCa (%)	0	0,69
FE K (%)	2,3	23,8
FE Mg (%)	0	4,0
FE Na (%)	0	0,69
FE P (%)	2,2	27,7
FE urea (%)	30,9	97,3
uAcido urico (mg/dL)	6,2	35,9
uAcido urico/ uCreatinina	0	0,09
uCa (mg/dL)	0	9,1
uCa/uCreatinina	0	0,03
uCl (mEq/L)	23	346
uCl/uCreatinina	0	1,25
uCreatinina/sCreatinina	78	465
uGlucosio (mg/dL)	0	22,3
uGlucosio/uCreatinina	0,02	0,09
uK (mEq/L)	0	238
uK/uCreatinina	0	0,8
uMg (mg/dL)	0	22,3
uMg/uCreatinina	0	0,007
uNa (mEq/L)	0	257
uNa/uCreatinina	0	1,0
uP (mg/dL)	0	292
uP/uCreatinina	0	0,97
uUrea (mg/dL)	1343	9619

Sulla base dei risultati ottenuti è possibile affermare che i nostri dati siano in linea con quanto riportato in letteratura per il cane (Lefebvre *et al.*, 2008; Buranakarl *et al.*, 2007) e con i valori attualmente utilizzati come riferimento (Di Bartola, Chew, 1980).

FE Na <1%

FE Cl <1%

FE K <20%

FE P <39%

I dati ottenuti da Olympus AU480 e dall'emogas-analizzatore ABL 800 Radiometer, inerenti sodio, cloro, potassio, magnesio, calcio, calcio ionizzato, fosforo, urea ed acido urico e poi calcolati con le formule sopra citate, sono stati analizzati singolarmente con statistica descrittiva al fine di valutarne la distribuzione e di identificare eventuali *outlier*. Eventuali dati considerati "anomali" rispetto alla distribuzione della popolazione sono stati eliminati o esclusi dalla valutazione statistica per il singolo parametro o in alcuni casi per tutti i parametri studiati. In seguito è stato applicato il criterio del 2,5-97,5-esimo percentile e gli intervalli di confidenza sono stati calcolati con metodo *Robust* sia in caso di distribuzione normale sia in caso di distribuzione non parametrica. Per i parametri inerenti la FE di fosforo, potassio ed urea si è applicata una valutazione *double sided* poiché tali parametri appaiono normalmente quantificabili anche nel cane sano. Per i dati inerenti la FE di sodio, cloro, magnesio, calcio e calcio ionizzato si è applicata una valutazione *right sided* poiché tali parametri appaiono minimi o non quantificabili nella quasi totalità dei pazienti sani salvo rare eccezioni.

I risultati maggiormente promettenti e che confidiamo potranno presentare la maggiore utilità pratica sono quelli inerenti la frazione escreta di Sodio. La FENa in questo studio risulta inferiore all'1% in tutti i soggetti. Il rene svolge un ruolo fondamentale per il mantenimento della omeostasi dell'organismo. Dal momento che il Na è il principale catione extracellulare, in presenza di attività tubulare adeguata una grossa quota (99%) del Na ultrafiltrato è riassorbito lungo il nefrone. L'intervallo di riferimento per il Na in questo studio è risultato essere compreso tra 0

e **0,69 %**. Tale parametro potrà trovare applicazione in ambito patologico in particolare in corso di AKI per fornire un importante ausilio diagnostico di danno tubulare in associazione ad altri parametri quali: output urinario, esame microscopico del sedimento urinario (presenza di cilindri tubulari) e nuovi biomarker come NGAL. In particolare il *cutoff* dell'1% è utilizzato in medicina umana come indice di danno tubulare nell'AKI oligurica (Espinel, 1976).

Per quanto riguarda il cloro, questo segue un comportamento analogo a quello del sodio in quanto in larga parte il suo riassorbimento a livello tubulare è ad esso legato. In questo studio il limite superiore dell'intervallo di riferimento per la FE Cl è leggermente superiore a quanto atteso. Come per il sodio, i parametri individuati nel cane in letteratura indicano un valore di *cutoff* pari a 1% (Lefebvre *et al.*, 2008). L'intervallo di riferimento per la FE Cl da noi ottenuto risulta compreso tra **0** e **1,09%**. La FE K è risultata essere all'interno del valore *cutoff* stabilito in letteratura. Il valore considerato come indicativo di un'adeguata funzionalità renale nel cane è inferiore al 20% (Lefebvre *et al.*, 2008). L'alta variabilità nella nostra popolazione dei valori percentuali, che va da un minimo di 2,2 a un massimo di 27,7, può essere legata alla differente introduzione di potassio con la dieta nei soggetti in esame, sebbene i campioni sono stati prelevati con l'animale a digiuno da almeno 12 ore. Il rene infatti elimina con le urine il 95% del potassio introdotto con la dieta. I risultati sono comunque distribuiti in modo uniforme all'interno dell'intervallo considerato. L'intervallo di riferimento per la FE K in questo studio è compreso tra **2,3 – 23,8 %**.

Per quanto riguarda il magnesio, la FE Mg è entro il parametro di *cutoff* pari a 5,4% individuato nello studio di Buranakarl *et al* del 2007. Il magnesio appare un parametro promettente riguardo alla sua frazione escreta nel paziente umano affetto da tubulopatie dovute a leptospirosi. Dati analoghi sono mancanti nel cane e saranno oggetto di studi futuri. Nell'uomo, in presenza di ipomagnesemia, valori di FE Mg superiori al 4% sono indicativi di danno renale, mentre valori inferiori al 4% indicano un'insufficiente introduzione di magnesio con la dieta. L'intervallo di riferimento per la FE Mg in questo studio è compreso tra **0** e **4%**.

La FE Ca è, come atteso, estremamente bassa nei pazienti sani. Circa il 99% del Ca è localizzato nelle ossa. La quota plasmatica di Ca è in parte legata a proteine, in parte complessata ed in parte ionizzata. Del 65% del calcio ultrafiltrabile (quota complessata e ionizzata) solo un quantitativo pari all'1% si ritrova nelle urine. L'intervallo di riferimento della FE Ca è risultato essere compreso tra **0** e **0,33%**.

Nell'uomo il fosforo rappresenta una componente chiave non solo nel tessuto osseo, ma anche in molti altri tessuti, essendo coinvolto in numerosi processi cellulari. L'*handling* sistemico del fosforo interessa differenti distretti come ossa, intestino e rene. L'organo principale deputato all'escrezione del P è il rene e solamente una piccola quota viene eliminata con le feci. La maggior parte del fosforo ultrafiltrato a livello glomerulare viene riassorbita nel tubulo contorto prossimale, risultando in un'escrezione solo del 10-15%. Con la riduzione della funzionalità renale, il rene non è più in grado di smaltire il carico alimentare di fosforo esitando nell'aumento del fosforo sierico e conseguente attivazione di meccanismi adattativi che aumentano la fosfaturia. In medicina umana l'aumento della fosfaturia può essere un indice precoce di iperparatiroidismo secondario renale, da qui il nostro interesse di valutare tale dato nel cane.

L'intervallo di riferimento della FEP nel paziente sano è risultato essere compreso tra **2,2** e **27,7%**.

L'urea è il prodotto finale del catabolismo proteico. La maggior parte dell'urea liberamente ultrafiltrata dal glomerulo renale viene successivamente riassorbita. In medicina umana la FE urea viene utilizzata per differenziare forme di insufficienza renale acuta pre-renale dalle forme intrinseche, in particolare in pazienti che hanno ricevuto diuretici, in quanto la FE Na non è correttamente interpretabile. Vengono considerati indicativi di AKI intrinseca valori di FE urea superiori al 35-40%. Nel nostro studio abbiamo deciso di esprimere la frazione di escrezione dell'urea con intervallo *double sided*; l'intervallo di riferimento della FEurea è risultato essere compreso tra **30,9** e **97,3%**.

Le discussioni inerenti la seconda parte della tesi sono state già esposte nell'articolo.

I 67 cani con malattia renale cronica inclusi nella terza parte del lavoro presentano un'età mediana di 9 anni e 6 mesi, questo testimonia come tale patologia colpisca principalmente animali adulti/anziani, come già riportato nella letteratura veterinaria più recente. Maschi e femmine risultano essere equamente colpiti e, nella nostra casistica, sono state riportate molteplici razze con frequenze differenti alle quali è difficile attribuire un significato epidemiologico specifico. Tra le comorbidità identificate la parodontopatia mostra una frequenza di circa il 50%; risultato già riportato precedentemente in letteratura veterinaria in cui l'associazione tra CKD e patologie dentali è stata dimostrata nel gatto e suggerita nel cane (Finch *et al.*, 2016; Glickman *et al.*, 2011). Nella nostra popolazione la frequenza di UTI è del 14%, mentre in letteratura sono riportate frequenze intorno al 30% riguardanti solo la specie felina (Polzin, 2011). I soggetti inclusi presentavano molti dei sintomi caratteristici della malattia renale cronica (poliuria e polidipsia associata a segni gastroenterici e perdita di peso), come già segnalato in letteratura.

Il 69% dei pazienti al momento dell'inclusione veniva nutrito esclusivamente con dieta renale (commerciale o casalinga) e al 19% dei cani venivano somministrati chelanti del fosforo; entrambi questi dati dovranno essere presi in considerazione nell'interpretazione delle frazioni di escrezione del fosforo.

La metà dei soggetti inclusi (55%) apparteneva a stadi avanzati di CKD (IRIS 3 e 4), con un valore mediano di creatinina sierica di 2,64 mg/dl; tale dato giustifica le caratteristiche alterazioni clinico-patologiche riscontrate nel gruppo dei cani CKD.

I pazienti inclusi nella popolazione in oggetto mostravano, all'emogasanalisi, valori di pH sempre più tendenti all'acidosi con il progredire della malattia, indice dello stato di acidosi dovuta alla ritenzione di valenze acide e di meccanismi tamponi non più sufficienti. Questo dato, tuttavia, è statisticamente significativo solo al terzo stadio della malattia se comparato al paziente sano. Il medesimo comportamento è stato riscontrato per la concentrazione sierica di bicarbonato, risultata essere inferiore nel terzo stadio rispetto ai soggetti sani ad indicarne il mancato riassorbimento tubulare. L'*anion gap*, valore che rappresenta la concentrazione degli anioni plasmatici non

misurati, presenta un aumento significativo nei soggetti in primo stadio CKD rispetto ai sani, indicando in questo modo un aumento degli anioni, presumibilmente fosfati. All'esame emocromocitometrico si evidenzia un calo progressivo del valore ematocrito rispetto ai cani sani, questo suggerisce una maggiore frequenza di anemia con il progredire della CKD, dato già segnalato in letteratura sia umana che veterinaria (Mercadal *et al.*, 2015). Da notare, infatti, l'introduzione del trattamento dell'anemia in questi soggetti con stimolanti l'eritropoiesi (Fiocchi *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda le concentrazioni di creatinina ed urea sierica si assiste ad un progressivo aumento nei vari stadi della malattia renale cronica; solo per l'urea la differenza tra sani e cani con CKD in primo stadio raggiunge valori statisticamente significativi.

I cani con CKD hanno presentato valori di glicemia significativamente più elevati rispetto ai cani sani (terzo e quarto stadio IRIS); questo risultato potrebbe essere spiegato dall'insulino-resistenza che accompagna la malattia renale cronica. In medicina umana tale reperto è noto da almeno 20 anni e condiziona lo stretto legame presente tra diabete mellito e CKD nelle persone (Thomas *et al.*, 2015). La fisiopatologia del diabete mellito è molto differente nel cane rispetto all'uomo, tuttavia questo dato dovrà essere approfondito in studi futuri mirati a spiegarne i meccanismi fisio-patogenetici (analisi delle fruttosamine e dell'emoglobina glicata).

I cani nei diversi stadi CKD presentano, inoltre, dei valori di potassio significativamente più elevati rispetto ai soggetti sani. Questo riscontro è verosimilmente legato a numerosi fattori quali acidosi metabolica cronica, insulino-resistenza e terapie somministrate (inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone).

I pazienti con CKD mostrano frequentemente alterazioni del metabolismo calcio-fosforo: l'iperfosfatemia infatti è presente nel 52,5% dei pazienti e nel 5% dei cani CKD si associa ad ipercalcemia totale, con calcio ionico nei limiti della norma nella maggior parte degli stessi animali. La fosfaturia è paragonabile nei pazienti sani e nei cani CKD in stadio 1 e 2; mentre aumenta in modo significativo e progressivo in stadio 3 e 4 (iperfosfaturia). Questo aumento è verosimilmente legato all'effetto degli

ormoni fosfaturici, quali FGF-23 e PTH, come riportato in letteratura. La fosfaturia, se espressa come frazione escreta del fosforo (FEP), può essere considerata un marker migliore rispetto alla sola fosfatemia per rappresentare le alterazioni del bilancio del fosforo nei pazienti CKD poiché riflette l'eliminazione di fosforo dall'organismo per tempi più lunghi ed è meno impattata da potenziali fattori confondenti (funzione renale, dieta, digiuno, altre patologie). La FEP, infatti, potrebbe rappresentare un marker utile per l'inizio di una terapia chelante del fosforo ed il suo monitoraggio.

La letteratura inerente il metabolismo del calcio nel cane con CKD riporta dati contrastanti a causa delle diverse tipologie di misurazione del calcio (calcio totale, calcio totale corretto, calcio ionico e calciuria espressa in modi differenti) e a stadi di CKD differenti riportati nei diversi studi. Nel nostro studio abbiamo valutato la maggior parte dei parametri disponibili in routine per indagare il bilancio del calcio nel cane ottenendo un pannello esteso e di costo contenuto. Il paziente con CKD mostra un assetto peculiare caratterizzato da una concentrazione di calcio corretto e totale significativamente elevata a fronte di una calcemia ionizzata normale (nonostante sporadici pazienti con ipercalcemia o ipocalcemia ionizzata, soprattutto in stadio avanzato di CKD). L'ipercalcemia totale riflette l'aumento della componente di calcio legata agli anioni circolanti, come atteso e già riportato in letteratura. La calcemia ionizzata riflette meglio l'effettivo calcio circolante biologicamente attivo e non sembra impattata dalla malattia renale cronica nella nostra coorte di pazienti clinicamente stabili. La calciuria è nettamente più elevata nei soggetti con CKD rispetto ai sani a causa, verosimilmente, dell'effetto calciurico di alcuni ormoni, alla presenza di un certo grado di disfunzione tubulare, alla acidosi metabolica e in larga parte ad una condizione subclinica di ipovitaminosi D.

Il magnesio è liberamente filtrato attraverso il glomerulo e il 95% di questo viene riassorbito nel tubulo renale, di cui l'80% a livello di ansa di Henle, ma è la quota riassorbita a livello di tubulo collettore distale che ha il maggior impatto sul magnesio sierico e urinario. Questo processo è regolato dal PTH, vitamina D (1,25 -diidrossivit. D), prostaglandine, ADH ed anche insulina (Felsenfeld *et al.*, 2015, Humphrey *et al.*, 2015). In letteratura è riportato che in corso di CKD, soprattutto negli stadi avanzati

si ha una tendenza all'ipermagnesemia con conseguenti effetti vasodilatatori e ipotensivi. È stato evidenziato, inoltre, che cani con ipermagnesemia hanno un rischio di morte 2,6 volte maggiore rispetto a cani normomagnesemici (Humphrey *et al.*, 2015). In medicina umana hanno evidenziato come la frazione di escrezione del magnesio aumenti con la progressione della CKD per cercare di mantenere la concentrazione sierica nell'intervallo di riferimento. Nel nostro studio la FE Mg aumenta progressivamente e in modo significativo dal terzo stadio in poi, in accordo con la letteratura.

Il rapporto creatinina urinaria/creatinina sierica (uCreatinina/sCreatinina) è indice del riassorbimento di acqua a livello tubulare. Pazienti con iperazotemia prerenale generalmente tendono a riassorbire più acqua e hanno un rapporto uCreatinina/sCreatinina superiore a 40 (Waldrop, 2008), mentre in corso di necrosi tubulare acuta il rapporto è inferiore a 20 (Zygner *et al.*, 2013) dato evidenziato anche nella parte seconda del nostro lavoro. In pazienti con CKD si evidenzia una diminuzione del rapporto progressiva e statisticamente significativa sin dal primo stadio IRIS.

Altro obiettivo di questo lavoro è stata la ricerca di un potenziale marker in grado di discriminare un'iperazotemia da danno renale acuto da una con componente cronica. Sono stati analizzati, quindi, numerose variabili comparandole tra i tre gruppi: sani, cani con CKD e cani con AKI.

Nella valutazione dei parametri dell'emogasanalisi si è evidenziato una diminuzione significativa del pH ematico e della concentrazione di bicarbonati nei cani iperazotemici rispetto ai sani, senza riuscire a distinguere la natura dell'iperazotemia. Risultati incoraggianti sono pervenuti in seguito alla valutazione dell'*anion gap* e della calcemia ionizzata: in corso di danno renale acuto si è riscontrato un aumento statisticamente significativo della quota di anioni non misurabili (fosfati, solfati, chetoacidi) e un'ipocalcemia ionizzata rispetto a cani con malattia renale cronica e pazienti sani. L'ipocalcemia ionizzata è stata riscontrata anche nell'uomo in condizioni di sepsi e associata a tempi di ricovero più lunghi. Il meccanismo patogenetico non è ben spiegato e può essere multifattoriale (disfunzione delle

ghiandole paratiroidi, soppressione citochino-mediata del rilascio di paratormone, mancanza di vitamina D o inattivazione, ipomagnesiemia, chelazione del calcio, accumulo nei tessuti e cellule). Nel cane con danno renale acuto è di comune riscontro l'ipocalcemia che non è correlata con la sopravvivenza, ma solo con la durata dell'ospedalizzazione (Holowaychuk *et al.*, 2009).

Il valore ematocrito differisce statisticamente in tutte le popolazioni analizzate e raggiunge valori inferiori in pazienti con malattia renale cronica. Nonostante non si conosca la prevalenza di anemia in questi ultimi, un ematocrito più basso è stato associato agli stadi terminali della malattia. L'anemia nei pazienti con CKD riconosce cause multifattoriali che concettualmente si possono dividere in 3 grosse categorie: da perdita (perdite gastrointestinali, trombocitopatie uremiche, da prelievi), da distruzione (le emazie hanno un'emivita inferiore), da mancata produzione (deficienza di eritropoietina e di vitamine, soppressione uremica e infiammatoria del midollo osseo, carenza di ferro) (Cowgill, 1992).

I pazienti con danno renale acuto che raggiungono il nostro ospedale presentano delle concentrazioni di creatinina e urea sierica statisticamente maggiori rispetto al paziente con malattia renale cronica stabile e al paziente sano.

L'ipoalbuminemia e la riduzione del rapporto albumine/globuline è stata evidenziata frequentemente nelle popolazioni di studio, sia in corso di AKI che in cani con CKD: l'albumina è una proteina di fase acuta negativa e le sue concentrazioni possono ridursi in corso di infiammazione sistemica. In aggiunta, le perdite renali di albumina supportate da elevati valori di UAC e UPC, e il ridotto *intake* alimentare del paziente con AKI giustificano ampiamente tale reperto.

Altri riscontri frequenti nella popolazione di studio sono alterazioni elettrolitiche, infatti cani con CKD presentano dei valori di potassio sierico significativamente più elevati rispetto ai soggetti sani e a cani con AKI. Questo riscontro è probabilmente legato a numerosi fattori quali acidosi metabolica cronica, insulino-resistenza e terapie somministrate (inibitori del sistema renina-angiotensina-aldosterone). Da notare come non ci sia differenza del valore di potassiemia tra i pazienti sani e i pazienti con AKI. La potassiuria, espressa come FEK (che appare più sensibile del rapporto uK/ucreatinina nel

discriminare CKD da pazienti in AKI) presenta un aumento considerevole e significativo nelle tre popolazioni.

Alterazioni quali iponatremia e ipocloremia sono state riscontrate nel paziente con danno renale acuto, in modo significativo rispetto al cane con malattia renale cronica e al sano. La sodiuria (FE Na o uNa/uCreatinina) mostra differenze significative tra sani e cani con danno renale acuto. Queste alterazioni possono essere secondarie alle perdite gastroenteriche ed urinarie (tubulopatie).

L'iperuricemia (marker di danno ossidativo) riscontrata nei pazienti critici è un dato studiato in medicina umana e ancora di difficile interpretazione. In numerosi studi non è stato correlato al rischio di morte, ma sembra essere correlato alla gravità della condizione clinica e alla necessità di ventilazione meccanica (Akbar *et al.*, 2015). Dato interessante da indagare meglio in medicina veterinaria.

Differenze statisticamente significative sono state riscontrate in tutte e tre le popolazioni per quanto riguarda le concentrazioni sieriche di fosforo, magnesio e calcio. Questi tre elettroliti sono regolati simultaneamente e il loro metabolismo coinvolge diversi fattori, ad esempio il pH, la dieta, l'assunzione di altri minerali e le richieste da parte dell'organismo. La quantità di calcio assorbita dall'intestino è altamente correlata al calcitriolo; i principali regolatori del metabolismo e delle concentrazioni sieriche di questo elemento, infatti, sono il calcitriolo ed il paratormone (PTH). In pazienti con CKD negli stadi terminali si assiste ad una progressiva diminuzione del calcio totale sierico dovuto ai ridotti livelli di vitamina D e paratormone (Felsenfed *et al.*, 2015). Il nostro lavoro ha evidenziato un aumento progressivo della calcemia totale nei pazienti con CKD e, al contrario, uno stato di ipocalcemia totale nei pazienti con danno renale acuto. D'altra parte la calciuria è significativamente più elevata nei soggetti con AKI; ciò è verosimilmente imputabile al fatto che questi pazienti presentano, solitamente, un più grave danno tubulare e acidosi metabolica. La calciuria (espressa come FECa, FE iCa e uCa/uCreatinina) potrebbe quindi rappresentare un utile parametro per aiutare il clinico nella discriminazione tra AKI e CKD, o per riconoscere una malattia renale cronica scompensata (crisi uremica).

L'assorbimento del fosforo avviene a livello intestinale ed è direttamente correlato alla quantità assunta con la dieta. L'escrezione avviene tramite le urine: la quota filtrata è direttamente correlata alla velocità di filtrazione glomerulare (GFR), mentre la quota riassorbita (principalmente dai tubuli prossimali) dipende dai fabbisogni metabolici dell'organismo. In questo lavoro la concentrazione di fosforo è maggiore nel paziente con CKD rispetto al sano, segnale di iperparatiroidismo secondario renale. Bisogna considerare che quest'ultimo dato possa essere sottostimato: la popolazione di cani con CKD, infatti, era in terapia con chelanti del fosforo, alimentazione a restrizione proteica e di fosforo. La popolazione di cani con AKI presentano una concentrazione di fosforo ancora maggiore, tale reperto è probabilmente legato all'importante e drastica riduzione del GFR che si verifica in questi pazienti. La fosfaturia (FEP) e il rapporto uP/uCreatinina non si sono dimostrati dei buoni indicatori nel discriminare tra AKI e CKD, verosimilmente a causa del fatto che in corso di AKI, nonostante non sia presente una grave iperplasia delle paratiroidi, si assiste ad un grave danno tubulare con conseguente mancato recupero di fosforo. Un prodotto Ca-P ($Ca \times P$) superiore a 60-70 può esitare nella mineralizzazione dei tessuti molli e nella nostra popolazione si assiste ad un aumento del valore statisticamente differente in tutte e tre le popolazioni. Il magnesio non è regolato da un solo ormone e il suo bilancio è determinato dall'*intake* con la dieta, dai depositi nelle ossa e nei tessuti molli. Durante la malattia renale cronica si ha una diminuzione dell'assorbimento intestinale di magnesio (vitamina D mediato) e una riduzione del GFR, questo supporta l'aumento del magnesio sierico nei cani con malattia renale cronica e, soprattutto, in quelli con danno renale acuto. La FE Mg aumenta considerevolmente in corso di malattia renale cronica rispetto ai pazienti con danno renale acuto, ma non in modo statisticamente significativo. Sulla gestione renale del magnesio in corso di CKD ci sono ancora molti quesiti anche in medicina umana è stato evidenziato come la FE Mg aumenti negli stadi avanzati di malattia renale cronica ed è stato ipotizzato che l'attivazione dei recettori sensibili al calcio a livello di porzione spessa dell'ansa di Henle (dove avviene il riassorbimento del 60-70%)

possa giocare un ruolo fondamentale nell'aumento della sua escrezione (Fenselfed *et al.*, 2015,).

Si hanno, purtroppo, pochi dati a disposizione sulla FE urea (che non presenta differenze statistiche tra AKI e CKD) e saranno necessari ulteriori studi per capirne il reale significato.

Il rapporto glucosio urinario/creatinina urinaria ha evidenziato una differenza statisticamente significativa in tutte e tre le popolazioni se comparate tra loro, tenendo presente ampie aree di sovrapposizione.

La diminuzione del rapporto creatinina urinaria /creatinina sierica e il rapporto acido urico urinario/ creatinina urinaria non hanno evidenziato capacità discriminative tra pazienti con danno renale acuto e cani con malattia renale cronica.

I parametri che si sono mostrati statisticamente differenti nelle tre popolazioni sono stati indagati tramite analisi della curva di ROC per valutarne il potere discriminativo nel discernere un paziente con malattia renale cronica o danno renale acuto. Tutti i parametri presi in considerazione hanno evidenziato una accuratezza limitata in quanto presentano un'area sotto la curva inferiore a 0,7. La FE Ca è risultata essere la variabile che può aiutare maggiormente il clinico a valutare se il paziente è affetto da malattia cronica o ha subito un danno acuto.

Tabella riassuntiva con le principali variabili urinarie prese in considerazione nei pazienti con danno renale acuto e nei diversi stadi IRIS della malattia renale cronica.

	IR	CKD				AKI	
		I stadio (n=16)	II stadio (n=14)	III stadio (n=23)	IV stadio (n=12)	VR-AKI (n=52)	I-AKI (n=69)
FENa	< 0,69	0,27 (0,08-0,88)	0,53 (0,13-1,15)	1,59 (1,08-6,63)	5,07 (0,89-12,65)	0,24 (0,01-2,21)	2,36 (0,04– 5,81)
FEK	0,2–20,8	15,4 (3,4-33,3)	18,7 (5,8-33,2)	32,6 (14-100)	72,2 (32,7-113,1)	23,3 (1,6-74,1)	74,9 (5,3-399,7)
FECl	< 1,1	0,51 (0,10-0,77)	0,77 (0,22-1,71)	2,18 (0,22-4,05)	5,75 (0,60-17,89)	0,22 (0,03-3,14)	2,7 (0,06-83,4)
FEMg	<4,1	3,06 (0,46-9,8)	5,05 (0,35-9,84)	10,04 (1,2-19,2)	18,14 (5,86-29,19)	2,9 (0,3-13,8)	10,2 (0,9-80,90)
FEP	2,2–27,7	17,3 (0,1-40,1)	17,23 (5,9-44,1)	31,97 (11,2-83,6)	34,92 (16,3-53,5)	17,9 ± 13,4	38,4 ± 24,9
FE_{Ca}	< 0,33	0,18 (0,12-2,56)	0,25 (0,13-0,72)	0,94 (0,35-2,98)	3,29 (2,36-8,20)	0,3 (0,1-3,7)	4,1 (0,1-70,0)
FE_{iCa}	< 0,69	0,38 (0,18-4,9)	0,49 (0,09-1,38)	1,83 (0,19-5,45)	6,78 (0,44-15,1)		

CONCLUSIONI

Questo studio contribuisce nell'elaborazione di intervalli di riferimento per numerose variabili urinarie in una popolazione di cani sani; dati non presenti in letteratura veterinaria. Fornisce, inoltre, dati epidemiologici su cani con malattia renale cronica e affetti da danno renale acuto nel nostro territorio. Lo studio delle frazioni escrete si rivela promettente per finalità diagnostiche (discriminazione AKI da CKD) e potenzialmente prognostiche in corso di AKI. È compito del clinico riuscire ad integrare ed elaborare anamnesi, alterazioni riscontrate all'esame fisico e dati clinico-patologici.

In conclusione, i risultati di questo studio sperimentale sono incoraggianti dal punto di vista clinicopatologico e potrebbero gettare le basi per un uso quotidiano delle frazioni di escrezione nel paziente veterinario canino data la semplicità e rapidità di esecuzione di tale test.

BIBLIOGRAFIA

Akbar SR, Long DM, Hussain K, Alhajhusain A, Ahmed US, Iqbal HI, Ali AW, Leonard R, Dalton C. Hyperuricemia: An Early Marker for Severity of Illness in Sepsis. *Hindawi Publishing Corporation International Journal of Nephrology Volume* 2015, 301021, 8 pages.

Ateca LB, Drobatz KJ, King LG. Organ dysfunction and mortality risk factors in severe canine bite wound trauma. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2014;24:705–714.

Bagshaw SM, Bennett M, Devarajan P, Bellomo R. Urine biochemistry in septic and non-septic acute kidney injury: a prospective observational study. *J Crit Care*. 2013;28:371–378.

Bailey MA, Shirley D, Unwin RJ. Renal physiology. In *Comprehensive clinical nephrology*. Quinta edizione. Edited by Johnson, Feehally, Floege. Elsevier Saunders. Philadelphia, PA. 2015; 2: 14-27.

Bartges J and Polzin D. Historical information and physical examination. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. *Nephrology and Urology of Small Animals*, New Jersey:Wiley-Blackwell, 2011:25-27.

Bech AP, Bouma-de Krijger A, Van Zuilen AD, Bost ML, Van den Brand JA, Blankestijn PJ, Wetzels JF, Vervloet MG-Impact of fractional phosphate excretion on the relation of FGF23 with outcome in CKD patients. *Journal of nephrology* 2015; 284: 477-84.

Behrend EN, Grauer GF, Mani I, Groman RP, Salman MD, Greco DS. Hospital-acquired acute renal failure in dogs: 29 cases (1983–1992). *J Am Vet Med Assoc*. 1996;208:537–541.

Bellomo R, Bagshaw S, Langenberg C, Ronco C. Pre-renal azotemia: a flawed paradigm in critically ill septic patients? *Contrib Nephrol*. 2007;156:1–9.

Bennett SI, Abraham LA, Anderson GA, Holloway SA, Parry BW. Reference limits for urinary fractional excretion of electrolytes in adult non-racing Greyhound dogs. *Australian Veterinary Journal*, 2006;84(11):393-397.

Boyd JC, Hawker CD. Automation. In Burtis CA, Bruns DE, Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics, Elsevier Saunders, 7th, 2015: 280-297.

Braff J, Obare E, Yerramilli M, Elliott J, and Yerramilli M. Relationship between Serum Symmetric Dimethylarginine Concentration and Glomerular Filtration Rate in Cats. *J Vet Intern Med* 2014;28:1699–1701.

Brown N, Segev G, Francey T, Kass P, Cowgill LD. Glomerular filtration rate, urine production and fractional clearance of electrolytes in acute kidney injury in dogs and their association with survival. *Vet Intern Med*. 2015;29:28–34.

Brown S, Atkins C, Bagley R, et al. Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats. *J Vet Intern Med*. 2007;21:542–558.

Brown S. A. Management of chronic kidney disease. In Elliott J., Grauer G. F., BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology, second edition, Wiley Blackwell, 2007: 223-230.

Bruns DE, Rousseau FA, Burtis CA, Clinical Chemistry, Molecular Diagnostics, and Laboratory Medicine. In Burtis CA, Bruns DE, Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics, Elsevier Saunders, 7th, 2015: 27-31.

Buranakarl C, Ankanaporn K, Thammacharoen S, Trisiroj M, Maleeratmongkol T, Thongchai P, Panasjaroen S. Relationships Between Degree of Azotaemia and Blood Pressure, Urinary protein:Creatinine Ratio and Fractional Excretion of Electrolytes in Dogs with Renal Azotaemia. *Veterinary Research Communications*, 2007;31:245–257.

Chew DJ, DiBartola SP, Schenck P. Clinical Evaluation of the urinary tract. In *Canine and Feline Nephrology and Urology*, 2^{Ed}, Elsevier Saunders, 2011;2:32-62.

Choi BS, Moon H, Suh SI, Hyun C. Evaluation of serum symmetric dimethylarginine in dogs with heartworm infection. *Can J Vet Res* 2017;81:228–230^a.

Choi BS, Moon HS, Seo SH, and Hyun C. Evaluation of serum cystatin-C and symmetric dimethylarginine concentrations in dogs with heart failure from chronic mitral valvular insufficiency. *J. Vet. Med. Sci* 79(1): 41–46, 2017^b.

Cianciolo R, Hokamp J, Nabity M. Advances in the evaluation of canine renal disease. *The Veterinary Journal* 2016, 215:21-29.

Cobrin AR, Blois SL, Kruth SA, Abrams-Ogg ACG, Dewey C. Biomarkers in the assessment of acute and chronic kidney diseases in the dog and cat. *Journal of Small Animal Practice*, 2013;54:647–655.

Conti-Patara A, Caldeira J, de Mattos-Junior E, et al. 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;22:409–418.

Corea M, Seeliger E, Boemke W, Reinhardt HW. Diurnal pattern of sodium excretion in dogs with and without chronically reduced renal perfusion pressure. *Kidney Blood Press Res* 1996;19:16–23.

Cowgill LD, Langston C. Acute kidney insufficiency. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. *Nephrology and Urology of Small Animals*. New Jersey:Wiley-Blackwell 2011:472–523.

Cowgill LD. Pathophysiology and management of anemia in chronic progressive renal failure. *Semin Vet Med Surg (Small Anim)* 1992;7(3):175-182.

Cowgill LD. Staging patients with acute kidney injury: a new paradigm. In: *Proceedings of the 2010 ACVIM forum; June 9–12, 2010; Anaheim, CA*.

Crivellenti LZ, Mesa JS, Wilkes Burton Meirelles AE, Crivellenti SB, Gomes Mireya E, Canola JC, Hatayde MR, Santana AE, Dantas M and Barros Silva GE. False positivity of gamma-glutamyl transpeptidase measurement in urine. *Ren Fail*, 2014; 36(4): 581–584.

D'Amico G and Bazzi C, Pathophysiology of proteinuria. *Kidney International*, Vol. 63 (2003), pp. 809–825.

Dahlem DP, Neiger R, Schweighauser A, Francey T, Yerramilli M, Obare E, and Steinbach SML. Plasma Symmetric Dimethylarginine Concentration in Dogs with Acute Kidney Injury and Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2017;31:799–804.

Dantzler WH, Layton AT, Layton HE, Pannabecker TL. Urine-Concentrating Mechanism in the Inner Medulla: Function of the Thin Limbs of the Loops of Henle, *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1781–1789, 2014.

De Brito Galvao JF, Nagode LA, Schenck PA, et al. Calcitriol, calcidiol, parathyroid hormone, and fibroblast growth factor-23 interactions in chronic kidney disease. *J Vet Emerg Crit Care*. 2013; 23(2):134-162.

De Loor J, Daminet S, Smets P, Maddens B, Meyer E. Urinary biomarkers for acute kidney injury in dogs. *J Vet Intern Med*. 2013;27: 998–1010.

Defauw P, Schoeman JP, Smets P, et al. Assessment of renal dysfunction using urinary markers in canine babesiosis caused by *Babesia rossi*. *Vet Parasitol*. 2012;190:326–332.

Devarajan P. Acute kidney injury: still misunderstood and misdiagnosed. *Nat Rev Nephrol*. 2017;13:137–138.

Dewitte A, Biais M, Petit L, Cochard JF, Hilbert G, Combe C, Sztark F. Fractional excretion of urea as a diagnostic index in acute kidney injury in intensive care patients. *J Crit Care* 2012; 27:505-510.

DiBartola SP, Applied Renal Physiology. In: DiBartola SP, Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. Elsevier Saunder 2012:26-44.

Dominguez JR, Shlipak MG, Whodey Ma, Joachim H-Fractional excretion of phosphorus modifies the association between fibroblast growth factor-23 and outcomes. *J Am Soc Nephrol* 2013; 24:647-654.

Eckersall PD. Proteins, Proteomics, and the Dysproteinemias. In Kaneko J, Harvey J, Bruss M. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*. Academic Press 2008:117-155.

Elhassan EA, Schrier RW. Disorders of Extracellular Volume. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive clinical nephrology*. Elsevier Saunder 4° edizione 2010:85-99.

Endre ZH, Kellum JA, Di Somma S, et al. Differential diagnosis of AKI in clinical practice by functional and damage biomarkers: Workgroup Statements from the Tenth Acute Dialysis Quality Initiative Consensus Conference. *Contrib Nephrol*. 2013;182:30–44.

Felsenfeld AJ, Levine BS, Rodriguez M. Pathophysiology of Calcium, Phosphorus, and Magnesium Dysregulation in Chronic Kidney Disease. *Seminars in Dialysis*, 2015 Vol 28, No 6:564–577.

Finch NC, Geddes RF, Syme HM, et al. Fibroblast growth factor 23 (FGF-23) concentrations in cats with early nonazotemic chronic kidney disease (CKD) and healthy geriatric cats. *J Vet Intern Med.* 2013; 27:227-233.

Finch NC, Heiene R, Elliott J, Syme HM, Peters AM. A Single Sample Method for Estimating Glomerular Filtration Rate in Cats. *J Vet Intern Med* 2013;27:782–790.

Finch NC, Syme HM, Elliott J. Parathyroid hormone concentration in geriatric cats with various degrees of renal function. *J Am Vet Med Assoc.* 2012; 241:1326-1335.

Finco DR, Brown SA, Barsanti JA, Bartges JW, Cooper TA. Reliability of using random urine samples for “spot” determination of fractional excretion of electrolytes in cats. *Am J Vet Res.* 1997;58:1184–1187.

Frederic S. Almy Mary M. Christopher Don P. King Scott A. Brown Evaluation of Cystatin C as an Endogenous Marker of Glomerular Filtration Rate in Dogs. *Vet Intern Med* 2002;16:45–51.

Fry MM. Urinalysis. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. *Nephrology and Urology of Small Animals.* New Jersey:Wiley-Blackwell 2011:46–57.

García-Rodríguez MB, Pérez-García CC, Ríos-Granja MA, et al. Renal handling of calcium and phosphorus in experimental renal hyperparathyroidism in dogs. *Veterinary Research.* 2003; 34:379-387.

Geddes RF, Biourge V, Chang Y, et al. The effect of moderate dietary protein and phosphate restriction on calcium-phosphate homeostasis in healthy older cats. *J Vet Intern Med.* 2016; 30:1690-1702.

Geddes RF, Elliott J, Syme HM. Relationship between plasma fibroblast growth factor-23 concentration and survival time in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2015; 29:1494-1501.

Geddes RF, Finch NC, Elliott J, et al. Fibroblast growth factor-23 in feline chronic kidney disease. *J Vet Intern Med.* 2013(b); 27(2):234-241.

Gentilini F, Dondi F, Mastroianni C, Giunti M, Calzolari C, Gandini G, Mancini D, Famigli Bergamini P. Validation of a human immunoturbidimetric assay to measure canine albumin in urine and cerebrospinal fluid. *J Vet Diagn Invest,* 2005;17:179–183.

Gentilini F, Mancini D, Dondi F, et al. Validation of a human immunoturbidimetric assay for measuring canine C-reactive protein. *Vet Clin Pathol*. 2005;34:318.

Giunti M, Troia R, Famigli Bergamini P, Dondi F. Prospective evaluation of the acute patient physiologic, laboratory evaluation score, and an extended clinicopathological profile in dogs with systemic inflammatory response syndrome. *J Vet Emerg Crit Care*. 2015;25:226–233.

Goggs R, Dennis SG, Di Bella A, et al. Predicting outcome in dogs with primary immune-mediated hemolytic anemia: results of a multicenter case registry. *J Vet Intern Med*. 2015;29:1603–1610.

Greco DS, Turnwald GH, Adams R, et al. Urinary gamma-glutamyl transpeptidase activity in dogs with gentamicin-induced nephrotoxicity. *Am. J. Ve. Res.*, 1985;46:2332-2335.

Hall JA, Yerramilli M, Obare E, et al. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides. *Vet J*. 2014;202:588–596.

Hall JA, Yerramilli M, Obare E, Yerramilli M, and Jewell DE. Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in cats with chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2014;28:1676–1683.

Hardcastle MR, Dittmer KE. Fibroblast growth factor 23: a new dimension to disease of calcium-phosphorus metabolism. *Vet Pathol*. 2015; 52(5):770-784.

Harison E, Langston C, Palma D, Lamb K. Acute azotemia as a predictor of mortality in dogs and cats. *J Vet Intern Med*. 2012;26:1093–1098.

Harjes LM, Parker VJ, Dembek K, Young GS, Giovaninni LH, Kogika MM, Chew DJ, and Toribio RE. Fibroblast Growth Factor-23 Concentration in Dogs with Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2017;31:784–790.

Harr KE, Flatland B, Nabity M, Freeman KP; ASVCP. ASVCP guidelines: allowable total error guidelines for biochemistry. *Vet Clin Pathol*. 2013;42:424–236.

Hartung EA. Biomarkers and surrogate endpoints in kidney disease. *Pediatr Nephrol*. 2016 March; 31(3): 381–391.

Hauptman JG, Walshaw R, Olivier NB. Evaluation of the sensitivity and specificity of diagnostic criteria for sepsis in dogs. *Vet Surg.* 1997;26:393–397.

Hayes G, Mathews K, Doig G, et al. The acute patient physiologic and laboratory evaluation (APPLE) score: a severity of illness stratification system for hospitalized dogs. *J Vet Intern Med.* 2010;24: 1034–1047.

Himmelfarb J, Joannidis M, Molitoris B, et al. Evaluation and initial management of acute kidney injury. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008;3:962–967.

Hokamp JA, Cianciolo RE, Boggess MM, et al. Correlation of urine and serum biomarkers with renal damage and survival in dogs with naturally occurring proteinuric chronic kidney disease. *J Vet Intern Med* 2016;30:591–601.

Holowaychuk MK, Hansen BD, DeFrancesco TC, Marks SL. Ionized Hypocalcemia in Critically Ill Dogs. *J Vet Intern Med* 2009;23:509–513.

Hopkamp JA, Nabity MB. Renal biomarkers in domestic species. *Vet Clin Pathol.* 2016;45/1:28–56.

Hrovat A, Schoeman JP, De Laat B, Meyer E, Smets P, Goddard A, Nagel S, Daminet S. Evaluation of snake envenomation-induced renal dysfunction in dogs using early urinary biomarkers of nephrotoxicity. *The Veterinary Journal* 198 (2013) 239–244.

Humphrey S, Kirby R, Rudloff E. Magnesium physiology and clinical therapy in veterinary critical care. *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 2015; 25(2): 210–225.

Ibba F, Mangiagalli G, Paltrinieri S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *The Veterinary Journal*, 2016; 210:89-91.

Ibba F, Mangiagalli G, Paltrinieri S. Urinary gamma-glutamyl transferase (GGT) as a marker of tubular proteinuria in dogs with canine leishmaniasis, using sodium dodecylsulphate (SDS) electrophoresis as a reference method. *Vet J.* 2016;210:89-91.

Jacob F, Polzin DJ, Osborne CA, Neaton JD, Kirk CA, Allen TA, Swanson LL. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *JAVMA*, 2005; 226, (3) 393-400.

Jepson RE, Syme HM, Vallance C, and Elliott J. Plasma Asymmetric Dimethylarginine, Symmetric Dimethylarginine, L-Arginine, and Nitrite/Nitrate Concentrations in Cats with Chronic Kidney Disease and Hypertension. *J Vet Intern Med* 2008;22:317–324.

Keir I, Kellum JA. Acute kidney injury in severe sepsis: pathophysiology, diagnosis and treatment recommendations. *J Vet Emer Crit Care*. 2015;25:200–209.

Kellum JA, Lameire N; KIDIGO AKI Guideline Work Group. Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KIDIGO summary (Part 1). *Crit Care*. 2013;17:204.

Kellum JA, Sileanu FE, Murugan R, Lucko N, Shaw AD, Clermont G. Classifying AKI by urine output versus serum creatinine level. *J Am Soc Nephrol*. 2015;26:2231–2238.

Kenney EM, Rozanski EA, Rush JE, et al. Association between outcome and organ system dysfunction in dogs with sepsis: 114 cases (2003–2007). *J Am Vet Med Assoc*. 2010;236:83–87.

Kopke MA, Burchell RK, Ruaux CG, Burton SE, Lopez-Villalobos N, and Gal A. Variability of symmetric dimethylarginine in apparently healthy dogs. *J Vet Intern Med* 2018;32:736–742.

Kosmadakis G, Viskaduraki M, Michail S. The validity of fractional excretion of uric acid in the diagnosis of acute kidney injury due to decreased kidney perfusion. *Am J Kidney Dis*. 2009;54:1186–1187.

Kricka LJ, Park JY. Immunochemical Techniques. In Burtis CA, Bruns DE, Tietz Fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics, Elsevier Saunders, 7th, 2015: 262-279.

Kriz W and Elger M. Renal anatomy. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J. Comprehensive clinical nephrology. Elsevier Saunder 4^o edizione 2010:3-14.

La Garreres AL, Laroute V, De La Farge F, et al. Disposition of plasma creatinine in non-azotemic and moderately azotemic cats. *J Feline Med Surg* 2007;9:89–96.

Laroute V, Chetboul V, Roche L, Maurey C, Costes G, Pouchelon J-L, De La Farge F, Boussouf M, Lefebvre HP. Quantitative evaluation of renal function in healthy Beagle puppies and mature dogs. *Research in Veterinary Science*, 2005;79:161–167.

Lee YJ, Chang CC, Chan PW, Hsu WL, Lin KW, Wong ML. Prognosis of acute kidney injury in dogs using RIFLE (Risk, Injury, Failure, Loss and End-stage renal failure) like criteria. *Vet Rec.* 2011;168:264.

Lefebvre HP, Dossin O, Trumel C, Braun JP. Fractional excretion tests: a critical review of methods and applications in domestic animals. *Vet Clin Pathol.* 2008;37:4–20.

Lippi I, Meucci V, Guidi G, Soldani G. Valutazione Della Velocità Di Filtrazione Glomerulare Mediante Clearance Plasmatica Dello Ioeolo Nel Cane: Confronto Tra Metodi Semplificati. *Veterinaria*, Anno 22, n. 1, Febbraio 2008

Lippi I, Perondi F, Meucci V, Bruno B, Gazzano V, Guidi G. Clinical utility of urine kidney injury molecule-1 (KIM-1) and gammaglutamyl transferase (GGT) in the diagnosis of canine acute kidney injury. *Veterinary Research Communications*, 2018; 42:95–100.

Luschini MA, Fletcher DJ, Schoeffler GL. Incidence of ionized hypocalcemia in septic dogs and its association with morbidity and mortality: 58 cases (2006–2007). *J Vet Emerg Crit Care.* 2010;20:406–412.

Maddens B, Heiene R, Smets P, et al. Evaluation of kidney injury in dogs with pyometra based on proteinuria, renal histomorphology, and urinary biomarkers. *J Vet Intern Med.* 2011;25:1075–1083.

Maddens BE, Daminet S, Demeyere K, Demon D, Smets P, Meyer E. Validation of immunoassays for the candidate renal markers C-reactive protein, immunoglobulin G, thromboxane B2 and retinol binding protein in canine urine. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 2010;134, 259–264.

Makris K, Spanou L. Acute kidney injury: diagnostic approaches and controversies. *Clin Biochem Rev.* 2016;37:153–175.

Martinez-Subiela S, Garcia-Martinez JD, Tvarijonaviciute A, Tecles F, Caldin M, Bernal LJ, Ceron JJ. Urinary C reactive protein levels in dogs with leishmaniasis at different stages of renal damage. *Research in Veterinary Science*, 2013;95, 924–929.

Mastorilli C, Dondi F, Agnoli C, Turba ME, Vezzali E, Gentilini F. Clinicopathologic features and outcome predictors of *Leptospira interrogans Australis* serogroup infection in dogs: a retrospective study of 20 cases (2001–2004). *J Vet Intern Med.* 2007;21:3–10.

Mercadal L, Metzger AM, Haymann JP et al. The relation of hepcidin to iron disorders, inflammation and hemoglobin in chronic kidney disease. *PLoS One*. 2014; 9(6):e99781.

Miyazaki M, Yamashita T, Hosokawa M, Taira H, Suzuki A: Species-, sex-, and age-dependent urinary excretion of cauxin, a mammalian carboxylesterase. *Comparative Biochemistry and Physiology, Biochemistry and Molecular Biology* 2006; 145: 270–277.

Mochel JP, Fink M, Bon C, Peyrou M, Bieth B, Desevaux C, Deurinck M, Giraudel JM, Danhof M. Influence of feeding schedules on the chronobiology of renin activity, urinary electrolytes and blood pressure in dogs. *Chronobiology International*, 2014; 31(5): 715–730.

Nabity MB, Boggess MM, Kashtan CE, Lees GE. Day-to-Day variation of the urine protein: creatinine ratio in female dogs with stable glomerular proteinuria caused by X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Intern Med* 2007;21:425–430.

Nabity MB, Lees GE, Cianciolo R, Boggess MM, Steiner JM, Suchodolski JS. Urinary Biomarkers of Renal Disease in Dogs with X-Linked Hereditary Nephropathy. *J Vet Intern Med* 2012;26:282–293.

Nabity MB, Lees GE, Cianciolo R, et al. Urinary biomarkers of renal disease in dogs with X-linked hereditary nephropathy. *J Vet Intern Med*. 2012;26:282–293.

Nabity MB. Urine protein and microalbuminuria. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. *Nephrology and Urology of Small Animals*. New Jersey:Wiley-Blackwell 2011:58–61.

Nabity NB, Lees GE, Boggess MM, et al. Symmetric dimethylarginine assay validation, stability, and evaluation as a marker for the early detection of chronic kidney disease in dogs. *J Vet Intern Med* 2015;29:1036–1044.

Nivy R, Avital Y, Aroch I, Segev G. Utility of urinary alkaline phosphatase and γ -glutamyl transpeptidase in diagnosing acute kidney injury in dogs. *Vet J*. 2017;220:43–47.

Ozanturk E, Ucar ZZ, Koca H, et al. Urinary uric acid excretion as an indicator of severe hypoxia and mortality in patients with obstructive sleep apnea and chronic obstructive pulmonary disease. *Rev Port Pneumol*. 2016;22:18–26.

Palm C. Urinary clusterin and serum inosine: biomarkers for early identification of acute kidney injury in dogs. In: proceedings of the 2014 ACVIM forum, 2014: 59.

Paltrinieri S, Mangiagalli G, Ibba F. Use of urinary γ -glutamyl transferase (GGT) to monitor the pattern of proteinuria in dogs with leishmaniasis treated with N-methylglucamine antimoniate. *Research in Veterinary Science*, 2018;119:52–55.

Pardo-Marín L, Martínez-Subiela S, Pastor J, Tvarijonaviciute A, Garcia-Martinez JD, Segarra S and Cerón JJ. Evaluation of various biomarkers for kidney monitoring during canine leishmaniosis treatment. *BMC Veterinary Research* (2017) 13:31.

Parker VJ, Gilor C, Chew DJ. Feline hyperparathyroidism. Pathophysiology, diagnosis and treatment of primary and secondary disease. *J Feline Med and Surg*. 2015; 17:427-439.

Parker VJ, Harjes LM, Dembek K, Young GS, Chew DJ, and Toribio RE. Association of Vitamin D Metabolites with Parathyroid Hormone, Fibroblast Growth Factor-23, Calcium, and Phosphorus in Dogs with Various Stages of Chronic Kidney Disease. *J Vet Intern Med* 2017;31:791–798.

Peterson ME , Varela FM, Rishniw M, and Polzin DJ. Evaluation of Serum Symmetric Dimethylarginine Concentration as a Marker for Masked Chronic Kidney Disease in Cats With Hyperthyroidism. *J Vet Intern Med* 2018;32:295–304.

Pollak MR, Quaggin SE, Hoenig MP, Dworkin LD. The Glomerulus: The Sphere of Influence. *Clin J Am Soc Nephrol* 9: 1461–1469, 2014.

Pressler BM. Clinical approach to advanced renal function testing in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2013;43:1193–1208.

Prowle J, Bagshaw SM, Bellomo R. Renal blood flow, fractional excretion of sodium and acute kidney injury: time for a new paradigm? *Curr Opin Crit Care*. 2012;18:585–592.

Raila J, Aupperle H, Raila G, Schoon HA, Schweigert FJ. Renal pathology and urinary protein excretion in a 14-month-old Bernese mountain dog with chronic renal failure. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med*.2007;54:131–135.

Ronco. Acute kidney injury: from clinical to molecular diagnosis. *Crit care*. 2016;20:201.

Rossi G, Bertazzolo W, Binnella M, Scarpa P, Paltrinieri S. Measurement of proteinuria in dogs: analytic and diagnostic differences using 2 laboratory methods. *Vet Clin Pathol*, 2016;45/3,450–458.

Schenck PA, Chew DJ. Prediction of serum ionized calcium concentration by serum total calcium measurement in dogs. *Am J Vet Res*. 2005; 66:1330-1336.

Schley G, Köberle C, Manuilova E, Rutz S, Forster C, Weyand M, Formentini I, Kientsch-Engel R, Eckardt K-U, Willam C. Comparison of Plasma and Urine Biomarker Performance in Acute Kidney Injury. *PLoS ONE*, 2015;10(12): e0145042.

Schneider SM, Cianciolo RE, Nability MB, Clubb FJ Jr, Brown CA, Lees GE. Prevalence of Immune-Complex Glomerulonephritides in Dogs Biopsied for Suspected Glomerular Disease: 501 Cases (2007–2012). *J Vet Intern Med* 2013;27:S67–S75.

Scott B. Physiology of the kidneys. In: Bartges J, Polzin DJ, eds. *Nephrology and Urology of Small Animals*. New Jersey:Wiley-Blackwell 2011:10-17.

Segev G, Daminet S, Meyer E, et al. Characterization of kidney damage using several renal biomarkers in dogs with naturally occurring heatstroke. *Vet J*. 2015;206:231–235.

Segev G, Kass PH, Francey T, Cowgill LD. A novel clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *J Vet Intern Med*. 2008;22:301–308.

Segev G, Langston C, Takada K, Kass PH, Cowgill LD. Validation of a clinical scoring system for outcome prediction in dogs with acute kidney injury managed by hemodialysis. *J Vet Intern Med*. 2016;30:803–807.

Sharfuddin AA, Molitoris BA. Pathophysiology of ischemic acute kidney injury. *Nat Rev Nephrol*. 2011;7:189–200.

Shirley DG, Unwin RJ. Renal Physiology. In: Floege J, Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive clinical nephrology*. Elsevier Saunder 4° edizione 2010:15-28.

Sigrist NE, Kalin N, Dreyfus A. Changes in serum creatinine concentration and acute kidney injury (AKI) grade in dogs treated with hydroxyethyl starch 130/0.4 from 2013 to 2015. *J Vet Intern Med*. 2017;31:434–441.

Smets PM, Lefebvre HP, Aresu L, et al. Renal function and morphology in aged Beagle dogs before and after hydrocortisone administration. *PLoS ONE*. 2012;7:e31702^a.

Smets PM, Lefebvre HP, Kooistra HS, et al. Hypercortisolism affects glomerular and tubular function in dogs. *Vet J*. 2012;192:532–534^b.

Smets PM, Lefebvre HP, Meij BP, et al. Long-term follow-up of renal function in dogs after treatment for ACTH-dependent hyperadrenocorticism. *J Vet Intern Med*. 2012;26:565–574^c.

Stockham SL, Scott MA. Urinary system. In Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd Edition, Wiley-Blackwell 2008; 8:415-494.

Subramanya AR, Ellison DH. Distal Convolute Tubule Clin J Am Soc Nephrol 9: 2147–2163, 2014.

Théron ML, Piane L, Lucarelli L, Henrion R, Layssol-Lamour C, Palanché F, Concordet D, Braun JPD, Trumel C, Lavoué R. Effects of storage conditions on results for quantitative and qualitative evaluation of proteins in canine urine. *AJVR* 2017;78 (8):990-999.

Thoen ME, Kerl ME. Characterization of acute kidney injury in hospitalized dogs and evaluation of a veterinary acute kidney injury staging system. *J Vet Emerg Crit Care*. 2011;21:648–657.

Troia R, Gruarin M, Agnoli C, et al. Urinary uric acid excretion in dogs with acute kidney injury and systemic inflammation. Abstract from the International Veterinary Emergency and Critical Care Symposium, the European Veterinary Emergency and Critical Care Annual Congress, and the ACVECC VetCOT Veterinary Trauma & Critical Care Conference 2016. *J Vet Emerg Crit Care* 2016; doi:10.1111/vec.12516, S31–32.

Troia R, Gruarin M, Grisetti C, et al. Fractional excretion of electrolytes in volume-responsive and intrinsic acute kidney injury in dogs: Diagnostic and prognostic implications. *J Vet Intern Med*. 2018;00:1–11.

Uchino S, Bellomo R, Bagshaw SA, Goldsmith D. Transient azotemia is associated with a high risk of death in hospitalized patients. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:1833–1839.

Ulleberg T, Robben J, Nordahl KM, Ulleberg T, Heiene R. Plasma creatinine in dogs: intra- and inter-laboratory variation in 10 European veterinary laboratories. *Acta Vet Scand.* 2011;53:25.

Vaden SL, Elliott J. Management of Proteinuria in Dogs and Cats with Chronic Kidney Disease. *Vet Clin Small Anim*, 2016;46:1115–1130.

Vaden SL, Levine J, Breitschwerdt EB. A retrospective case-control of acute renal failure in 99 dogs. *J Vet Intern Med.* 1997;11:58–64.

Van Hoek I, Vandermeulen E, Duchateau L, et al. Comparison and reproducibility of plasma clearance of exogenous creatinine, exo-iohexol, and endoiohexol and ⁵¹Cr-EDTA in young adult and aged healthy cats. *J Vet Intern Med* 2007;21:950–8.

Vanmassenhove J, Glorieux G, Hoste E, Dhondt A, Vanholder R, Van Biesen W. AKI in early sepsis in a continuum from transient AKI without tubular damage over transient AKI with minor tubular damage to intrinsic AKI with severe tubular damage. *Int Urol Nephrol.* 2014;46:2003–2008.

Vanmassenhove J, Glorieux G, Hoste E, Dhondt A, Vanholder R, Van Biesen W. Urinary output and fractional excretion of sodium and urea as indicators of transient versus intrinsic acute kidney injury during early sepsis. *Crit Care.* 2013;17:R234.

Vinge L, Lees GE, Nielsen R, et al. The effect of progressive glomerular disease on megalin-mediated endocytosis in the kidney. *Nephrol Dial Transplant.* 2010;25:2458–2467.

Vitorio D, Maciel AT. Acute kidney injury induced by systemic inflammatory response syndrome is an avid and persistent sodiumretaining state. *Case Rep Crit Care.* 2014;2014:471658.

Waikar SS, Sabbiseti VS, Bonventre JV. Normalization of urinary biomarkers to creatinine during changes in glomerular filtration rate. *Kidney Int.* 2010;78:486–494.

Waldrop JE. Urinary Electrolytes, Solutes, and Osmolality, *Vet Clin Small Anim*, 2008; 38: 503–512.

Watson AD, Lefebvre HP, Concordet D, et al. Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. *J Vet Intern Med* 2002;16:22–33.

Wellman ML, DiBartola SP, Kohn CW. Applied Physiology of Body Fluids in Dogs and Cats. In: DiBartola SP, Fluid, electrolyte, and acid-base disorders in small animal practice. Elsevier Saunder 2012:2-25.

www.beckamcouter.com

www.iris-kidney.com, 2016.

www.iris-kidney.com, 2017.

Zaragoza C, Barrera R, Centeno F, et al. SDS-PAGE and Western blot of urinary proteins in dogs with leishmaniasis. *Vet Res.* 2003;34:137–151.

Zygner W, Gójska-Zygner O, Wesółowska A, Wędrychowicz H. Urinary creatinine to serum creatinine ratio and renal failure index in dogs infected with *Babesia canis*, *Acta Parasitologica*, 2013