



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA

SCUOLA DI DOTTORATO
SANITA' E PRODUZIONI ANIMALI: SCIENZA, TECNOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

DIPARTIMENTO DI PATOLOGIA ANIMALE, IGIENE
E SANITÀ PUBBLICA VETERINARIA
Sezione di Patologia Generale e Parassitologia

DOTTORATO DI RICERCA IN IGIENE VETERINARIA
E PATOLOGIA ANIMALE - XXIII CICLO

**IDENTIFICAZIONE DI NUOVI BIOMARKER E METODI ANALITICI INNOVATIVI
IN PATOLOGIA CLINICA VETERINARIA**

VET 03

Docente Guida: Prof. Saverio Paltrinieri

Coordinatore del Dottorato: Prof. Claudio Genchi

Tesi di Dottorato di:

Gabriele Rossi

Anno Accademico 2009-2010

INDICE	
RASSEGNA BIBLIOGRAFICA.....	4
VALIDAZIONE ED UTILITA' PRATICA DEI TEST DI LABORATORIO.....	5
I FASE – VALIDAZIONE ANALITICA.....	6
II FASE – VALUTAZIONE DELLA SOVRAPPONIBILITA' DELLE PRESTAZIONI	12
III FASE – VALUTAZIONE CLINICA	12
IV FASE - VALUTAZIONE DELL'UTILITÀ CLINICA E DELL'OUTCOME.....	15
SCOPO DEL LAVORO.....	16
STUDI SPERIMENTALI.....	19
OBIETTIVO 1 – VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES ANALITICHE DI STRUMENTI E METODI IN EMATOLOGIA	20
IDENTIFICAZIONE DI CELLULE EMATICHE NEOPLASTICHE UTILIZZANDO IL SYSMEX XT-2000iV: UNO STEP PRELIMINARE NELLA DIAGNOSI DI LEUCEMIA NEL CANE	23
IDENTIFICAZIONE MEDIANTE CONTAGLOBULI SYSMEX XT-2000iV DELLA FRAZIONE PIASTRINICA AD ALTA FLUORESCENZA IN CORSO DI MACROTROMBOCITOPENIA DEL NORFOLK TERRIER	36
OBIETTIVO 2 – VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES ANALITICHE E DIAGNOSTICHE DI METODI PER L'IDENTIFICAZIONE DI MARKERS INFIAMMATORI.....	40
METODI ANALITICI PER LA MISURAZIONE DEI METABOLITI REATTIVI DELL'OSSIGENO (dROMS) NEL CANE E ATTIVITÀ DEI D-ROMS IN CORSO DI LEISHMANIOSI	43
DETERMINAZIONE DELL'IFN- γ FELINO CON METODO ELISA, DEI dROMs CON METODO ENZIMATICO E MESSA A PUNTO DI UN MODELLO SPERIMENTALE DI VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE DI LEUCOCITI EMATICI INCUBATI CON PEPRIDI IMMUNOGENI DI CORONAVIRUS FELINO	54
VALIDAZIONE ANALITICA DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ENZIMA PARAOXONASI (PON1) E INDAGINI PRELIMINARI DEL SUO RUOLO COME PROTEINA DI FASE ACUTA NEGATIVA NEL CANE E NEL VITELLO	64
OBIETTIVO 3 - VALIDAZIONE ANALITICA E DIAGNOSTICA DI MARKER DI IPERTENSIONE NELLE PATOLOGIE CARDIACHE E RENALI DEL CANE: OMOCISTEINA ED ENDOTELINA-1	74
MISURAZIONE DELL'OMOCISTEINA CON UN METODO ENZIMATICO E VALUTAZIONE DEL POTENZIALE RUOLO DELL'OMOCISTEINA COME BIOMARKER NEL CANE.....	77
CONCENTRAZIONE DI OMOCISTEINA IN CANI AFFETTI DA INFLAMMATORY BOWEL DISEASE.	82
CONCENTRAZIONI DI OMOCISTEINA IN CANI CARDIOPATICI	84

CONCENTRAZIONI DI OMOCISTEINA E DI ENDOTELINA 1 IN CANI CON MALATTIA RENALE	85
OBIETTIVO 4 - SVILUPPO DI METODI E VALIDAZIONE BIOLOGICA DELL'ACIDO SIALICO TOTALE, DEL TIPO DI SIALILAZIONE E DELL'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA SIALILTRASFERASI	93
VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO SIALICO TOTALE (TSA) NEL GATTO E VERIFICA DEL POTENZIALE RUOLO DEL TSA NELLE CORONAVIROSI FELINE.....	94
VALIDAZIONE DI UN METODO IN FASE SOLIDA PER L'ANALISI DEL TIPO DI SIALILAZIONE DI PROTEINE PLASMATICHE E TISSUTALI E APPLICAZIONE NELLO STUDIO DEI TUMORI MAMMARI DEL CANE	104
OBIETTIVO 5 - VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES ANALITICHE DEI METODI DI DETERMINAZIONE DELLA PROTEINURIA	121
CONCLUSIONI	131
BIBLIOGRAFIA	134
APPENDICE.....	164

RASSEGNA BIBLIOGRAFICA

VALIDAZIONE ED UTILITA' PRATICA DEI TEST DI LABORATORIO

GENERALITA'

Nella pratica clinica veterinaria le analisi di laboratorio sono diventate parte integrante dell'iter diagnostico. Il patologo clinico affianca il clinico nella formulazione della diagnosi e della prognosi e nel monitoraggio della terapia. Per questo motivo vengono costantemente introdotti nuovi strumenti o nuovi marker con l'obiettivo di espandere o sostituire i pannelli di esami attualmente a disposizione sul mercato. Una delle principali funzioni del patologo clinico è individuare e ridurre l'entità dell'errore intrinseco ad ogni metodo, in modo da assicurare che né l'interpretazione dei risultati né, di conseguenza, la cura del paziente vengano compromessi. In un secondo tempo il patologo clinico è chiamato a verificare anche l'efficacia diagnostica del test che ha messo a punto, verificandone le eventuali differenze di concentrazione negli animali malati. Pertanto la principale sfida per il patologo clinico, nel momento in cui strumenti o metodi nuovi vengono introdotti nel laboratorio, è costituita proprio dalla fase di validazione per assicurare che i risultati riflettano l'effettivo stato clinico del paziente piuttosto che la variabilità analitica del test stesso. A prescindere dalla precisione e accuratezza di un test, la scelta di inserire o sostituire un nuovo marker in un pannello diagnostico, deve necessariamente essere correlata al riscontro pratico di questo e in particolare deve incidere positivamente sulle decisioni cliniche e sulla gestione del paziente (Zweig e Robertson, 1982), come vedremo successivamente.

La validazione diagnostica di un test o di uno strumento si compone di quattro fasi, che comprendono sia la valutazione delle performance analitiche, sia l'effettiva applicabilità e utilità del test in campo clinico.

Prima di cominciare con la validazione vera e propria è necessario familiarizzare con il nuovo test, sia da un punto di vista teorico che pratico. Questa fase consente di evitare errori dovuti a procedure errate che potrebbero invalidare i risultati o protrarre i tempi dello studio. In questa fase si devono quindi acquisire informazioni sul principio analitico (in modo da interpretare correttamente i risultati e risolvere eventuali problemi analitici), sulla procedura di esecuzione del test, sui materiali e degli strumenti necessari, l'elenco dei reagenti, la tipologia dei campioni che può essere analizzata, le procedure di calibrazione e i materiali di controllo. Infine, non meno importante, è l'indagine sull'effettiva applicabilità del test una volta accettate le performance analitiche e diagnostiche: prima di proporre tests o strumenti nuovi è necessario essere a conoscenza della facilità nel reperire i reagenti o lo strumento oggetto di analisi, i costi, le abilità tecniche dell'operatore e i tempi necessari per l'esecuzione dell'esame (Jensen e Kjelgaard-Hansen, 2010).

Una volta familiarizzato con il test, si può procedere alla validazione del test che si compone di 4 fasi distinte:

- **I fase – Validazione analitica**

valutazione delle performances analitiche e della riproducibilità del test

- **II fase – Valutazione della sovrapposibilità delle prestazioni**

determinazione dei valori negli animali sani e malati, rileva cioè la capacità del test di discriminare tra animali sani e malati

- **III fase – Valutazione clinica**

valutazione della sensibilità e specificità diagnostica nei gruppi con patologie di interesse diverse

- **IV fase – Valutazione dell'utilità clinica e dell'outcome**

valutazione dei possibili benefici per l'individuo (o per la comunità) che derivano dall'utilizzo del nuovo test (es: precocità di informazione, migliore resa rispetto a metodi preesistenti, ecc...)

I costi della validazione diagnostica diventano maggiori ad ogni passaggio, pertanto questo approccio step by step consente di identificare precocemente i limiti del test, in modo da interrompere la validazione prima di aver completato tutte e quattro le fasi e quindi prima di aver inutilmente sprecato le risorse economiche.

I FASE – VALIDAZIONE ANALITICA

Questa fase consiste essenzialmente nella valutazione delle caratteristiche analitiche e dell'applicabilità del test. Prima di iniziare uno studio di validazione è consigliabile valutare l'applicabilità del nuovo test, con particolare riguardo al costo dello strumento o dei reagenti, la disponibilità dei reagenti e del materiale di controllo, i requisiti per raccogliere i campioni, il tempo necessario ad ottenere i risultati, il livello di esperienza necessario per effettuare l'analisi e l'efficacia produttiva.

Per quanto riguarda la vera e propria valutazione delle caratteristiche analitiche, può essere distinta in tre parti: la prima è quella di stabilire le caratteristiche qualitative soggettive che il nuovo test che si sta validando deve avere, in particolare sono caratteristiche scelte in modo soggettivo da ogni laboratorio in base al contributo positivo che apporta durante le decisioni cliniche, la seconda è quella della determinazione delle performance analitiche e l'ultima è quella di giudicare l'accettabilità di queste performance sulla base del confronto con le caratteristiche qualitative precedentemente stabilite.

I laboratori di diagnostica veterinaria spesso non definiscono tali caratteristiche di qualità, pertanto il giudizio sulle performance di un metodo analitico si basa su criteri generali che spesso non identificano le reali deficienze del metodo nell'incidenza sulle decisioni cliniche (Freeman et al., 2006). Tale problema è già stato affrontato una decina di anni fa in medicina umana, e per porvi rimedio è stata proposta una scala gerarchica di criteri da usare per definire le caratteristiche qualitative di ogni test o strumento (Kenny et al., 1999).

N.	MODELLO	FONTE DI INFORMAZIONI
1	Valutazione dell'effetto delle performance analitiche sull'esito clinico in specifici gruppi di patologie	
2	Valutazione dell'effetto delle performance analitiche sulle decisioni cliniche in generale	2.a. Dati basati sulla variabilità biologica 2.b. Dati basati sull'analisi delle opinioni del clinico
3	Raccomandazioni professionali pubblicate da	3.a. Comitati di esperti nazionali ed internazionali 3.b. Comitati di esperti locali o da singoli individui
4	Obiettivi delle performance selezionati da	4.a. Gruppi di regolamentazione 4.b. Organizzatori degli schemi di valutazione esterna di qualità
5	Obiettivi sulla base dell'attuale bibliografia	5.a. Dati provenienti dagli schemi di valutazione esterna di qualità o dai proficiency test 5.b. Pubblicazioni attuali sulle metodiche

Tabella 1 Gerarchia dei modelli da applicare per definire le caratteristiche qualitative (Kenny et al., 1999, modificato)

Più recentemente, lo stesso sistema gerarchico è stato proposto in medicina veterinaria (Jensen e Kjelgaard-Hansen, 2006; Jensen e Kjelgaard-Hansen, 2010) (tabella 1). Osservando questo modello appare evidente come la rilevanza clinica del test divenga l'obiettivo principale, tanto che i criteri posti in alto nella scala gerarchica sono quelli nei quali è data maggiore importanza proprio all'impatto clinico.

Chiaramente la scelta d'elezione è quella del primo livello. Purtroppo in medicina veterinaria le informazioni presenti in letteratura spesso non sono sufficienti. Di conseguenza si procede in ordine decrescente fino a trovare un criterio applicabile in base alle informazioni che si hanno a disposizione, anche se la situazione più frequente è l'applicazione dei livelli rimanenti (dal III al V) che però sono caratterizzati da una elevata soggettività (raccomandazioni generate da una commissione di esperti o addirittura da un singolo individuo), pur avendo, nella scala gerarchica, maggiore importanza rispetto, per esempio, ai criteri di accettazione riportati in letteratura che apparentemente risultano più oggettivi. Tuttavia questi ultimi dati sono ottenuti esclusivamente da analisi di laboratorio e possono non avere nessuna relazione con le reali esigenze cliniche. Viceversa, l'opinione di un esperto può avere un maggiore impatto sulle esigenze del clinico e per questo è un criterio posto più in alto nella scala gerarchica. Questa soggettività potrebbe in parte spiegare la riluttanza, da parte dei patologi clinici, ad utilizzare questi criteri (Kjelgaard-Hansen e Jensen, 2010), tuttavia la scala gerarchica dovrebbe essere sempre presa in considerazione durante la validazione analitica di un test.

La seconda parte corrisponde alla valutazione delle performance analitiche vera e propria con l'obiettivo di identificare e quantificare fonti e tipi di errore intrinseci ad ogni test o strumento diagnostico. In letteratura sono state pubblicate numerose linee guida per determinare le performance analitiche di un metodo (Lumsden, 2000; Jensen e Kjelgaard-Hansen, 2006; Jensen e Kjelgaard-Hansen, 2010), ma in linea generale la validazione di un metodo ha lo scopo di identificare le fonti di un potenziale errore analitico. In particolare l'errore analitico è costituito da due differenti tipi di errore: l'errore random e quello sistematico. L'errore random identifica la variabilità intrinseca al metodo stesso (imprecisione), mentre l'errore sistematico identifica quanto il valore misurato si discosta dal valore reale (inaccuratezza). Imprecisione e inaccuratezza sono quindi i primi due requisiti del test da verificare. Di seguito verranno illustrate le procedure analitiche necessarie a valutare imprecisione e inaccuratezza e quelle per ottenere altre informazioni sulle performances analitiche dei test, quali il limite quantificabile, il limite rilevabile e la presenza di interferenza analitiche.

IMPRECISIONE: per valutare l'imprecisione di un metodo è necessario identificare la concordanza tra più letture eseguite in serie sullo stesso materiale. In particolare viene valutata prima la ripetibilità intra-assay ovvero l'imprecisione all'interno di una stessa sessione di lavoro e, nel caso in cui la precisione fosse accettabile si procede poi con la valutazione della ripetibilità inter-assay, cioè tra sessioni di lavoro differenti. La valutazione dell'errore random (quindi dell'imprecisione) anche tra sessioni di lavoro differenti, serve per includere il maggior numero possibili di variabili che possono influire negativamente sulla precisione del metodo (per esempio: operatore differente, temperatura di lavoro differente, calibrazione differente, etc...).

L'imprecisione è influenzata anche dalla concentrazione dell'analita, per valutare anche questo fattore la valutazione della ripetibilità delle misurazioni andrebbe eseguita su campioni nei quali la concentrazione rispecchi i range di concentrazione che possono normalmente essere trovati nei campioni, sia sani che con le patologie per le quali si prevede di applicare il nuovo test oggetto di studio, o comunque ad almeno due differenti concentrazioni che siano vicine ai punti di decisione clinica. Da un punto di vista pratico l'imprecisione intra-assay può essere valutata in due differenti modi: dal valore delle differenze tra numerosi campioni letti in duplicato, oppure dal valore delle differenze tra numerose misurazioni ripetute su un numero limitato di campioni (solitamente 20 letture ripetute su tre campioni con valori bassi, medi e alti rispetto al range di concentrazione atteso). Le differenze tra le misure ripetute vengono usate per calcolare la media, la deviazione standard (SD) e il coefficiente di variazione (CV). L'imprecisione inter-assay viene valutata su un numero non inferiore a tre campioni con concentrazione bassa, media e alta dell'analita che si sta indagando. Un'alternativa può essere quella di utilizzare il materiale di controllo con concentrazione nota, soprattutto in caso di instabilità dell'analita nel campione. Anche in questo caso i campioni vengono misurati in duplicato per un periodo non inferiore a 5 giorni (oppure fino a 20 letture in sessioni di lavoro differenti). L'entità dell'imprecisione viene espressa in percentuale con la formula: $CV=(SD \times 100\%)/media$

ACCURATEZZA: viene definita dall'International Federation of Clinical Chemists (IFCC) come la concordanza tra valore misurato e valore reale nel campione (Koch e Peters, 1999). In particolare due tipi di errori possono influenzare l'accuratezza di un metodo: l'errore sistematico costante e l'errore sistematico proporzionale. Il primo tipo di errore indica una costante sovra o sottostima del nuovo metodo in confronto al valore reale. Il secondo tipo invece indica che l'entità delle differenze tra il valore reale e quello misurato con il nuovo test dipende dalla concentrazione dell'analita (per esempio l'accuratezza potrebbe diminuire al crescere della concentrazione dell'analita o viceversa potrebbe diminuire quando la concentrazione diminuisce).

Da un punto di vista pratico il sistema più semplice per valutare l'accuratezza è quello di confrontare i risultati del nuovo test con quelli di un test già esistente che sia in grado di fornire la misura corretta dell'analita oggetto di studio, con la quale confrontare i nuovi risultati. Questi test vengono definiti come gold standard in quanto rappresentano, tra tutti i test esistenti, quelli con la migliore precisione, accuratezza e sensibilità. Frequentemente in biochimica clinica il test di riferimento è la spettrometria di massa o la cromatografia o comunque tecniche molto sensibili in grado di rilevare anche piccole variazioni di concentrazione. Spesso però questi metodi sono costosi, richiedono strumenti poco diffusi nei laboratori di diagnostica clinica, richiedono un elevato livello tecnico per l'esecuzione delle analisi e possono processare pochi campioni per volta. Pertanto, spesso si ricorre a sistemi di validazione cosiddetti "indiretti" in grado di fornire comunque informazioni attendibili riguardo all'accuratezza, come lo spiking recovery o la valutazione della linearità.

In sostituzione al confronto con il gold standard è possibile anche usare un materiale di controllo certificato (misurato con il gold standard) purché sia differente dal materiale utilizzato per la calibrazione.

Spiking recovery test: utilizzato soprattutto per identificare un errore sistematico proporzionale. Consiste nel misurare l'analita in un campione prima e dopo aggiunta di una quantità nota dell'analita stesso. Solitamente si aggiungono, in un campione con bassa concentrazione, aliquote ad alta concentrazione in quantità via via crescente. In alternativa si possono anche unire due campioni a titolo noto ed effettuare gli opportuni calcoli per valutare la concentrazione finale attesa. Le misurazioni andrebbero effettuate in doppio in caso di aggiunta di quantità significative e in quadruplo in caso di piccole aggiunte e quindi di piccole differenze (Westgard, 2003; Koch e Peters, 1999); in tutti i casi viene utilizzato il valore medio delle letture multiple per valutare i risultati. Questi ultimi vengono espressi in percentuale rispetto al valore atteso e vengono calcolati sottraendo la concentrazione di partenza da quella finale. Il risultato viene diviso per la quantità aggiunta per correggere l'effetto diluizione e il valore viene moltiplicato per 100. Idealmente la percentuale misurata dell'analita aggiunto dovrebbe essere pari al 100% di quella attesa, ma vengono considerati accettabili i valori compresi tra l'80 e il 120%. Da un punto di vista pratico con questo sistema si ottengono numerose misurazioni in uno spettro di concentrazione molto ampio e quindi l'eventuale errore dovrebbe emergere in modo evidente.

Linearità: concettualmente è un metodo sovrapponibile al precedente con la differenza che lavora in maniera opposta. Anche in questo caso un campione a titolo noto viene misurato in doppio prima e dopo diluizioni scalari fino a identificare il limite rilevabile (che in questa tesi verrà illustrato successivamente). Per valutare la relazione tra il valore misurato e quello atteso si effettua l'analisi della regressione e se il valore del coefficiente della regressione lineare include 1 allora indica che la quantità recuperata è il 100%.

Materiale di controllo: l'accuratezza può essere valutata anche sul materiale di controllo del quale la casa produttrice fornisce il valore reale. In pratica l'accuratezza viene valutata misurando ripetutamente (dalle 20 alle 40 volte) lo stesso materiale a titolo noto. In alternativa è possibile usare la media dei valori ottenuti da più laboratori, che rientrano in un piano di controllo qualità esterno che coinvolge appunto diversi laboratorio che adottano lo stesso standard per il controllo di qualità. Per evidenziare le differenze tra il valore atteso e quello misurato è sufficiente usare un test t oppure il test di Wilcoxon se i dati sono distribuiti in modo non normale .

Confronto tra metodi: quando è possibile applicarlo, rimane il metodo d'elezione per la valutazione dell'accuratezza di un metodo. Permette di identificare il tipo e l'entità dell'errore sistematico tra due metodi e di giudicarne la correlazione sulla base dell'imprecisione intrinseca al metodo stesso oppure sulla base delle specifiche di qualità definite prima di iniziare lo studio. In letteratura sono presenti numerosi lavori che riportano dettagliatamente le linee guida da seguire per eseguire in maniera corretta il confronto tra due metodi. Anche in questo caso valgono i principi generali riportati precedentemente ed è necessario acquisire familiarità con entrambi i metodi. A questo punto si può procedere con la valutazione della precisione per definire l'entità dell'errore random di entrambi i metodi. Queste informazioni si possono ottenere con le stesse modalità riportate precedentemente. Una fase importante è quella di stabilire il numero di campioni che deve essere incluso nella comparazione tra metodi, infatti un corretto numero di campioni influenza positivamente la forza dei test statistici che verranno successivamente usati per analizzare i risultati. Come prima cosa è

necessario tenere in considerazione che le concentrazioni dell'analita nei campioni che si stanno analizzando devono rispecchiare il range di concentrazione che può essere rilevato durante le sessioni di lavoro, quindi è necessario includere sia campioni provenienti da animali sani, che campioni prelevati da animali affetti da tutte le patologie per le quali si prevede, durante la routine, di applicare il test oggetto di studio. E' stato dimostrato che un criterio valido per decidere il numero di campioni da includere nello studio può essere il rapporto tra il range massimo e quello minimo: se il rapporto è basso occorre includere un maggiore numero di campioni, viceversa se il rapporto è alto il numero di campioni da includere può essere ridotto (Linnet, 1999).

Prima di procedere con la misurazione vera e propria è necessario stabilire i criteri per giudicare accettabile o meno l'errore analitico totale che risulterà dal confronto tra i metodi. A tale scopo possono essere adottate due diverse strategie: la prima si basa sul calcolo dell'imprecisione intrinseca a ciascun metodo che viene calcolata con la seguente formula: $(CV^2_{\text{metodo1}} + CV^2_{\text{metodo2}})^{1/2}$. Le differenze tra i due metodi, sulla base del valore medio dei due metodi e dell'imprecisione intrinseca calcolata col la precedente formula, deve essere compresa nell'intervallo: $0 \pm 1.96 \times CV \times \text{valore medio dei due metodi}$.

Il secondo approccio è quello di specificare i limiti di accettabilità sulla base delle specifiche di qualità sulla base della scala gerarchica precedentemente riportata, basata sull'evidenza clinica. Un'alternativa è rappresentata dal calcolo dell'errore totale massimo tollerabile (TAE_{max}), che può essere obiettivamente calcolato sulla base dell'imprecisione, dell'inaccuratezza e della variabilità biologica individuale e tra più soggetti. Chiaramente per utilizzare il TAE_{max} è necessario possedere dati sulla variabilità biologica dell'analita in oggetto. In medicina veterinaria le informazioni riguardanti la variabilità biologica sono confinate ai parametri ematologici e biochimici usati più comunemente. Spesso queste informazioni mancano, soprattutto per marker innovativi non ancora inclusi nei pannelli di esami. In questi casi un'alternativa da cui partire per definire le specifiche di qualità possono essere i dati sulle performance analitiche riportate dal *Clinical Laboratory Improvement Amendments* (CLIA) anche se sono dati che fanno riferimento alla medicina umana.

L'analisi dei risultati è inizialmente grafica: i risultati dei due metodi vengono *plottati* uno contro l'altro per valutare la loro distribuzione lungo la linea di uguaglianza e la presenza di outliers. Se i dati sono distribuiti in modo lineare e non raggruppati ad una estremità della linea di uguaglianza, allora si può effettivamente procedere con la correlazione statistica vera e propria. Il coefficiente di correlazione non indica l'entità dell'agreement tra i due metodi, ma solo la correlazione cioè l'andamento dell'una in proporzione all'altra. Un coefficiente di correlazione (r) più alto di 0.975 (per dati che comprendono un range piccolo) o 0.99 (per dati che comprendono un range più ampio) indicano che la semplice regressione lineare fornisce informazioni valide riguardo l'errore costante e l'errore proporzionale tramite l'intercetta e la pendenza, rispettivamente. Se l'intercetta è significativamente differente da zero, allora è presente un errore costante, se la pendenza è significativamente diversa da uno, allora è presente un errore proporzionale. Un coefficiente di correlazione minore di 0.975 (o di 0.99) è un indicatore del fatto che il numero di campioni non era sufficiente per avere dei

risultati statisticamente validi e sarà quindi necessario analizzare un maggior numero di campioni oppure un altro tipo di analisi statistica (per esempio test di regressione lineare come Deming o Passing-Bablok).

Una volta determinato l'errore sistematico si può giudicare l'accettabilità dei risultati ottenuti con due metodi:

- A. sulla base della combinazione dell'imprecisione intrinseca ai due metodi confrontati: tale approccio si effettua mediante un grafico che confronta le differenze tra i metodi e la media dei metodi. Nel grafico viene inserita la linea rappresentante lo zero \pm la combinazione dei CV dei due metodi. Se i metodi sono identici le differenze dovrebbero distribuirsi simmetricamente intorno alla linea dello zero e il 95% delle differenze deve essere all'interno delle linee corrispondenti all'entità dell'imprecisione dei metodi.
- B. sulla base delle caratteristiche di qualità determinate prima dello studio: ciò può essere valutato in due modi: il più semplice utilizza l'errore totale massimo tollerabile (TAE_{max}) e la *Medical Decision Chart* (MEDx chart), strumento grafico per comparare inaccuratezza e imprecisione il cui uso richiede che le specifiche di qualità analitica siano state determinate sulla base dell'errore totale tollerabile (TAE).

LIMITE QUANTIFICABILE: è definito come la più bassa concentrazione di analita che il test, con una data probabilità, riesce a distinguere dal bianco. In pratica identifica la sensibilità analitica del test e serve come limite d'attenzione per sapere il valore che si ottiene quando in realtà la concentrazione dell'analita è nulla. Viene calcolato mediante 20-30 misurazioni ripetute del campione contenente una concentrazione bassa di analita o meglio ancora contenente solo il bianco reattivo (il reagente privo di campione o nel quale viene posta acqua distillata invece del campione). Viene quindi calcolato il valore medio e la deviazione standard, e la stima del limite rilevabile viene calcolata con la seguente formula: valore medio (o zero) + 2 (o 3) x SD.

LIMITE RILEVABILE: è definito come la concentrazione più bassa di analita che il test misura con accettabile precisione e accuratezza per un dato range analitico (Kock e Peters, 1999) ed identifica l'abilità del metodo di differenziare il "rumore di fondo" dal cambiamento di segnale vero e proprio dovuto alla presenza dell'analita.

INTERFERENZA: alcuni componenti ematici (per esempio: lipidi, bilirubina ed emoglobina) se in eccesso possono interferire con i test di laboratorio. In particolare queste sostanze interferenti possono portare ad un errore sistematico quando il metodo ha una bassa specificità per l'analita che si sta misurando, pertanto è buona norma valutare il loro livello di interferenza, almeno per stabilire la concentrazione massima che può essere tollerata prima di avere un'effettiva influenza sui risultati. Dal punto di vista pratico per valutare l'entità dell'interferenza si parte da un campione in cui viene misurata in doppio la concentrazione dell'analita che si sta valutando. A questo punto il campione viene diviso in più aliquote a cui vengono aggiunte concentrazioni diverse di sostanze interferenti (es: lipidi, bilirubina o emoglobina). Per evitare l'effetto di diluizione dovuto all'aggiunta degli interferenti si utilizzano sostanze molto concentrate in modo da minimizzare la quantità di interferente da aggiungere. Comunque, per tenere in considerazione anche l'effetto della diluizione vengono

allestite anche aliquote nelle quali viene aggiunta una quantità di acqua pari alla quantità degli interferenti. L'errore sistematico, quando viene raggiunta una concentrazione critica, viene poi calcolato sulla base della differenza di concentrazione tra il campione con la sostanza interferente e quello con l'acqua.

La procedura sopra descritta consente di valutare l'interferenza dovuta ai composti endogeni più spesso presenti nel sangue. Nella pratica, però, altre sostanze endogene (es: ioni, composti organici) o esogene (es: farmaci, ecc...) possono interferire con la misurazione di un determinato analita, legandosi ad esso o fungendo da cofattori (o, al contrario, inibendo i cofattori) delle reazioni ricreate "in vitro" per determinare l'analita stesso. In fase di validazione, quindi, nel caso si conosca (solitamente per analogia con la medicina umana) o si sospetti (es: per la presenza di misurazioni "anomale" in corso di determinate patologie) l'eventuale interferenza di composti diversi dai tre sopra citati, può essere opportuno ripetere le prove di interferenza utilizzando, al posto di lipidi, bilirubina ed emoglobina, le sostanze interferenti "sospette".

II FASE – VALUTAZIONE DELLA SOVRAPPONIBILITA' DELLE PRESTAZIONI

Mentre l'obiettivo della prima fase era focalizzato esclusivamente sulle performance analitiche del test, questa seconda fase invece è focalizzata sulla rilevanza clinica del nuovo test o del nuovo marker. Una volta repute accettabili le performance analitiche, è necessario un primo screening sulla capacità del test di differenziare animali sani e malati. In questa fase il test viene valutato su materiale altamente selezionato: i campioni positivi provengono da animali che presentano solo la patologia specifica (spesso in stadi già avanzati, più facili da riconoscere e da includere nello studio) per la quale si sta studiando il marker o mettendo a punto il test. In questa fase è quindi fondamentale escludere patologie concomitanti che potrebbero confondere l'interpretazione dei risultati. Come controllo negativo si usano campioni privi della patologia di interesse e per semplificare tale fase spesso i campioni provengono esclusivamente da animali sani, nei quali è stata dimostrata clinicamente e tramite indagini complementari l'assenza di patologie. In questo modo la prevalenza della malattia è sovrastimata e la sovrapposizione dei risultati tra animali sani e malati è quindi minimizzata. Dal punto di vista pratico vengono testati 20-30 animali per gruppo e vengono calcolati media o mediana, deviazione standard o percentili e minimo e massimo. Per valutare se ci sono differenze statisticamente significative tra i gruppi si utilizzano test t per dati non appaiati. Un'elevata sovrapposizione tra gruppi di solito è indice di scarso valore diagnostico, pertanto conviene interrompere la validazione considerando che se il test non differenzia il materiale molto selezionato, ancora meno differenzierà campioni clinici non selezionati. In caso invece di buon potere discriminante, si procederà con le successive fasi di validazione.

III FASE – VALUTAZIONE CLINICA

L'obiettivo di questa fase è quello di determinare l'accuratezza diagnostica, ovvero la capacità del nuovo test di contribuire al processo di decisione clinica. Questa fase necessita un'attenta pianificazione per evitare errori che possano influenzare i risultati e le conclusioni che ne vengono tratte. Per tale motivo sono state pubblicate linee guida (Bossuyt et al., 2003a; Bossuyt et al., 2003b) che andrebbero seguite pedissequamente per

evitare gli errori che comunemente si riscontrano in letteratura, dovuti alla valutazione poco rigorosa del potere diagnostico del test. La prematura diffusione di un test in ambito clinico, prima del completamento di tale fase, può portare a sovrastimarne l'accuratezza diagnostica, con gravi ripercussioni durante il processo di decisione clinica. Le fasi più critiche vengono riguardano:

Selezione degli animali appropriati: l'accuratezza diagnostica dovrebbe essere valutata su una popolazione selezionata in base alla rilevanza clinica della patologia che si vuole indagare con il nuovo test. Ad esempio dovrebbero essere inclusi animali che presentino patologie che rientrano tra le diagnosi differenziali della patologia che il nuovo test dovrebbe discriminare, in modo da valutare il test nelle condizioni più simili a quelle riscontrabili nella pratica clinica. E' fondamentale specificare i criteri di inclusione degli animali nello studio, soprattutto perché animali senza la patologia in oggetto potrebbero avere patologie che altri utilizzatori del test non considerano appropriata come diagnosi differenziale. Il numero di animali finale dovrebbe essere almeno superiore a 40 per considerare affidabili i risultati dei test statistici che verranno applicati successivamente.

Classificazione indipendente degli animali selezionati: una volta decisi e applicati i criteri di inclusione, gli animali vanno suddivisi in due gruppi: con e senza patologia di interesse, indipendentemente dalla valutazione degli esami di laboratorio. E' fondamentale specificare i criteri diagnostici utilizzati .

Applicazione del test su tutta la popolazione di animali inclusi nello studio: idealmente questa fase andrebbe effettuata su animali allo stesso stadio clinico della patologia, ma da un punto di vista pratico è solitamente difficile, se non impossibile, rispettare queste condizioni.

I risultati delle analisi effettuate sulla popolazione così selezionata possono essere sottoposti a diverse analisi statistiche, con l'obiettivo di acquisire ulteriori informazioni sulla reale utilità e applicabilità nella pratica clinica.

Sensibilità e specificità: la sensibilità identifica la capacità del test di identificare animali malati, mentre la specificità è la capacità del test di identificare animali sani. Per calcolare sensibilità e specificità è necessario conoscere il reale stato dell'animale e dividere i soggetti non affetti dalla patologia indagata dai malati (affetti dalla patologia) e confrontare tali informazioni con i risultati del test in una tabella a doppia entrata (tabella 2).

	PRESENZA DELLA PATOLOGIA	ASSENZA DELLA PATOLOGIA	
TEST POSITIVO	VP	FP	$VPP=VP/(VP+FP)$
TEST NEGATIVO	FN	VN	$VPN=VN/(VN+FN)$
	$SENSIBILITA'=VP/(VP+FN)$	$SPECIFICITA'=VN/(VN+FP)$	

Tabella 2 Tabella a doppia entrata per il calcolo della sensibilità e della specificità.

(VP: veri positivi; FP: falsi positivi; FN: falsi negativi; VN: veri negativi; VPP: valore predittivo positivo; VPN: valore predittivo negativo)

La sensibilità viene calcolata in base alla proporzione di animali malati che sono risultati positivi al test, mentre la specificità in base alla proporzione di animali senza la patologia oggetto di studio, che sono risultati negativi

al test. Idealmente un test dovrebbe avere il 100% sia di sensibilità che di specificità, ma in realtà non esiste un test con queste caratteristiche e quindi, a seconda dell'obiettivo dell'analisi si predilige un test con maggiore sensibilità se, per esempio, viene applicato come test di screening, dato il basso numero di falsi negativi e quindi se l'animale ha la patologia è molto probabile che risulti positivo al test, mentre un test con elevata specificità viene preferito per confermare lo stato patologico dell'animale, dato il basso numero di falsi positivi e quindi in caso di risultato positivo del test c'è un'elevata probabilità che l'animale abbia la patologia.

Valore predittivo: è un dato importante quando il test viene utilizzato per scopi diagnostici perché identifica la probabilità che l'animale sia malato quando il test risulta positivo e, viceversa, la probabilità che l'animale sia sano quando il test risulta negativo. Queste informazioni sono fornite dal valore predittivo positivo (VPP) e dal valore predittivo negativo (VPN), rispettivamente. Tali valori possono essere calcolati utilizzando la stessa tabella a doppia entrata riportata precedentemente se la proporzione di animali affetti dalla patologia riflette l'effettiva prevalenza (P) di questa nella popolazione nella quale verrà applicato il nuovo test. In molti casi la proporzione di animali malati nella tabella non rispecchia la reale prevalenza della patologia e quindi i valori predittivi positivi e negativi devono essere calcolati includendo anche questa informazione, con le formule:

$$VPP = (\text{Sensibilità} \times P) / \{(\text{Sensibilità} \times P) + [(1-P) (1-\text{Specificità})]\}$$

$$VPN = [\text{Specificità} (1-P) / \{[\text{SP} (1-P)] + [P (1-\text{Sensibilità})]\}]$$

Se la prevalenza della malattia è bassa il VPP è basso e viceversa se la prevalenza è alta il VPP è alto. Dal punto di vista clinico per aumentare l'utilità del test in caso di bassa prevalenza, si può valutare la probabilità pre-test mediante anamnesi e visita clinica, così da aumentare la predittività del test. In pratica se il sospetto, prima di effettuare il test, è elevato, un risultato positivo indicherà probabilmente la presenza della malattia.

Likelihood ratio (LR) o rapporto di verosimiglianza: il rapporto di verosimiglianza positivo (LR+) indica il rapporto tra probabilità di ottenere un risultato positivo in un animale affetto da patologia e probabilità di ottenere lo stesso risultato in un animale non affetto da patologia. Al contrario, il rapporto di verosimiglianza negativo (LR-) indica il rapporto tra probabilità di ottenere un risultato negativo in un animale affetto da patologia e probabilità di ottenere lo stesso risultato in un animale sano. Il rapporto è considerato buono se è maggiore di 2 per l'LR+ e intorno a 0 per l'LR-. Questi rapporti possono essere applicati per valutare l'effettivo guadagno diagnostico che si ottiene applicando il test: utilizzando un nomogramma si può calcolare la differenza tra probabilità pre-test e post-test di identificare un animale realmente affetto da patologia.

Le analisi su sensibilità, specificità, valore predittivo, etc. hanno l'obiettivo di valutare la capacità del test di contribuire al processo di decisione clinica e quindi di aiutare il medico nell'emettere una diagnosi e a gestire il paziente in base all'andamento della patologia. Una volta stabilito che il test apporta un reale contributo e che quindi può essere efficacemente introdotto nei pannelli d'esame, è necessario stabilire i valori che consentano di discriminare tra animali sani e malati. I valori soglia o cut-off sono dipendenti dallo scopo per il quale viene applicato il test e quindi dovrebbero essere applicati specifici valori strettamente dipendenti dalla situazione clinica. Per tale motivo è preferibile calcolare dei cut-off, nei quali sensibilità e specificità possono facilmente

essere adattate alle esigenze cliniche del momento, piuttosto che applicare intervalli di riferimento generici che identificano esclusivamente i valori attesi in una popolazione sana. I criteri utilizzati per scegliere i cut-off da adottare durante il processo diagnostico sono fondamentali per evitare errori diagnostici e devono essere pianificati esclusivamente in funzione della specifica situazione clinica nella quale si intende adottare il test, quindi facendo prevalere la sensibilità o la specificità a seconda che sia un test diagnostico o di screening.

Curve ROC (Receiver-Operating-Characteristic): queste curve riflettono la relazione tra sensibilità e tasso di risultati falsi positivi di un test e sono utilizzate per valutare l'accuratezza diagnostica di un test. Sensibilità e specificità sono inversamente correlate, quindi all'aumentare di una diminuisce l'altra e viceversa. Mediante le curve ROC è possibile calcolare il valore soglia di un test a cui corrisponde la migliore sensibilità e specificità e quindi visualizzare graficamente il valore da applicare per discriminare il gruppo di animali sano da quello malato. Il vero punto di forza di queste curve è che, a seconda dello scopo del test, si può calcolare il cut-off che enfatizzi la sensibilità piuttosto che la specificità del test in base all'obiettivo diagnostico prefissato.

Intervalli di riferimento: l'ampiezza degli intervalli di riferimento è determinata dalla combinazione di variabilità analitica e biologica. In veterinaria le informazioni sulla variabilità biologica sono scarse e questo rappresenta un grosso limite. Inoltre, come precedentemente detto, gli intervalli di riferimento identificano i valori attesi in una popolazione sana a scapito della definizione dei valori più discriminanti in ambito clinico. Pertanto in tutti i casi in cui sensibilità e specificità del test consentano di stabilire un cut-off che distingua con efficacia gli animali sani da quelli malati, è preferibile non adottare questi intervalli. Inoltre bisogna considerare che oltre alla mancanza di informazioni fondamentali per il calcolo, spesso la determinazione di questi intervalli è dispendiosa sia in termini di tempo, che economici. Esistono diversi approcci per il calcolo degli intervalli di riferimento: la determinazione *de novo* che viene effettuata molto raramente in medicina veterinaria perché comporta costi elevati per la selezione di un gruppo di animali sani che sia rappresentativo dell'intera popolazione. Un'alternativa che consente di ridurre notevolmente i costi e il numero di animali necessari, è quella di adottare intervalli di riferimento utilizzati in un altro laboratorio, trasferirli nel proprio ed effettuare una validazione per assicurarsi che siano appropriati.

IV FASE - VALUTAZIONE DELL'UTILITÀ CLINICA E DELL'OUTCOME

La fase finale della validazione diagnostica consiste nel dimostrare l'impatto positivo, che deriva dall'utilizzo del nuovo test, nel management dei pazienti. Diversi aspetti possono essere considerati come un fattore positivo, per esempio: informazioni cliniche che prima non era possibile ottenere, informazioni cliniche che con il nuovo metodo si ottengono più velocemente, più economicamente, o usando materiale più facile da reperire o più stabile. Affrontare questa ultima fase della validazione in molti casi richiede prove controllate, randomizzate e in cieco che di rado vengono effettuate in medicina veterinaria a causa dei loro costi elevati.

SCOPO DEL LAVORO

I laboratori di analisi veterinarie, indipendentemente dalle loro finalità ultime (diagnostica clinica, ricerca di base, farmacologica o applicata), pur essendo organizzati e routinariamente gestiti come gli analoghi laboratori che operano su campioni umani, presentano dei limiti che di fatto ne riducono le potenzialità di sviluppo. Uno dei limiti principali è che in tali laboratori vengono processati campioni biologici (sangue, urine, tessuti) provenienti da diverse specie animali, le quali possono presentare peculiarità che limitano l'applicabilità dei metodi analitici tradizionali. Per quanto riguarda la biochimica clinica la specie animale rappresenta un limite non tanto dal punto di vista della reazione implicata (la reazione biochimica per misurare la concentrazione dei diversi analiti è la stessa indipendentemente dall'origine del campione), quanto dal punto di vista delle caratteristiche fisico-chimiche del campione (es: "colore di fondo" del plasma, presenza di determinate sostanze potenzialmente interferenti ecc..). Per quanto riguarda i metodi basati sull'utilizzo di anticorpi specifici per la molecola da ricercare (ELISA, immunoturbidimetria, chemiluminescenza), non sempre gli anticorpi disegnati contro la molecola umana riconoscono quella di altre specie animali. Prima di applicare tali metodiche è quindi opportuno verificare la cross-reattività mediante tecniche specifiche (es: Western blotting) o con prove di validazione. Per quanto riguarda l'ematologia vengono spesso utilizzati i contaglobuli, che contano e riconoscono le cellule sulla base di caratteristiche strutturali che però variano da specie a specie e, dato che tutti gli strumenti in commercio sono tarati sulle cellule dell'uomo, non sempre è possibile, nella pratica, che riconoscano accuratamente cellule animali, soprattutto se patologiche. L'ematologia di base è spesso affiancata da tecniche specialistiche basate sull'utilizzo di anticorpi contro le molecole di superficie delle cellule ma anche in questo caso non sempre le cellule animali espongono gli stessi antigeni di quelle dell'uomo o non sempre gli antigeni sono strutturalmente simili e cross-reattivi con gli anticorpi anti-uomo. In ricerca, poi, vengono spesso utilizzate tecniche di separazione ed analisi delle cellule ematiche o tissutali basate su metodi fisici la cui applicazione negli animali fornisce spesso risultati non soddisfacenti.

La relativa scarsità di reagenti o strumenti specie-specifici limita quindi le potenzialità dei laboratori di ricerca, i cui risultati assumono un valore comparativo meno rilevante per l'uomo, e di diagnostica veterinaria, che non possono contare su approcci diagnostici sovrapponibili a quelli della medicina umana. Per ovviare ai limiti sopra riportati alcuni produttori di strumenti o reagenti hanno sviluppato "linee veterinarie", basate sull'esecuzione di un numero limitato di prove di cross-reattività o sulla creazione di software "veterinari" per l'interpretazione dei dati. I reagenti appositamente creati per le specie animali di interesse veterinario sono invece pochi. Nella gran parte dei casi si tratta di anticorpi contro molecole particolarmente diffuse nella pratica clinica. Mancano, o sono carenti, gli studi di validazione di strumenti in corso di patologiche particolari o di metodi messi a punto per l'uomo e tesi ad evidenziare molecole indagate meno frequentemente (e quindi meno attrattive dal punto di vista commerciale) ma comunque utili e indispensabili per scopi di ricerca.

L'obiettivo generale di questa tesi è quindi quello di indagare, con studi di validazione analitica ed applicabilità clinico-patologica, alcuni metodi e strumenti per i quali non esistano informazioni relative alla trasposizione su

campioni animali dei risultati già ottenuti in medicina umana o in modelli sperimentali.

In particolare, per raggiungere l'obiettivo generale sopra indicato ci si è posti i seguenti obiettivi intermedi:

- Obiettivo 1: Verifica delle performances analitiche di strumenti per ematologia e di tecniche citofluorimetriche in specifiche patologie ematologiche: in particolare da un lato sono stati messi a punto nuovi parametri analitici in grado di identificare cellule leucemiche di cane e piastrine patologiche in una condizione ereditaria recentemente identificata in cani Norfolk terrier.
- Obiettivo 2: verifica delle caratteristiche analitiche e delle performances diagnostiche di metodi tesi a identificare metaboliti infiammatori. In questa parte della tesi particolare attenzione è stata rivolta a:
 - metodi analitici per identificare metaboliti reattivi dell'ossigeno (dROMs) nel cane, con particolare riferimento al loro ruolo in corso di leishmaniosi
 - validazione di un metodo per la determinazione dei perossidi nel gatto ed applicabilità di questo test e della determinazione dell'interferone felino con metodo ELISA in un modello di analisi delle risposte di leucociti ematici incubati con peptidi immunogeni di coronavirus felino
 - Messa a punto e validazione di un metodo analitico per la determinazione dell'enzima paraoxonasi (PON1), proteina di fase acuta negativa. L'eventuale ruolo della PON1 come marker infiammatorio è stato poi valutato preliminarmente nel cane e nel vitello neonato
- Obiettivo 3: indagine su marker di ipertensione. In particolare sono stati validati nel cane un metodo enzimatico per determinare l'omocisteina (Hcy) e un ELISA per la determinazione dell'endotelina-1 (ET-1). L'eventuale ruolo biologico dell'Hcy è poi stato indagato in patologie caratterizzate da ipertensione o da alterazioni del metabolismo della stessa Hcy, tra cui l'insufficienza renale, nella quale è stata verificata anche l'associazione tra ipertensione e concentrazione sierica di ET-1
- Obiettivo 4: sviluppo di metodi per la caratterizzazione quali-quantitativa dell'acido sialico totale (TSA) e dell'enzima sialiltransferasi. Il TSA è stato poi indagato in gatti con coronavirosi per valutare un suo possibile ruolo protettivo nei confronti dell'infezione; la caratterizzazione del tipo di sialilazione di proteine circolanti e cellulari e l'attività sialiltrasferasica in sangue e tessuti sono state verificate in cani con tumori mammari, visto il potenziale ruolo del tipo di sialilazione nel processo di metastatizzazione.
- Obiettivo 5: valutazione delle performances analitiche dei metodi di determinazione della proteinuria, al fine di fornire informazioni pratiche sull'affidabilità della determinazione di tale parametro.

Le problematiche relative agli obiettivi sopra citati, i metodi usati e i risultati ottenuti sono riassunti di seguito.

STUDI SPERIMENTALI

OBIETTIVO 1 – VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES ANALITICHE DI STRUMENTI E METODI IN EMATOLOGIA

Gli strumenti ematologici attualmente disponibili in veterinaria sono basati su tre principi analitici diversi:

- *Contaglobuli ad impedenza*: attualmente i più diffusi in veterinaria, si basano sul seguente principio analitico: il sangue è aspirato da un capillare e convogliato in una cella di lettura dove le cellule passano attraverso un campo elettrico. Durante il passaggio, ogni cellula aumenta la resistenza tra gli elettrodi generando un impulso di durata proporzionale alle sue dimensioni. Lo strumento registra numero e durata degli impulsi calcolando rispettivamente numero e dimensioni delle cellule. Tale procedura viene eseguita in parte su sangue intero diluito con soluzione isotonica dal quale vengono contati eritrociti e piastrine, poi su sangue trattato con emolisanti per contare i leucociti. In base alle dimensioni dei leucociti, alcuni strumenti ad impedenza stimano anche una parziale formula leucocitaria (es: monociti, granulociti e linfociti).
- *Quantitative buffy coat (QBC)*: in cui il sangue è posto in un capillare da ematocrito particolare che contiene un galleggiante che dilata il buffy coat in maniera che sia possibile analizzarlo otticamente e stimare così il numero di rossi, bianchi e piastrine, oltre a parametri addizionali come la concentrazione emoglobinica e gli indici eritrocitari
- *Contaglobuli laser*: molto usati nell'uomo, ma di recente introduzione in veterinaria: il principio di lettura è simile a quello dell'impedenza, con la differenza che le cellule interrompono un fascio luminoso invece che un impulso elettrico. La luce laser, inoltre, attraversando le cellule nucleate, viene deviata in maniera diversa in funzione della complessità nucleare (es: lobature, cromatina, ecc...) o citoplasmatica (es: granulosità) e viene captata da rilevatori posti ad angolature differenti rispetto alla direzione originale del fascio di luce permettendo di classificarle e generare una formula leucocitaria. Alcuni contaglobuli laser sfruttano poi il contenuto enzimatico delle diverse cellule, alcune delle quali (es: i granulociti) contengono mieloperossidasi che a contatto con uno specifico reagente emette un segnale particolare in base al quale queste cellule vengono distinte dalle altre, altri utilizzano un colorante fluorescente che lega gli acidi nucleici: i leucociti vengono quindi classificati, oltre che sulla base di dimensioni e complessità anche in base al contenuto in acidi nucleici. Questi strumenti, poi, possono discriminare i basofili dalle altre popolazioni cellulari, ma il principio su cui si basa questa differenziazione non sembra funzionare per i basofili del cane.

Dalla descrizione sopra citata emerge che i contaglobuli classificano i leucociti in modo diverso ma comunque in base alle loro caratteristiche fisiche o chimiche, che però si basano su dimensioni e caratteristiche strutturali dei leucociti umani normali. Già in medicina umana gli strumenti hanno difficoltà a classificare correttamente i campioni patologici e generano dei segnali di allarme (flags) sulla base dei quali lo striscio di sangue viene inviato all'ematologo per l'analisi microscopica. Sebbene molti strumenti dispongano di software che

riconoscono al meglio le cellule delle diverse specie animali, il margine di errore nella lettura di campioni di sangue di cane e gatto è maggiore di quello rilevato nell'uomo, soprattutto in campioni patologici. Anche se si dispone di tali strumenti, quindi, è indispensabile ricorrere all'analisi microscopica dello striscio di sangue per verificare che la formula strumentale sia in accordo con quanto osservabile al microscopio, e per identificare eventuali anomalie morfologiche leuco-eritrocitarie. Tale procedura richiede tempo ed esperienza e presenta un certo grado di soggettività legata alla competenza dell'operatore. La disponibilità di parametri automatici aggiuntivi potrebbe ridurre tale soggettività e, in ultima analisi, il margine di errore nei casi patologici.

Tra le situazioni che creano più "problemi" agli strumenti automatici e che, in assenza di un ematologo esperto che verifichi le caratteristiche morfologiche cellulari su vetrino, possono portare ad errori di classificazione del campione, rientrano alcune patologie ereditarie in cui la morfologia di alcuni tipi cellulari è alterata, come nel caso delle alterazioni piastriniche dei Norfolk terrier di cui si parlerà più avanti, ma soprattutto le leucemie.

Le leucemie sono neoplasie delle cellule ematopoietiche a localizzazione primaria midollare cui solitamente si associa la presenza di cellule neoplastiche in circolo. Le leucemie vengono classificate in quattro gruppi principali caratterizzati da prognosi diverse. Tali gruppi derivano dall'incrocio di due sistemi di classificazione, basati sul tipo di cellule coinvolte e sulla loro capacità di maturare: in funzione dell'origine le leucemie possono essere divise in linfoidi e mieloidi (ulteriormente classificabili come riportato in tabella 3); in funzione dello stadio di sviluppo delle cellule, le leucemie possono essere divise in acute, caratterizzate da presenza di cellule atipiche, e croniche, nelle quali in circolo si riscontrano alti numeri di cellule morfologicamente normali.

LEUCEMIA		CLASSIFICAZIONE	TIPO DI LEUCEMIA
LEUCEMIA MIELOIDE	ACUTA	AUL	Leucemia acuta indifferenziata
		AML M1	Leucemia mieloide acuta senza maturazione
		AML M2	Leucemia mieloide acuta con maturazione
		AML M3	Leucemia promielocitica acuta
		AML M4	Leucemia mielomonocitica acuta
		AML M5	Leucemia monocitica acuta
		AML M6	Eritroleucemia
		AML M6Er	Mielosi eritremia
	AML M7	Leucemia megacarioblastica acuta	
	CRONICA	CML	Leucemia mieloide cronica
LEUCEMIA LINFOIDE	ACUTA	ALL	Leucemia linfocitica acuta
	CRONICA	CLL	Leucemia linfocitica cronica

Tabella 3 Classificazione delle leucemia in medicina veterinaria secondo il consenso dell'Animal Leukemia Study Group (ALSG) (adattata da: McManus, 2005)

Le leucemie acute sono più aggressive ed hanno un decorso rapido (spesso fulminante, dato che la diagnosi negli animali è sempre più tardiva che nell'uomo), quelle croniche hanno decorso più lento e prognosi migliore. Dal punto di vista diagnostico è spesso difficile riconoscere l'origine leucemica delle forme croniche anche se spesso è il numero di cellule a suggerire che si tratti di leucemia e non di leucocitosi reattiva. Nelle forme acute, oltre che sul riscontro di cellule immature (> 5% nel sangue) la diagnosi si basa sul riscontro di blasti midollari (> 20%) e sulla caratterizzazione delle cellule neoplastiche tramite immunofenotipizzazione,

citochimica o analisi molecolari. La fenotipizzazione viene di solito svolta mediante citofluorimetria, tecnica che si basa sulla tecnologia laser simile a quella degli strumenti per l'esame emocromocitometrico generazione sopra citati. Questa tecnica si basa sulla marcatura con anticorpi specifici per antigeni che vengono espressi a livello citoplasmatico o, più frequentemente, sulla membrana delle cellule. Sono stati selezionati una serie di anticorpi che vengono espressi solo da un tipo cellulare (per esempio: CD3 espresso solo dai linfociti T, CD21 espresso solo dai linfociti B). Gli anticorpi sono coniugati con una sostanza fluorescente che, una volta colpita dal laser, emette una fluorescenza che viene rilevata da appositi sensori. Ogni cellula viene quindi classificata in base all'espressione anticorpale. Il vantaggio consiste nella possibilità di usare contemporaneamente più anticorpi sullo stesso campione grazie alla presenza di più laser che lavorano a diverse lunghezze d'onda. In veterinaria però il pannello anticorpale a disposizione è limitato. Tuttavia il numero di anticorpi disponibili, anche se limitato, permette di immunofenotipizzare la maggior parte delle cellule coinvolte nei disordini linfoproliferativi. In tabella 4 sono riportati i principali antigeni utilizzati per l'identificazione delle cellule e la loro espressione cellulare, più o meno specifica.

MARKER IMMUNOFENOTIPICO	TIPO CELLULARE
CD 3	Linfociti T
CD4	Linfociti T helper
CD8	Linfociti T citotossici
CD11b	Granulociti /Monociti
CD14	Monociti
CD18	Panleucocitario
CD21	Linfociti B
CD34	Blasti
CD45	Panleucocitario
CD61	Megacarioblasti
*CD79a	Linfociti B immaturi/plasmacellule
NSA	Antigene specifico per i neutrofilii

Tabella 4 Pannello anticorpale per l'immunofenotipizzazione delle principali cellule ematopoietiche

Non sempre però gli anticorpi disponibili in medicina umana possono essere applicati anche in medicina veterinaria, a causa di una scarsa reattività crociata. Inoltre la maggior parte degli anticorpi è stata sviluppata per il cane o per gli animali da laboratorio (che vengono usati come modello sperimentale per indagare patologie umane), quindi per alcune specie domestiche può risultare difficile reperire in commercio gli anticorpi necessari per lo studio. Infine, un ulteriore limite è quello che non sempre sono state definite le caratteristiche immunofenotipiche di alcune malattie linfoproliferative del cane.

In questa tesi si è quindi provveduto ad approfondire alcuni degli aspetti sopra citati ed in particolare la capacità di uno strumento ematologico laser di identificare cellule leucemiche nel cane o di caratterizzare le piastrine di Norfolk terriers colpiti da macrotrombocitopenia.

IDENTIFICAZIONE DI CELLULE EMATICHE NEOPLASTICHE UTILIZZANDO IL SYSMEX XT-2000iV: UNO STEP PRELIMINARE NELLA DIAGNOSI DI LEUCEMIA NEL CANE

Come sopra citato, la corretta diagnosi e classificazione delle leucemie del cane non può basarsi sulla sola osservazione al microscopio ottico dello striscio di sangue periferico ma richiede tecniche specifiche come le indagini molecolari o l'immunofenotipizzazione (Avery e Avery, 2004; Keller et al., 2004; Comazzi et al., 2006). La possibilità di individuare le cellule neoplastiche con strumenti automatici potrebbe aiutare ad identificare i pazienti che necessitano un approfondimento diagnostico, e permettere il monitoraggio della chemioterapia. Nell'uomo, questo scopo può essere raggiunto con i contaglobuli laser che sfruttano lo stesso principio analitico della citometria a flusso, identificando in tempo reale le cellule neoplastiche (Tohyama et al., 2003; Tohyama et al., 2005; Kang et al., 2008). Il Sysmex XT-2000iV sfrutta la tecnologia laser combinata con il metodo a fluorescenza e con la normale conta ad impedenza. In pratica il numero totale di leucociti viene contato in un canale dedicato (BASO) dove le cellule vengono lisate mediante un surfattante, in questo modo i nuclei delle cellule passando attraverso il laser deviano la luce verso due differenti scatters che riconoscono complessità e dimensione delle cellule. In medicina umana le uniche cellule resistenti alla lisi sono i basofili che quindi vengono contati in questo canale. Il numero totale di WBC viene letto anche con il sistema a fluorescenza, anche se di default il numero riportato nel referto finale è quello del canale dei BASO. La conta leucocitaria differenziale invece viene eseguita nel canale DIFF dopo permeabilizzazione e colorazione con una sostanza fluorescente che si lega agli acidi nucleici e agli organelli citoplasmatici. Il sistema laser viene quindi utilizzato dal DIFF per differenziare le quattro popolazioni rimanenti (neutrofilii, linfociti, eosinofili e monociti) in base alla complessità e al contenuto di RNA (Van der Meer et al., 2002a; Lilliehöök e Tvedten, 2009a). Lo strumento ha dei gates specie specifici pre-impostati corrispondenti a complessità e fluorescenza attesi per ogni popolazione leucocitaria, grazie ai quali differenzia le cellule una volta che sono state lette mediante il laser. L'operatore però può definire manualmente dei gates aggiuntivi per differenziare i vari tipi di cellule o per rilevare cellule con anomalie morfologiche (Mathers et al., 2008). Il Sysmex XT-2000iV è stato recentemente validato nel cane ed è stato dimostrato che effettua un'accurata conta leucocitaria differenziale, ad eccezione dei basofili e dei neutrofilii tossici, che non vengono correttamente identificati (Lilliehöök e Tvedten, 2009b). Lo studio citato, però, non includeva casi di leucemia e in letteratura non sono riportati studi riguardanti la capacità di questo strumento di identificare le cellule neoplastiche nel sangue di cane.

Di seguito è descritto nel dettaglio l'approccio sperimentale seguito ed i principali risultati e considerazioni scaturite, che sono già stati tradotti in un lavoro preliminare presentato come comunicazione orale al IX meeting annuale dell'European Society of Veterinary Clinical Pathology tenutosi a Budapest nel 2007 (n° 10 dell'elenco pubblicazioni) e, in versione più estesa, è stato oggetto di una pubblicazione a stampa (n° 5 dell'elenco pubblicazioni). Una parte dello studio, comprendente anche l'analisi di campioni da pazienti in chemioterapia, è stata presentata al Sysmex European Haematology Symposium tenutosi a Istanbul nel 2009

(N. 12 dell'elenco pubblicazioni) e premiata con il secondo premio del Sysmex Outstanding Science Award 2009

Materiali e Metodi

CRITERI DI INCLUSIONE E SELEZIONE DEI CASI

Per questo studio sono stati utilizzati campioni di sangue prelevato da 167 cani da parte di veterinari liberi professionisti e speditoci per scopi diagnostici, 160 dei quali utilizzati per la valutazione delle performances diagnostiche dello strumento e 7 campionati ripetutamente per la valutazione del follow up. Tutti i campioni sono stati analizzati entro 24 ore dal prelievo e solo i campioni con conservazione, cellularità e caratteristiche morfologiche adeguate sono stati inclusi nello studio. Ulteriori criteri di inclusione sono stati la possibilità di seguire l'animale nel suo decorso clinico, e di acquisire campioni aggiuntivi (es: citologia e/o sospensione cellulare dai linfonodi e strisci o prelievi in EDTA di sangue midollare), nei casi in cui per la diagnosi finale fosse necessario un approccio più completo rispetto al semplice esame emocromocitometrico.

Per classificare i campioni in gruppi differenti è stato infatti applicato, valutando i segni clinici e i risultati dei test di laboratorio, il seguente approccio diagnostico:

Ematologia di base: ogni campione di sangue è stato analizzato con il Sysmex XT-2000iV e sono poi stati allestiti strisci di sangue, colorati con May-Grünwald Giemsa ed osservati da due patologi clinici al microscopio ottico per eseguire la conta leucocitaria differenziale su almeno 200 cellule.

Citologia del midollo osseo: in caso di sospetta leucemia sono stati allestiti strisci di sangue midollare colorati sempre con May-Grünwald Giemsa ed osservati al microscopio ottico da due osservatori differenti ed è stata registrata la percentuale di blasti e la loro morfologia.

Immunofenotipizzazione: l'analisi mediante citometria a flusso è stata eseguita nel sangue periferico e midollare in ogni caso (n=96) in cui c'era il sospetto di leucemia sulla base dell'aumento del numero totale di WBC, della presenza di cellule circolanti immature o atipiche o del rilevamento di cellule neoplastiche durante l'esame citologico di linfonodi e/o milza. Il pannello di anticorpi usato è quello riportato precedentemente in tabella 4.

Analisi dei linfonodi: nei cani con linfadenomegalia è stata eseguita l'aspirazione con ago sottile. Le cellule raccolte sono state processate utilizzando secondo il metodo in uso nel nostro laboratorio (Gelain et al., 2008) che unisce esame citologico (Fournel-Fleury et al., 1997) e immunofenotipizzazione (Wilkerson et al., 2005).

ANALISI CON SYSMEX XT-2000iV

L'analisi dei dati generati dallo strumento è stata basata sui seguenti parametri:

Conta leucocitaria totale: sulla base del numero di cellule contate nel canale BASO.

Segnali di allarme standard per i WBC (segnali di allarme "positivi" e/o "aree grigie"): se nel campione lo strumento rileva anomalie di numero o di morfologia cellulare, genera un segnale di errore riportando la

dicitura "positivo" (figura 1). Inoltre se le popolazioni leucocitarie non possono essere differenziate, le cellule vengono visualizzate come un'omogenea area grigia e la conta differenziale non viene visualizzata.

Sono stati registrati tutti i campioni per i quali lo strumento ha generato un segnale di allarme positivo o non è riuscito ad effettuare una conta differenziale.

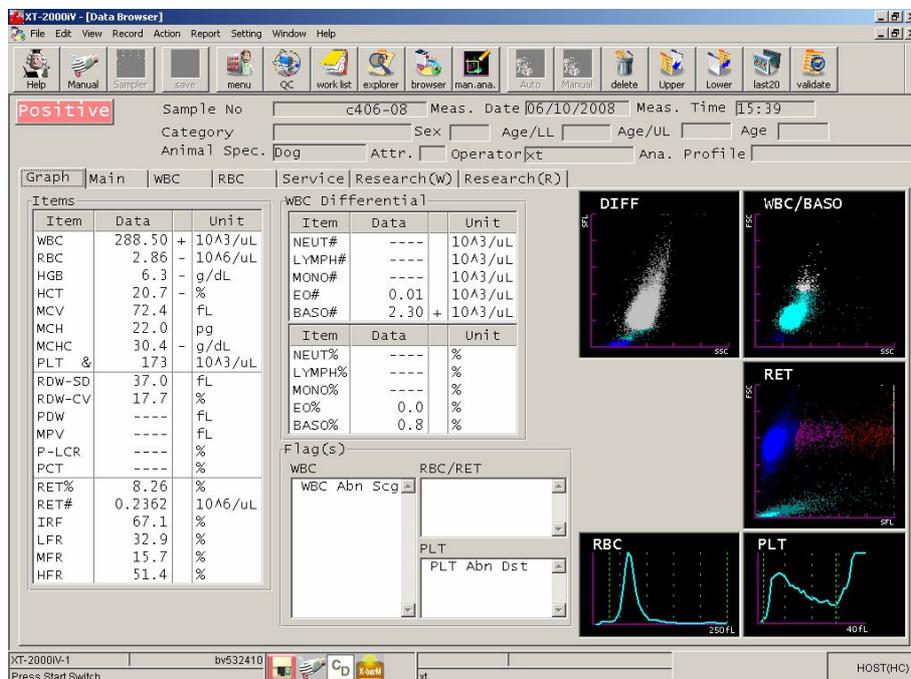


Figura 1 Esempio di un campione proveniente da un cane con una condizione reattiva non neoplastica (marcata neutrofilia) caratterizzata da un segnale di allarme leucocitario. Da notare il numero di WBC notevolmente aumentato e come lo strumento non sia in grado di classificare tutte le sottopopolazioni leucocitarie. Il campione è stato classificato come "positivo" (angolo in alto a sinistra) e viene mostrato un segnale di allarme leucocitario. Inoltre la nuvola di neutrofili (eventi grigi) è parzialmente sovrapposta al gate dei linfociti e la maggior parte dello scattergram dei DIFF mostra un'area omogenea grigia invece della tipica popolazione.

Eventi ad alta intensità di fluorescenza (HFI): visto l'obiettivo di valutare la possibile presenza di cellule neoplastiche, è stato disegnato manualmente, all'interno dello scattergram nominato Extend-WBC/DIFF, un gate ad alta fluorescenza (Tohyama et al., 2005) che si estendeva da appena sopra il normale profilo del cane fino alla parte più alta dello scattergram (figura 2).

Tutti i campioni inclusi in questo studio sono stati rianalizzati usando il profilo ad alta fluorescenza ed è stata registrata la percentuale di eventi ad alta fluorescenza.

Eventi nella regione "resistente alla lisi": all'interno dello scattergram nominato Extend-WBC/BASO è stato disegnato manualmente un gate nominato LRR (Lysis-Resistant Region) che si estende da appena sopra la regione con i leucociti dopo lisi con il surfattante, fino alla parte più alta dello scattergram (figura 2).

Forma degli scattergrams: la forma di entrambi gli scattergrams WBC-BASO e WBC-DIFF sono stati analizzati visivamente da due osservatori indipendenti che hanno raggruppato ciascun caso, come definito nello studio preliminare presentato al congresso di Budapest, in una delle seguenti categorie (figura 3): scattergram normale (N), leucemia acuta/linfoma al V stadio (AL), leucemia linfocitica cronica (CLL) o leucocitosi reattiva.

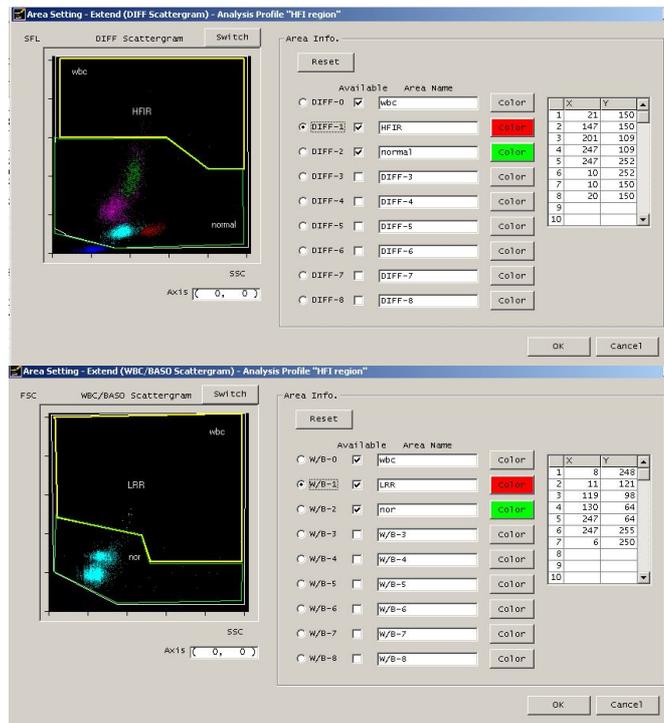


Figura 2 Definizione del gate ad alta intensità di fluorescenza (HFI) (in alto) nello scattergram dei WBC/DIFF e del gate della regione resistente alla lisi (LRR) (in basso) nello scattergram dei WBC/BASO. In entrambi gli scattergrams le linee più esterne includono tutti gli eventi all'interno del gate leucocitario, la linea verde comprende le cellule normali e la linea gialle definisce le aree HFI e LRR.

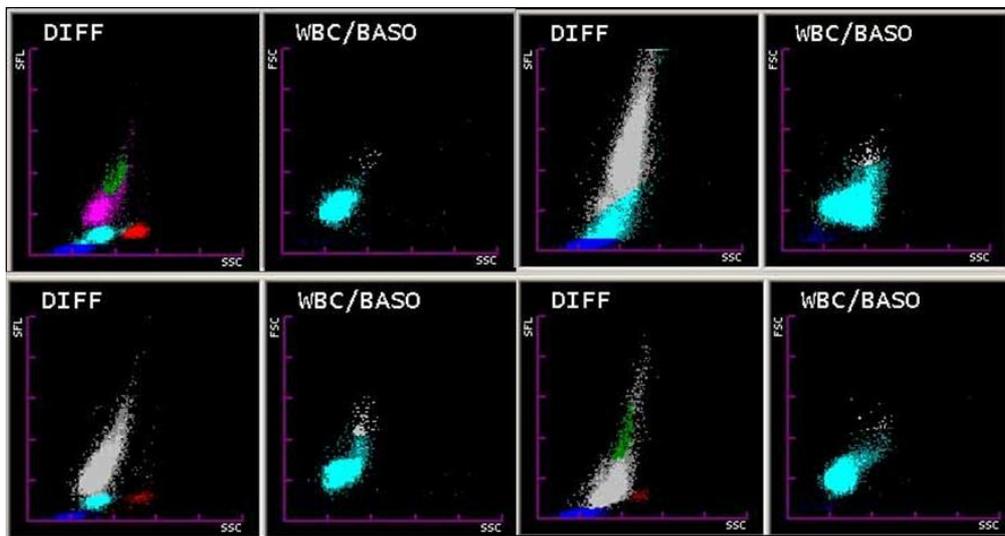


Figura 3 Esempi di profili di scattergrams. In alto a sinistra gli scattergrams del Sysmex di un cane sano. Lo scattergram del canale DIFF mostra i neutrofili (azzurro), linfociti (rosa), eosinofili (rossi) e monociti (verde); lo scattergram dei BASO mostra i basofili (punti bianchi sparsi) e "altri WBC" (azzurro). In alto a destra gli scattergrams di un cane affetto da leucemia acuta (AL)/linfoma al V stadio. Il canale DIFF rivela una popolazione omogenea che si estende fino alla regione ad alta intensità di fluorescenza. Nello scattergram dei BASO una sottopopolazione leucocitaria con un'elevata complessità, ma solo pochi eventi si estendono nella regione delle cellule resistenti alla lisi. In basso a sinistra gli scattergrams di un cane affetto da leucemia linfocitica cronica (CLL) Nello scattergram dei DIFF il gate dei linfociti è aumentato ma caratterizzato da pochi eventi ad alta fluorescenza in confronto allo scattergram della leucemia acuta. La maggior parte dei leucociti nello scattergram dei BASO è raggruppato all'interno di una singola e ben definita popolazione, ma una piccola percentuale di cellule è caratterizzata da un aumento del volume che porta alla formazione di una proiezione verso la LRR. In basso a destra sono riportati gli scattergrams di un caso di leucocitosi reattiva (RL) in un cane. Nello scattergram dei DIFF il livello di fluorescenza del gate dei neutrofili è più alto del normale ed è presente una parziale sovrapposizione tra il cluster dei neutrofili e quello dei linfociti (punti grigi nella parte bassa dello scattergram). Inoltre alcuni eventi si estendono nella regione ad HFI. Lo scattergram dei BASO non mostra caratteristiche anomale.

ANALISI STATISTICA E VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES DIAGNOSTICHE

Per ogni gruppo di cani patologici (vedi oltre) e per ogni sottogruppo di cani con la leucemia acuta, è stata definita, con statistiche descrittive la distribuzione dei valori dei parametri forniti dal Sysmex. Le differenze tra gruppi sono state valutate usando il test di Kruskal-Wallis seguito dal test di Bonferroni eccetto che per la presenza o assenza degli allarmi per la conta leucocitaria che, essendo espressi con una scala ordinaria e non continua, sono stati valutati mediante analisi di Pearson. Nel tentativo di definire l'approccio migliore per differenziare i campioni leucemici (includendo sia le leucemie acute che croniche) da quelli reattivi, minimizzando il numero di risultati FP e FN, sono stati seguiti i seguenti approcci:

1. *Valutazione delle performances diagnostiche di singole misurazioni o singoli parametri*: per ciascuna misurazione o per ciascuno dei parametri sotto elencati, sono state valutate le performance diagnostiche contando il numero di VP (cani leucemici classificati come positivi), VN (cani non leucemici classificati come negativi), FP (cani non leucemici classificati come positivi) ed FN (cani leucemici classificati come negativi). In questa fase sono stati classificati come positivi (cioè potenzialmente caratterizzati da cellule neoplastiche) i campioni che presentavano:

- A. segnali di allarme positivi per la conta leucocitaria totale o l'area grigia senza differenziazione;
- B. valori più alti di un dato valore soglia, definito mediante curve ROC, per i parametri espressi in scala continua (per esempio: WBC, HFI, LRR).
- C. forma degli scattergrams che coincideva con i profili delle leucemie acute o linfocitiche croniche.

Sulla base di questi dati è stata calcolata la sensibilità e la specificità, il rapporto di verosimiglianza positivo e negativo e per ogni dato espresso con una scala di valori continua è stata disegnata una curva ROC per valutare il potere discriminante di ciascun parametro nella diagnosi di leucemia.

2. *"Segnale di allarme leucemia"*: lo strumento è stato impostato per generare automaticamente un segnale di allarme di leucemia quando rilevava almeno una delle seguenti alterazioni: conta leucocitaria $> 37.0 \times 10^3/\mu\text{L}$, HFI $> 2.30\%$ o LRR $> 1.10\%$. Questi valori di cut-off corrispondono a quelli caratterizzati dal 95% di specificità, come evidenziato dall'analisi precedente. Successivamente sono state valutate le performance diagnostiche del segnale di allarme di leucemia calcolando il numero di VP, VN, FP e FN seguiti dal calcolo di sensibilità, specificità e rapporti di verosimiglianza. Come step aggiuntivo per aumentare l'utilità diagnostica di questo approccio i positivi al segnale d'allarme di leucemia sono stati riclassificati in base alla presenza o assenza di profili compatibili con leucemia (acuta o cronica) e sono stati ripetuti i calcoli delle performances diagnostiche.

Risultati

Sulla base dell'approccio diagnostico, 117 cani sono stati raggruppati come riportato in tabella 5. Il gruppo di controllo era costituito da animali sani (n=43).

GRUPPO		TIPO	SOTTOTIPO	MORFOLOGIA	IMMUNOFENOTIPO
Leucemia (n=45)	A. Leucemia acuta (n=30)	M;ieloide (AML)	AML M4 (n=2)	BM: blasti > 30%	CD45+, CD11b+, CD4+, CD14+, CD34+
			AML M7 (n=2)	BM: blasti > 30%	CD45+, CD61+, vWF+
		Linfoide (ALL)	ALL-B (n=3)	BM: blasti > 30%	CD45+, CD21+, CD79a+, CD34+
			ALL-T	BM: blasti > 30%	CD45+, CD3+, CD4+ e/o CD8+, CD34+
		Indifferenziata	AUL	BM: blasti > 30%	CD45+, CD34+
	Linfoma stadio V (n=14)		Citologia linfonodale compatibile con linfoma; BM: blasti > 30%	Immunofenotipo uguale nella sospensione cellulare ottenuta mediante ago aspirato del linfonodo	
	B. Leucemia cronica (n=15)	Linfocitica (CLL) (n=14)		Grave linfocitosi, popolazione monomorfa di linfociti maturi	CD45+, CD4+ o CD8+
		LGL (n=1)		Popolazione monomorfa di LGL	CD45+, CD3+, CD8+
C. Neoplasia senza coinvolgimento ematico (n=41)		Linfoma (n=35)		Citologia linfonodale compatibile con linfoma	Linfonodo positivo per gli antigeni B o T
		Tumore mastocitario (n=5)		Valutazione citologica della massa cutanea e/o splenica	Non determinante
		Sarcoma istiocitico (HS) (n=1)		Valutazione citologica della milza compatibile con HS	Non determinante
D. Condizioni reattive non neoplastiche		Neutrofilia (n=24)		Leucocitosi, neutrofilia, neutrofilii tossici	Non determinante
		Neutrofilia e linfocitosi (n=6)		Leucocitosi, neutrofilia, linfocitosi, neutrofilii tossici, linfociti e monociti reattivi	Non determinante
		Linfocitosi (n=1)		Leucocitosi, linfocitosi, linfocitosi reattivi	Non determinante

Tabella 5 Gruppi di cani e criteri adottati per l'approccio diagnostico (AML4: leucemia mielomonocitica acuta; AML7: leucemia megacarioblastica acuta; vWF: von Willebrand factor; CLL: leucemia linfocitica cronica; BM: midollo osseo

Il numero di leucociti totali era significativamente più elevato nei cani con leucemia linfocitica cronica rispetto a tutti gli altri gruppi e nel gruppo di cani con leucemia acuta era più alto rispetto a quello dei gruppi C, D ed E. Il numero di leucociti totali nei cani con neoplasie senza coinvolgimento ematico e con condizioni reattive non neoplastiche era più elevato del gruppo di controllo (tabella 6).

La percentuale di eventi con HFI era significativamente più elevata nel gruppo di cani con leucemia acuta rispetto agli altri gruppi. La percentuale di eventi nella LRR era significativamente più alta in entrambi i gruppi leucemici in confronto ai rimanenti. Non sono state rilevate differenze significative nel numero totale di leucociti, o nelle percentuali di eventi con HRI o nella LRR tra i tre sottogruppi della leucemia acuta (tabella 7).

GRUPPI	WBC X 10 ³ /μL	EVENTI HFI (%)	EVENTI LLR (%)	SEGNALI DI ALLARME LEUCOCITARI
A – Leucemia acuta (n=30)	91.1 ± 195.8 (32.7) *, **, †, ‡	7.9 ± 7.1 (6.1) *, **, †, ‡	2.2 ± 2.2 (1.6) **, †, ‡	21 (70%) **, †, ‡
B – Leucemia cronica (n=15)	169.1 ± 112.8 (138.6) **, †, ‡	0.7 ± 1.9 (0.2)	0.9 ± 1.1 (0.5) **, †, ‡	11 (73.3%) **, †, ‡
C – Neoplasie enza coinvolgimento ematico (n=41)	11.5 ± 5.7 ‡ (11.2)	1.0 ± 1.8 (0.3)	0.4 ± 0.5 (0.2)	4 (9.8%)
D – Condizioni reattive non neoplastiche (n=31)	30.1 ± 35.6 ‡ (19.5)	0.5 ± 0.9 (0.4)	0.4 ± 0.7 (0.2)	11 ‡ (35.5%)
E – Cani sani (n=43)	9.2 ± 3.2 (9.1)	0.2 ± 0.2 (0.2)	0.2 ± 0.1 (0.2)	1 (2.3%)

Tabella 6 Valori medi ± SD (mediana) registrati per ogni gruppo. HFI: eventi ad alta intensità di fluorescenza; LLR: eventi nella regione resistente alla lisi. * P<0.05 vs gruppo B; ** P<0.05 vs gruppo C; † P<0.05 vs gruppo D; ‡ P<0.05 vs. gruppo E

GRUPPO	WBC X 10 ³ /μL	EVENTI HFI (%)	EVENTI LLR (%)	SEGNALI DI ALLARME LEUCOCITARI
AML (N=4)	38.0 ± 35.0 (32.7)	15.4 ± 11.3 (16.0)	1.4 ± 1.1 (1.4)	3 (75%)
ALL (N=12)	168.2 ± 295.3 (81.2)	6.3 ± 5.1 (5.5)	2.6 ± 1.8 (1.1)	10 (83.3%)
Stage 5 (N=14)	40.2 ± 48.3 (20.5)	7.2 ± 6.4 (5.2)	2.1 ± 2.8 (1.1)	8 (57.1%)

Tabella 7 Valori medi SD (mediana) registrati per i tipi di leucemia acuta. HFI: eventi ad alta intensità di fluorescenza; LLR: eventi nella regione resistente alla lisi; AML: leucemia mieloide acuta; ALL: leucemia linfoide acuta

Tuttavia in tutti i gruppi si è rilevata un'alta variabilità individuale per ogni parametro o misurazione effettuata e i dati provenienti da differenti gruppi spesso sono sovrapponibili. I segnali di allarme sono stati emessi raramente nei campioni provenienti da animali sani o con neoplasie senza coinvolgimento ematico, mentre erano frequenti in cani con condizioni reattive e leucemie. In questi ultimi gruppi, la percentuale di campioni con segnali di allarme era significativamente più alta che negli animali sani e la percentuale registrata per entrambi i gruppi leucemici era più alta rispetto ai gruppi C e D (tabella 6).

Per quanto riguarda la forma degli scattergrams (tabella 8), in 144 casi l'interpretazione era inequivocabile, mentre in 16 casi gli scattergrams erano compatibili con almeno due differenti categorie (condizioni reattive vs leucemia in 7 casi, normale vs condizioni reattive in 4 casi, normale vs leucemia in 3 casi e leucemia acuta vs cronica in 2 casi). Questi casi sono stati classificati dopo rivalutazione collegiale da parte dei due osservatori.

Tutti i cani affetti da leucemia mostravano un forma dello scattergram classificabile come leucemia. Gli scattergrams compatibili con forme leucemiche sono stati riscontrati in 51 casi, 45 dei quali (88.2%) appartenenti al gruppo A o B. Un cane con leucemia linfocitica cronica presentava un profilo compatibile con leucemia acuta, mentre quattro cani con leucemia acuta presentavano un profilo compatibile con linfocitica cronica. Il profilo compatibile con leucemia acuta è stato rilevato anche in cinque cani nel gruppo C e in uno del gruppo D (gli altri cani di questo gruppo avevano profili normali o reattivi). Il profilo compatibile con

leucemia cronica non è stato mai riscontrato in campioni provenienti da sette cani con linfocitosi reattiva inclusi nel gruppo D e gli scattergrams associati a queste due condizioni erano sempre differenti l'uno dall'altro.

GRUPPO	PROFILO			
	AL	CLL	N	RL
A - Leucemia acuta (N=30)	26*	4†	0	0
B - Leucemia cronica (N=15)	1	14	0	0
C - Neoplasie senza coinvolgimento sistemico (N=41)	5	0	26	10
D - Condizioni reattive non neoplastiche	1	0	13	17
E - Cani sani	0	0	41	2
Totale	33	18	81	31

Tabella 8 Distribuzione dei profili degli scattergrams nei 5 gruppi di cani. * 4 leucemie mieloidi acute, 10 leucemie linfoidi acute (ALL), 12 Linfomi al V stadio; † 2 ALL, 2 linfomi al V stadio. AL: leucemia acuta; CLL: leucemia linfocitica cronica; N: normale; RL: leucocitosi reattiva

Il profilo leucemico non è mai stato riscontrato nei cani di controllo che nella maggior parte dei casi (95.3%) presentavano uno scattergram normale.

UTILITA' DELLE ANALISI DEL SYSMEX NEL RILEVAMENTO DEI CASI DI LEUCEMIA

Le curve ROC disegnate per la conta leucocitaria (area under the curve AUC: 0.85; 95% CI: 0.77-0.93), per gli eventi con HFI (AUC: 0.74; 95% CI: 0.64-0.84) e gli eventi nella LRR (AUC: 0.89; 95% CI: 0.84-0.95) (figura 4) sono risultate statisticamente significative ($p > 0.001$ in tutti i casi).

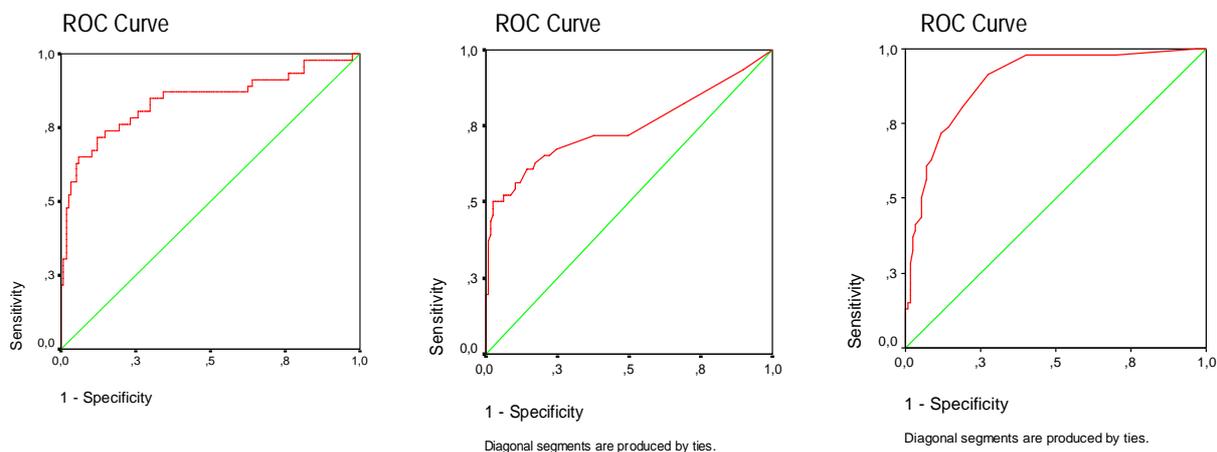


Figura 4 Curve ROC ottenute valutando il numero di leucociti totali (a sinistra), la percentuale di eventi HFI (al centro) e la percentuale di eventi LRR (a destra).

Le performance diagnostiche sia delle singole misurazioni e parametri, sia degli allarmi leucemici sono riportati in tabella 9.

Le performance diagnostiche ai valori di cut-off caratterizzati dal migliore rapporto tra sensibilità e specificità hanno portato ad avere risultati sia FN che FP. La specificità e la sensibilità erano moderate per la presenza o

assenza di allarmi, ma aumentavano per la presenza o assenza di scattergrams con profili leucemici. La presenza/assenza del segnale di allarme leucemia, che combina misurazioni e parametri multipli è risultata caratterizzata dall'assenza di risultati falsamente negativi e da un numero limitato di risultati falsi positivi. Il numero di falsi positivi si riduce ulteriormente quando a questo approccio segue un'analisi visiva dei profili degli scattergrams.

	CUTOFF	SENS (%)	SPEC (%)	LR+	LR-	FP	FN
WBC x 10 ³ /μL	16.94	77.8	77.4	3.44	0.29	26	10
Eventi HFI (%)	0.5	66.7	74.8	2.69	0.45	29	15
Eventi LRR (%)	0.5	80.0	80.9	4.18	0.25	22	9
Segnali di allarme leucocitari	Si/No	71.1	86.1	5.11	0.34	16	13
Profilo dello scattergram	AL o CL	100.0	94.8	19.17	0.00	6	0
Segnali di allarme leucemia	Si/No	100.0	87.0	7.67	0.00	15 (8N, 7R)	0
Segnale di allarme leukemia + profilo dello scattergram		100.0	95.6	22.72	0.00	5 (4N, 1R)	0

Tabella 9 Performances diagnostiche di singole misurazioni e singoli parametri del Sysmex e della valutazione simultanea di più misurazioni e parametri. HFI: eventi ad alta intensità di fluorescenza; LRR: eventi nella regione resistente alla lisi; Sens: sensibilità; Spec: specificità; LR+: rapporto di verosimiglianza positivo; LR-: rapporto di verosimiglianza negativo; FP: falsi positivi; FN: falsi negativi, R: condizioni reattive non neoplastiche; N: neoplasia senza coinvolgimento sistemico

UTILITA' DELLE ANALISI DEL SYSMEX NEL MONITORAGGIO DEL FOLLOW UP

I 7 cani esaminati durante il follow up erano affetti da leucemie acute (4 casi) o linfomi non leucemici (3 casi).

I risultati (tabella 10) mostrano che tutti i 3 cani non leucemici sono stati correttamente classificati come non leucemici dall'approccio combinato, che non ha mai riportato il segnale di allarme di leucemia sopra descritto.

CANE N°	SEQUENZA	N° WBC	FLAG WBC	PROFILO	HFI (%)	LRR (%)	FLAG DI LEUCEMIA	DIAGNOSI
1	1°	26,7	+	RL	0.1	0.3	-	Linfoma B non leucemico
	2°	8,7	-	N	0.4	0.9	-	Linfoma B non leucemico
2	1°	7,9	-	N	0.5	1.2	+	Linfoma V stadio CD4+32,5% (27%)
	2°	17,3	-	RL	0.3	1	+	CD4+ 9,3% (2,6%)
	3°	5,9	-	N	0.2	0.6	-	CD4+ 4,43% (3,5%)
3	1°	6,6	-	N	0.3	0.1	-	Linfoma B non leucemico
	2°	4,3	-	N	0.2	0.4	-	Linfoma B non leucemico
	3°	7,9	-	N	0	0	-	Linfoma B non leucemico
4	1°	10,1	-	N/CLL	0.2	0.2	-	CLL-LGL CD8+85,23% (52.0%)
	2°	22,2	-	N/CLL	0	0.1	-	CLL-LGL CD8+47,16 (35%)
5	1°	8,5	-	AL	5.2	0.8	+	Linfoma B non leucemico
	2°	9,5	-	N	0.1	0	-	Linfoma B non leucemico
6	1°	26,5	+	AL	7.7	1.7	+	ALL-B-cell 51% (49%)
	2°	5,9	-	N	0	0	-	ALL-B-cell 13,1% (2%)
	3°	6,3	-	N	0.2	0.1	-	ALL-B-cell 19,5% (6%)
7	1°	4,5	-	AL	2.5	21	+	ALL-B 29,68 CD79+ (21%)
	2°	3,6	-	N/AL	1.5	10.5	+	ALL-B 17,60% CD79+CD34+ (12%)

Tabella 10 Valori registrati durante il follow up in sette cani. RL: leucocitosi reattiva; N: normale; CLL: leucemia linfocitica cronica; AL: leucemia acuta; ALL: leucemia linfocitica acuta; HFI: eventi ad alta intensità di fluorescenza; LRR: regione resistente alla lisi.

I casi non leucemici sono rimasti tali durante il follow up e sono stati sempre classificati correttamente dal Sysmex. Tre dei quattro casi leucemici sono stati correttamente classificati in sede di prima diagnosi. Il quarto soggetto presentava una forma di CLL peraltro di dubbia classificazione clinica. Solo uno dei casi leucemici, che ha sempre presentato cellule atipiche durante il follow up è stato sempre classificato correttamente dal segnale di allarme di leucemia. Negli altri l'analisi morfologica e citofluorimetrica ha rilevato che il trattamento ha portato alla scomparsa delle cellule atipiche circolanti. A questa "negativizzazione" si è associata una riduzione degli eventi HFI e LRR, anche se ciò è accaduto più tardivamente che non mediante citofluorimetria.

Discussione

L'approccio diagnostico alle leucemie spesso richiede un notevole dispendio di tempo per la valutazione al microscopio dello striscio di sangue da parte di un ematologo qualificato, seguito da citometria a flusso e/o da indagini molecolari. Tale approccio è obbligatorio per arrivare ad una diagnosi definitiva, ma potrebbe essere limitato ai casi in cui la leucemia viene sospettata in base ad anamnesi, segni clinici e risultati preliminari degli esami ematologici. In medicina umana l'utilizzo di strumenti che sfruttano la tecnologia laser per effettuare gli esami emocromocitometrici ha ridotto significativamente il numero di campioni sottoposti alla convenzionale osservazione morfologica o ad analisi ematologiche più specifiche. I campioni vengono inviati ai patologi per la valutazione morfologica e la classificazione solo quando lo strumento produce un messaggio di errore che riguarda la morfologia (Van der Meer et al., 2004). D'altra parte è importante che lo strumento minimizzi il numero di risultati falsi negativi, soprattutto quando cellule neoplastiche sono rilevabili nello striscio in assenza di leucocitosi, dato che questi pazienti potrebbero sfuggire al controllo da parte del patologo, con gravi ripercussioni sulla vita del paziente (Van der Meer et al., 2002b; Van der Meer et al., 2004). Il vantaggio dell'utilizzo del Sysmex XT-2000iV deriva dalla grande flessibilità del software che permette all'operatore di disegnare nuovi gates per identificare e contare cellule normalmente non presenti in circolo. Nel presente studio abbiamo valutato le performances del Sysmex XT-2000iV nell'identificazione di cellule neoplastiche usando una combinazione di parametri e misurazioni standard (conta leucocitaria, segnali di errore) o innovativi, da noi messi a punto (percentuale di eventi ad alta fluorescenza, eventi resistenti alla lisi e profili degli scattergrams). La scelta di questi ultimi parametri è scaturita dalla considerazione che il contenuto di acidi nucleici è aumentato nelle cellule neoplastiche a causa dell'aumentata sintesi di mRNA. Considerando che il Sysmex XT-2000iV determina il contenuto di acidi nucleici usando un colorante fluorescente nel canale DIFF, è probabile che le cellule con un alto contenuto di RNA/DNA vengano collocate nel punto in alto di tale scattergram. Abbiamo quindi disegnato un nuovo gate basato sull'intensità di fluorescenza per valutare se ciò potesse essere d'aiuto nell'identificazione delle cellule neoplastiche. Sebbene anche cellule reattive o attivate abbiano un maggiore contenuto di acidi nucleici per l'aumentata sintesi di mRNA, le cellule neoplastiche dovrebbero avere un contenuto maggiore perché oltre la maggiore quantità di acidi nucleici dipende anche dalla presenza di ploidia (Teske et al., 1993). Inoltre, le cellule neoplastiche sono frequentemente più grandi di quelle non neoplastiche e potrebbero risultare resistenti all'azione litica del surfattante nel canale BASO, come

dimostrato in uno studio precedente su versamenti cavitari che includeva anche campioni neoplastici (Pinto da Cunha et al., 2009). Abbiamo quindi disegnato anche un gate basato sulla resistenza alla lisi nel canale BASO per valutare se fosse in grado di identificare le cellule neoplastiche. Infine abbiamo valutato i profili degli scattergrams perché in una fase preliminare erano stati identificati alcuni profili tipici in corso di leucemia.

L'applicazione di questi nuovi gate e l'interpretazione dei dati numerici, però, ha mostrato che nessun parametro da solo riesce ad identificare correttamente i campioni con cellule circolanti neoplastiche. I valori numerici si sovrappongono tra campioni leucemici e non leucemici, soprattutto quando vengono presi in considerazione i vari tipi di leucemia, in particolare quelle acute, anche se il basso numero di casi per gruppo e la variabilità tra cani leucemici impediscono la comparazione statistica tra i diversi tipi di leucemia. Tuttavia questo è un punto di minor interesse dato che, da un punto di vista pratico, l'aspetto più interessante dell'approccio strumentale dovrebbe essere la rapidità di identificazione dei campioni che necessitano indagini con tecniche più specifiche per classificare il tipo di leucemia. La precisa identificazione del tipo di leucemia dovrebbe quindi essere affrontata in un secondo momento su base morfologica o con indagini aggiuntive.

Focalizzandoci quindi sulla prima fase (identificazione rapida di leucemici vs. non leucemici) abbiamo rilevato che per ogni parametro singolo, a valori di cut-off con uguale sensibilità e specificità è presente un tasso relativamente alto di risultati falsamente negativi. Inoltre gli allarmi leucocitari non identificano le leucemie visto che sono presenti anche in caso di infiammazione. Viceversa l'analisi visiva degli scattergrams rivela profili suggestivi di leucemia in tutti i casi in cui le cellule neoplastiche sono state poi rilevate nella valutazione dello striscio ematico e/o all'analisi citofluorimetrica. Con questo approccio non è stato rilevato nessun risultato falsamente positivo. Tuttavia l'analisi visiva degli scattergrams è soggettiva e dipende dall'operatore e il personale di laboratorio deve essere adeguatamente istruito per interpretare correttamente gli scattergrams. Infatti in questo studio il 10% dei campioni era inizialmente classificato in categorie differenti dai due operatori e la classificazione finale è stata ottenuta dall'analisi consensuale degli scattergrams. Per ridurre questa soggettività, abbiamo ideato un approccio che combina misurazioni e parametri indipendenti dall'operatore. In una prima fase dello studio erano state tentate combinazioni di dati e parametri diversi dal "segnale di allarme di leucemia" che poi è stato incluso nello studio. In particolare, era stato messo a punto un sistema di scoring per cui alla presenza di ogni alterazione corrispondeva un punteggio basato sull'entità dell'alterazione stessa (tabella 11), ed era stato messo a punto un algoritmo basato su dati numerici e visivi per combinare tra loro i diversi parametri e massimizzare la resa diagnostica dell'approccio strumentale (figura 5).

Valutazioni preliminari, non riportate in questa tesi, hanno stabilito però che sia il sistema a punti che l'algoritmo sopra riportato non permettevano di ridurre al minimo i risultati FP. Ci si è allora concentrati sulla resa diagnostica del segnale di allarme leucemia. Con questo approccio i risultati falsamente negativi sono stati completamente evitati e tutti i campioni che avevano cellule neoplastiche in circolo sono stati classificati come leucemici.

PARAMETRO	RISULTATO			
	0	1	2	3
Punteggio	0	1	2	3
Segnale "positivo" o area grigia	No	Si		
WBC x 10 ³ /μl	<17	Da 17 a 35	Da 35 a 50	>50
HFI (%)	<0,5	0.5-1	1-2	>2
LRR (%)	<0,5	0.5-1	1-2	>2

Tabella 11 Sistema di scoring per la trasformazione dei dati strumentali in un punteggio compatibile con leucemia. In base alle curve ROC è stato definito che il cut-off che massimizza la resa diagnostica per leucemia corrisponde a un punteggio superiore a 2.

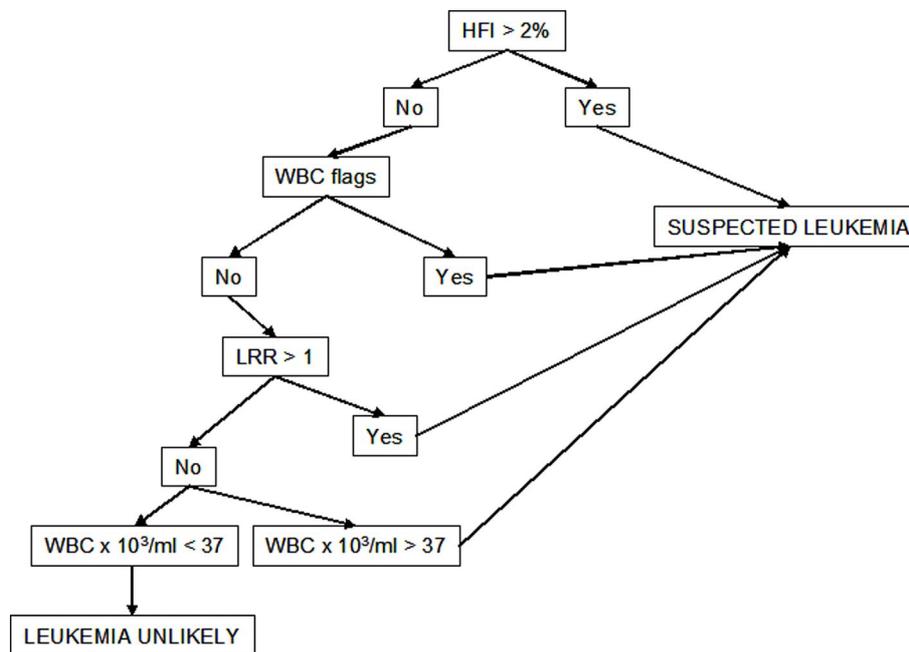


Figura 5 Algoritmo per la classificazione delle leucemie in base ai diversi parametri forniti dallo strumento

Tuttavia qualche campione è risultato falsamente positivo, anche se il numero di FP è risultato sensibilmente inferiore a quello del sistema a punti e dell'algoritmo sopra riportati, principalmente a causa dei campioni con cellule reattive che probabilmente avevano un maggior contenuto di RNA. Ciò nonostante, nella valutazione diagnostica secondo le regole di Bayes (Delgado-Rodriguez et al., 1997), che suggeriscono di valutare i risultati diagnostici alla luce delle probabilità pre-test di malattia, la possibilità di errore diagnostico viene nella pratica minimizzata o annullata del tutto: anamnesi e segni clinici tipici di processi infiammatori abbassano infatti la probabilità pre-test di leucemia così tanto che anche in caso di segnale di allarme da parte dello strumento la probabilità post test di leucemia rimane bassa sia per il clinico che per il patologo.

Il segnale di allarme leucemia è quindi il metodo preferibile per identificare cellule leucemiche nel sangue di cane anche perché è un metodo obiettivo e automatizzato (indipendente dalla soggettività dell'operatore e rapido da ottenere) e ha un'elevata specificità in confronto ai sistemi automatici utilizzati in ematologia umana

(Kang et al., 2008). La specificità può essere ulteriormente aumentata mediante la valutazione soggettiva degli scattergrams dei campioni con il segnale di allarme leucemia, tuttavia data la sua soggettività, questo metodo non può essere utilizzato da solo per classificare i campioni come leucemici, a meno che il personale non sia appropriatamente istruito. Al contrario degli altri studi (Van der Meer et al. 2002a) il profilo degli scattergrams di campioni con leucemia acuta non differenzia leucemie mieloidi e linfoidi dato che la morfologia e il contenuto di acidi nucleici è simile nei blasti di entrambe le linee cellulari. L'analisi morfologica dei casi leucemici classificati erroneamente dallo strumento ha però rilevato che nello striscio ematico erano presenti le stesse anomalie rilevate nel profilo dello scattergram (per esempio: piccoli linfociti in leucemie acute con scattergrams compatibili con leucemia linfocitica cronica o grandi linfociti nelle leucemie croniche con scattergrams compatibili con leucemia acuta). Al contrario, il profilo delle leucemie linfocitiche croniche è sempre utile per distinguere tra leucemie linfocitiche croniche e linfociti reattivi. Bisogna sottolineare però, che le leucemie croniche di tipo non linfoide (come la leucemia granulocitica cronica) non sono state incluse in questo studio.

Il monitoraggio durante il follow up ha confermato l'utilità del segnale di allarme di leucemia nel discriminare campioni leucemici, dato che solo in un caso di sospetta CLL, atipica anche dal punto di vista citofluorimetrico il risultato non è stato consistente con la diagnosi. Negli altri casi sia citofluorimetria che Sysmex hanno prodotto risultati sovrapponibili rappresentati in un cane dalla costante presenza di cellule atipiche e negli altri dalla scomparsa di cellule atipiche dal sangue) anche se con il Sysmex i cani che si negativizzavano risultavano FP per un tempo più lungo rispetto agli approcci più sofisticati. Da un lato questo non rappresenta un problema clinico, dato che la preliminare positività Sysmex può essere smentita dalle analisi successive, e dall'altro può essere evitato in quanto se dopo il rilevamento del segnale di allarme di leucemia si va a valutare la percentuale di eventi HRI e LRR in quanto in questo modo è possibile rilevare la loro diminuzione

Conclusioni

In conclusione l'analisi ematologica con Sysmex XT-2000iV rappresenta un utile test preliminare per il rilevamento delle leucemie nel cane. In particolare può essere stabilito un segnale di allarme leucemia quando la conta leucocitaria e la percentuale di eventi ad HFI nello scattergram WBC/DIFF o di eventi resistenti alla lisi nello scattergram WBC/BASO sono più elevati del cut-off stabilito in questo studio. Questo approccio permette l'identificazione di tutti i casi di leucemia e quindi rappresenta un utile test di screening per la rapida identificazione dei casi che necessitano analisi più approfondite. Similmente ad altri approcci, alcuni campioni senza cellule neoplastiche circolanti con un immunofenotipo alterato possono essere erroneamente classificati come leucemici, portando quindi alla ricerca di possibili cellule neoplastiche. Tuttavia sebbene un risultato falsamente positivo potrebbe indurre l'ematologo a sovrastimare la presenza di cellule neoplastiche durante l'osservazione dello striscio ematico (Van der Meer et al., 2004), la diagnosi definitiva di neoplasia ematopoietica può essere esclusa sulla base dell'anamnesi e dei segni clinici o utilizzando test più specifici

(Avery e Avery, 2004). Quindi risultati falsamente positivi possono portare ad analisi non necessarie, ma questo non influenza negativamente né la diagnosi né la prognosi del paziente. Anche in sede di monitoraggio l'utilizzo del segnale di allarme di leucemia tende a fornire risultati compatibili con quelli ottenuti con analisi più sofisticate anche se per trarre informazioni prognostiche è necessario far seguire alla valutazione del segnale di allarme di leucemia la verifica delle variazioni di percentuale degli eventi HRI e LRR.

L'approccio strumentale proposto in questo lavoro rappresenta quindi uno strumento rapido ed efficace per la valutazione preliminare e per il monitoraggio dei campioni provenienti da cani con sospetto di leucemia.

IDENTIFICAZIONE MEDIANTE CONTAGLOBULI SYSMEX XT-2000iV DELLA FRAZIONE PIASTRINICA AD ALTA FLUORESCENZA IN CORSO DI MACROTROMBOCITOPENIA DEL NORFOLK TERRIER

La macrotrombocitopenia idiopatica è una patologia congenita, asintomatica, ampiamente studiata nella razza Cavalier King Charles Spaniel (CKCS), caratterizzata da trombocitopenia, aumento del volume piastrinico medio (MPV) e da un normale piastrinocrito (PCT) (Bertazzolo et al., 2007; Tvedten et al., 2008). Le cause molecolari di questa patologia sono da attribuire ad una mutazione del gene che codifica per la β -tubulina, che esita in uno squilibrio durante l'assemblamento dei microtubuli con conseguenze durante la formazione delle pro-piastrine e nella produzione di piastrine da parte del megacariocita (Davis et al., 2008). Anche se questo tipo di disordine non influenza l'emivita delle piastrine, le macropiastrine hanno un elevato contenuto di RNA che viene rilevato quando vengono analizzate con strumenti automatizzati che sfruttano un sistema ottico basato su un colorante fluorescente che si lega agli acidi nucleici, come nel caso del Sysmex XT-2000iV. In particolare questo strumento di default effettua sia la conta piastrinica (PLT-I) che la misurazione del piastrinocrito con un sistema ad impedenza. Parametri quali il volume piastrinico medio (MPV), la curva di distribuzione piastrinica (PDW) e la percentuale di piastrine con una grandezza maggiore a 12 fL (P-LCR) vengono calcolate automaticamente a partire dalla conta con questo sistema. Tuttavia contemporaneamente lo strumento effettua anche una conta piastrinica mediante il sistema ottico (PLT-O) (Lilliehöök e Tvedten, 2009a) e la conta piastrinica con il sistema ottico è risultata molto più accurata in tutti i casi in cui c'è un'elevata percentuale di macropiastrine. In caso di aumentata sintesi piastrinica da parte dei megacariociti, piastrine di nuova formazione vengono rilasciate in circolo e queste contengono quantità residue di RNA del megacariocita dal quale sono originate. In medicina umana la percentuale di frazione piastrinica ad alta fluorescenza è stata riconosciuta come un buon marker per identificare l'RNA all'interno delle piastrine, correlato al tasso di rigenerazione piastrinica (Kickler et al., 2006). Un recente studio ha evidenziato la presenza di megatrombocitopenia, similmente a quanto riportato per il CKCS, anche in un gruppo di cani di razza Norfolk terrier, con elevato livello di consanguineità (Gelain et al., 2010).

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare la frazione piastrinica ad alta fluorescenza in cani di razza Norfolk terrier, affetti da macrotrombocitopenia asintomatica e di confrontarla con i cani affetti da trombocitopenia per cause associate ad aumentato consumo e diminuita produzione piastrinica. Di seguito è descritto nel dettaglio l'approccio sperimentale seguito ed i principali risultati e considerazioni scaturitene, che sono stati presentati sotto forma di Poster al XII ESVCP & XX ECVIM-CA Annual Congress tenutosi a Tolosa nel 2010 (n° 18 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e metodi

Nel presente studio sono stati inclusi campioni di sangue prelevati da 10 cani di razza Norfolk terrier (gruppo 1), 37 cani affetti da trombocitopenia da diminuita produzione a causa di una mielosoppressione conseguente a neoplasie ematopoietiche (gruppo 2) ed infine 7 cani affetti da trombocitopenia da aumentata distruzione o consumo (gruppo 3). Come gruppo di controllo sono stati selezionati 86 cani che non presentavano nessuna anomalia all'esame emocromocitometrico. Tutti i campioni sono stati analizzati mediante lo strumento Sysmex XT-2000iV e sono stati analizzati i risultati riguardanti la conta piastrinica eseguita con il sistema ad impedenza (PLT-I), ottico (PLT-O) ed infine il valore delta che rappresenta l'espressione in percentuale del rapporto tra le due letture. Inoltre sfruttando la possibilità, consentita dal software di analisi, di poter disegnare gates manuali per l'identificazione di cellule differenti da quelle preimpostate nello strumento, è stato selezionato un gate nello scattergram della misurazione ottica delle piastrine che includesse le piastrine con un volume normale sulla base dei cani sani e un gate che includesse le piastrine con alta fluorescenza (figura 6).

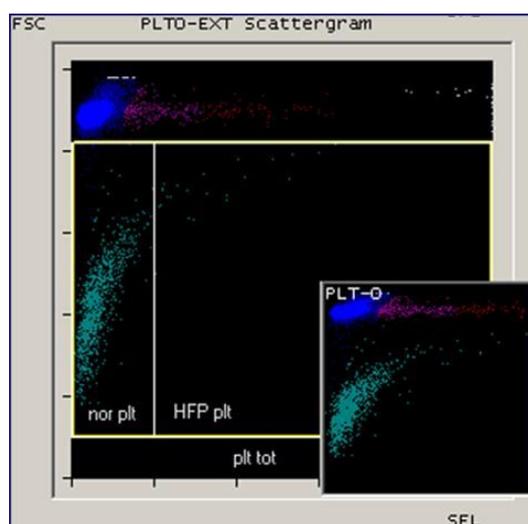


Figura 6 Gates nello scattergram della misurazione ottica delle piastrine di un cane sano. Nor plt: piastrine normali; HFP plt: gate della frazione ad alta fluorescenza delle piastrine

Sono stati registrati i valori corrispondenti alla percentuale (HFPF%) e al numero assoluto (HFPF) della frazione di piastrine ad alta fluorescenza, come descritto da Pankranz et al. (2009).

Risultati

Sulla base dei risultati, riportati in tabella 12, i cani di razza Norfolk terrier (gruppo 1) sono stati suddivisi in due sottogruppi sulla base della conta piastrinica: 3 cani avevano una conta piastrinica equiparabile al gruppo di controllo (gruppo 1a), mentre 7 hanno mostrato valori indicativi di macrotrombocitopenia (gruppo 1b).

	PLT-O Media±SD (mediana)	PLT-I Media±SD (mediana)	DELTA %	HFPF %	HFPL #
Controllo	285±87 (276)	302±94 (285)	94±8 (93)	1.4±0.7 (1.2)	4±2.5 (3.3)
Gruppo 1 tot	144±122 (88)	118±157 (27)	302±246 (242)	21.1±14.4 (28.3)	17.2±11 (16.8)
Gruppo 1a	316±49 (324)	344±36 (355)	91.6±4.8 (91.3)	1.9±0.5 (2.1)	6±1.7 (6)
Gruppo 1b	71±27 (82)	21±13 (16)	392.5±243 (337.5)	29.4±6.8 (30)	22±10.2 (26.2)
Gruppo 2	56±25 (60)	43±26 (36)	162±89 (133)	8.3±5.6 (6.8)	4.4±3.3 (4.5)
Gruppo 3	50±34 (41)	14±11 (10)	482±372 (270)	16±9.3 (17.1)	10.4±10 (3.4)

Tabella 12 Valore medio medio SD (mediana) delle misurazioni nei cani appartenenti ai diversi gruppi.

PLT-O: conta piastrinica ottica; **PLT-I:** conta piastrinica ad impedenza; **DELTA:** rapporto tra PLT-O e PLT-I;
HFPF: frazione delle piastrine ad alta fluorescenza

L'analisi statistica ha mostrato valori di conta piastrinica sia ad impedenza (PLT-I) che ottica (PLT-O) significativamente più bassi ($p < 0.01$) in tutti i gruppi rispetto ai valori dei cani sani di controllo. Viceversa il rapporto tra le due conte (delta) è risultato significativamente più elevato in tutti i gruppi rispetto al controllo. I Norfolk terrier hanno mostrato i valori della frazione piastrinica ad alta fluorescenza espressa sia come valore percentuale che come valore assoluto, significativamente più elevata ($p < 0.01$) rispetto al gruppo di controllo di cani sani. Gli altri gruppi invece hanno mostrato valori significativamente più alti ($p < 0.01$) solo per quanto riguarda il valore espresso in percentuale. Il confronto dei valori dei Norfolk terrier con quelli degli altri gruppi ha evidenziato differenze significative ($p < 0.05$) solo nei confronti del gruppo 2, composto da cani con trombocitopenia causata da diminuita produzione. In particolare, i Norfolk terrier hanno mostrato valori più alti della frazione piastrinica ad alta fluorescenza espressa sia come percentuale che come numero assoluto. Inoltre, la frazione piastrinica ad alta fluorescenza (HFPF % e assoluta) risulta più alta nei Norfolk ($p < 0.05$) con macrotrombocitopenia rispetto al gruppo dei cani con trombocitopenia da aumentata perdita o consumo.

Discussione

Nel cane la macrotrombocitopenia asintomatica congenita meglio conosciuta è quella che colpisce i cani di razza CKCS (Tvedten et al., 2008). In un precedente studio sono già state dimostrate profonde analogie tra la macrotrombocitopenia dei CKCS e la displasia piastrinica dei Norfolk terrier, infatti i soggetti affetti da questa

patologia presentano gli stessi quadri ematologici dei CKCS: piastrinocrito normale se misurato con il QBC e trombocitopenia sia all'osservazione al microscopio ottico dello striscio di sangue, sia con misurazioni strumentali che impiegano la sola tecnologia ad impedenza (Gelain et al., 2010). Con questo studio sono state confermate ulteriori somiglianze tra le due razze: infatti come già precedentemente dimostrato nei CKCS (Tvedten et al., 2008), anche nei Norfolk terrier è possibile osservare una discrepanza tra la conta piastrinica eseguita con strumenti ad impedenza e con sistema ottico a causa della presenza di piastrine giganti con elevato contenuto di RNA. Inoltre, anche se l'emivita delle piastrine non è influenzata da questa alterazione, la frazione piastrinica ad alta fluorescenza è più elevata nei cani di razza Norfolk terrier non solo rispetto al gruppo di controllo composto da cani sani e quello con mielosoppressione, ma anche rispetto ai cani con trombocitopenia da aumentata perdita o consumo, che induce un forte stimolo rigenerativo che quindi a sua volta stimola il rilascio di piastrine giovani con un elevato contenuto di RNA residuo. Rimane quindi da stabilire se anche per i Norfolk terrier la causa è attribuibile ad una mutazione del gene che codifica per la β 1-tubulina, per completare il confronto con la macrotrombocitopenia del CKCS e, da un punto di vista pratico, può essere opportuno valutare il potenziale diagnostico della valutazione delle frazioni ad alta fluorescenza per capire se tale parametro è dotato di sensibilità, specificità e predittività tali da permettere al clinico di evitare diagnosi errate sulla base della semplice interpretazione dell'esame emocromocitometrico.

OBIETTIVO 2 – VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES ANALITICHE E DIAGNOSTICHE DI METODI PER L'IDENTIFICAZIONE DI MARKERS INFIAMMATORI

PATOGENESI DELLA RISPOSTA INFIAMMATORIA ACUTA

Il processo infiammatorio è una reazione difensiva aspecifica e dinamica dell'organismo, a sede vascolare e mesenchimale, in risposta a stimoli lesivi o ad agenti patogeni. Si tratta infatti di una serie di eventi morfologici e funzionali che si sviluppa nel punto in cui agisce la causa lesiva, indipendente dalla natura dell'agente ed il cui fine è l'eliminazione dello stesso. Nella sua prima fase (angioflogosi o processo infiammatorio acuto) prevalgono i processi vascolo-essudativi; a questa fase segue l'istoflogosi o processo infiammatorio cronico nel quale predominano fenomeni cellulari e tissutali che tendono a coinvolgere anche la risposta immunitaria.

L'angioflogosi inizia con una rapida e transitoria vasocostrizione operata dalle catecolamine (adrenalina), cui segue una vasodilatazione bifasica delle arteriole ed un fenomeno di vasopermeabilizzazione: la prima fase, immediata, è legata al rilascio di mediatori preformati (es: istamina, che rilassa gli sfinteri precapillari), mentre la seconda fase, detta "tardiva", cui si associa un duraturo aumento della permeabilità, dipende dalla sintesi e dal rilascio di mediatori neoformati (es: derivati dell'acido arachidonico, ossido nitrico e citochine).

Alla vasodilatazione consegue l'aumento di pressione nei vasi. Ciò determina, insieme alla vasopermeabilizzazione, fuoriuscita dai vasi di liquidi e proteine, con genesi di essudato, le cui caratteristiche dipendono dalla gravità della permeabilizzazione, la quale, a sua volta è dovuta all'alterazione pressoria sopra citata ma anche a fenomeni di retrazione, contrazione, o danno endoteliale causati dagli stessi mediatori chimici, da citochine o da molecole rilasciate dai leucociti o dai patogeni stessi.

La vasodilatazione porta anche a marginazione cellulare: le cellule sono cioè spinte verso le pareti del vaso, il che favorisce il fenomeno della diapedesi, dapprima mediato dall'interazione di selectine vascolari o leucocitarie con recettori sialilati presenti sulla controparte (*rolling*) e poi dall'espressione di integrine sui leucociti con conseguente interazione stabile (aderenza) e migrazione dei leucociti stessi attraverso i pori intercellulari. Una volta nei tessuti i leucociti, soprattutto neutrofili, si attivano grazie a recettori su cui agiscono attivatori esogeni (es: lipopolisaccaridi batterici) o endogeni (componenti del complemento, leucotrieni e citochine chemiotattiche o chemokine) e mediante chemiotassi giungono nel sito di flogosi dove fagocitano i patogeni. L'uccisione e la degradazione dell'agente patogeno possono avvenire mediante meccanismi ossigeno indipendenti dovuti ad enzimi presenti nel fagolisosoma, od ossigeno-dipendenti (burst respiratorio), dovuti all'attivazione della NADPH ossidasi e successiva trasformazione dell'ossigeno in radicali liberi. Tali metaboliti reattivi dell'ossigeno verranno descritti in seguito, essendo oggetto di una parte di questa tesi.

LA REAZIONE DI FASE ACUTA

A questi fenomeni locali si associano fenomeni sistemici che si protrarranno anche durante la fase cronica, finchè lo stimolo infiammatorio persiste. Tale fenomeno, denominato reazione di fase acuta è caratterizzato,

oltre che da alterazioni ematologiche aspecifiche (anemia nelle forme croniche e trombocitosi), neuroendocrine (secrezione di ACTH, cortisolo e catecolamine) e biochimiche (incremento del catabolismo proteico, della gluconeogenesi, della lipogenesi epatica e della lipolisi) anche da fenomeni specifici come la leucocitosi e la variazione della concentrazione ematica di alcune proteine chiamate proteine di fase acuta (APPs), il cui livello nel plasma può aumentare (APP positive) o diminuire (APP negative).

Tali fenomeni dipendono dal rilascio, da parte dei fagociti in sede di flogosi, di citochine pro-infiammatorie quali IL-1, IL-6, tumor necrosis factor- α (TNF- α) nonché dal rilascio di glicocorticoidi. IL-1 e TNF- α sono responsabili della leucocitosi, grazie alla mobilitazione del pool di neutrofilii marginale ed allo stimolo alla produzione di citochine emopoietiche che inducono differenziazione di mieloblasti e monoblasti. IL-1 e IL-6 sono invece responsabili della modulazione della sintesi proteica epatica. Ne deriva la sintesi di APPs positive, tra le quali rientrano proteine che amplificano la risposta flogistica (es: fattori del complemento, fibrinogeno), inibitori delle proteasi (es: α 1-proteasi inibitore, α 1-antichinotripsina), proteine di trasporto (es: ceruloplasmina o Cp, aptoglobina o Hp) o immunomodulatrici (es: α 1-glicoproteina acida o AGP, proteina C reattiva o CRP), proteine che rimuovono metaboliti potenzialmente tossici (es: siero amiloide A o SAA). Alcune di tali proteine aumentano più di 100 volte durante la flogosi e sono quindi ottimi biomarker infiammatori, ma l'entità dell'aumento varia a seconda della specie ed in ogni specie si riconoscono quindi APP maggiori (es: SAA e AGP nel gatto, SAA e CRP nel cane) e minori (es: Cp e Hp nel cane, Hp nel gatto).

Le citochine sopra citate inibiscono anche la sintesi di APP negative, sia per "risparmiare" aminoacidi (es: la diminuita sintesi di albumina diminuisce il consumo di aminoacidi, lasciandone di più a disposizione della sintesi di APPs positive) sia per diminuire alcune proteine di trasporto (es: proteine leganti ormoni o vitamine) di modo che aumenti la quota libera, biologicamente attiva, delle molecole da esse trasportate. Tra le APP negative è stata recentemente inclusa la paraoxonase (PON1), un enzima di origine epatica di cui si parlerà estesamente in seguito, essendo oggetto di parte di questa tesi.

LA CRONICIZZAZIONE DEL PROCESSO INFIAMMATORIO

Con la cronicizzazione del processo i fenomeni vasomotori e l'intervento dei neutrofilii si attenuano, e vengono sostituiti da una maggiore attivazione di monociti/macrofagi e linfociti, nonché da una reazione fibroblastica che tende a circoscrivere la sede di flogosi. Tale cambiamento è dovuto alla diminuita produzione di mediatori chimici dell'angioflogosi ed alla progressiva produzione di citochine in grado di determinare l'attivazione fibroblastica (es: FGF, PDGF) e macrofagica (che inizia con le stesse citochine pro-infiammatorie sopra citate) e la comunicazione tra macrofagi e linfociti (in gran parte dovuta ad interleukine).

LA RISPOSTA IMMUNITARIA

La risposta immunitaria si svolge in 4 fasi successive:

1. *Fase del riconoscimento del patogeno*: la capacità di individuare il "non-self" è affidata ai linfociti B, che riconoscono gli antigeni grazie ad anticorpi esposti sulla loro membrana, si differenziano in plasmacellule che producono anticorpi, e ai linfociti T, responsabili dell'immunità cellulo-mediata, che identificano gli antigeni esposti sulle membrane cellulari legati al complesso maggiore di istocompatibilità (MHC).

2. *Fase della processazione del patogeno*: orchestrata dai macrofagi che fagocitano il materiale estraneo e lo disgregano in peptidi, i quali vengono associati a molecole di MHC di classe II ed esposti sulla superficie

3. *Fase dell'attivazione cellulare*: i linfociti T helper attivati secernono citochine che inducono differenziazione ed attivazione di linfociti B, di linfociti T citotossici e dei fagociti.

4. *Fase della risposta effettrice*: in questa fase avviene l'eliminazione del patogeno, grazie agli anticorpi che legano gli antigeni (potenziando la fagocitosi da parte dei fagociti) ed attivano il complemento, che partecipa alla lisi e alla fagocitosi dei patogeni ed ai linfociti T attivati che producono citochine che partecipano al processo infiammatorio.

Da quanto sopra esposto emerge che i linfociti possono partecipare alla risposta immunitaria attivando una risposta cellulo-mediata o umorale.

La risposta *cellulo-mediata* è affidata ai linfociti T, che direttamente o attivando altri fagociti mediante le citochine, distruggono le cellule che veicolano l'antigene. Questo tipo di risposta è coinvolta nella difesa dai patogeni intracellulari (protozoi, funghi, virus e batteri), verso i quali gli anticorpi sono inefficienti perché non possono penetrare nel citoplasma delle cellule infette, nonché nei fenomeni di rigetto dei trapianti e nella sorveglianza immunitaria verso i tumori. La *risposta umorale* è attuata da anticorpi o immunoglobuline (Ig), di cui esistono 5 classi che differiscono tra loro per la presenza di catene pesanti diverse (IgG, IgM, IgA, IgE e IgD). Le IgG e le IgM (queste ultime sono le prime ad essere prodotte durante la risposta anticorpale) possono fissare il complemento, attivandolo, ed avere attività neutralizzante, agglutinante o precipitante. Le IgA partecipano alle difese mucosali, le IgE ai fenomeni di ipersensibilità di tipo I, e le IgD alla differenziazione linfocitaria, facendo shiftare la produzione di IgM verso quella di altre classi di Ig.

La presenza dell'uno o dell'altro tipo di risposta dipende essenzialmente dall'attività dei linfociti T helper che, a seconda delle citochine che producono possono essere suddivisi in T helper 1 (Th1), che stimolano le cellule citotossiche e attivano i macrofagi e T helper 2 (Th2), che stimolano la proliferazione dei linfociti B e quindi la sintesi delle diverse classi anticorpali. La produzione di citochine Th1, tra le quali particolarmente importante è l'interferone- γ di cui si parlerà estesamente in seguito, o di citochine Th2 può quindi sbilanciare l'equilibrio immunitario rispettivamente verso una risposta cellulo-mediata o umorale.

Dalla descrizione sopra citata si evince che i possibili biomarker di entrambe le risposte sono molto numerosi. Per alcuni di essi (es: leucocitosi, proteine di fase acuta, alcune citochine), sono già stati validati diversi metodi diagnostici e sono già conosciute le potenzialità diagnostiche o in studi patogenetici delle diverse alterazioni rilevabili. Alcuni aspetti e in particolare la determinazione dei radicali ossidanti, dell'IFN- γ nel gatto e la attività della PON1 non sono invece stati particolarmente approfonditi, e sono quindi stati affrontati in questa tesi.

METODI ANALITICI PER LA MISURAZIONE DEI METABOLITI REATTIVI DELL'OSSIGENO (dROMS) NEL CANE E ATTIVITÀ DEI D-ROMS IN CORSO DI LEISHMANIOSI

Come precedentemente accennato, durante la fagocitosi, neutrofilo e macrofagi possono utilizzare ossigeno generando radicali liberi, nel fenomeno noto come "oxydative burst" o "respiratory burst". I radicali liberi sono molecole instabili che hanno un singolo elettrone non accoppiato in un'orbita esterna. L'energia generata da questa configurazione è instabile e viene trasferita alle molecole adiacenti, che a loro volta perdono stabilità e funzione, innescando così una reazione a catena autoamplificante. I radicali liberi, infatti, per ritrovare la loro stabilità, devono ossidare altre molecole, cioè "rubare" loro un elettrone, danneggiandole in modo definitivo.

I principali radicali liberi dell'ossigeno (ROS) sono l'anione superossido (O_2^-), prodotto in maggiore quantità in sede intracellulare, il perossido di idrogeno (H_2O_2) ed il radicale idrossile (OH), prodotto dalla unione dei precedenti (Green e Hill, 1984).

I ROS sono prodotti soprattutto nei mitocondri (Lambeth et al., 2008) e in minor misura nel reticolo endoplasmico nei lisosomi e nei perossisomi (Schrader e Fahimi, 2006). Nei lisosomi dei fagociti la sintesi dei ROS origina dall'attivazione della NADPH-ossidasi, a sua volta dipendente da numerose citochine. Altri enzimi quali xantina-ossidasi, cicloossigenasi e lipoossigenasi, sono invece coinvolti nella produzione di ROS endoteliale o in tipi cellulari diversi dai fagociti.

Oltre all'azione difensiva svolta nei fagociti, i ROS inducono altre risposte biologiche, quali apoptosi, alterazioni morfofunzionali di endotelio e muscolatura liscia responsabili della regolazione del tono vasale, inibizione dell'adesione piastrinica, attivazione dei linfociti e dell'angiogenesi inducendo l'espressione di vascular endothelial growth factor (Ignarro e Kadowitz, 1985; Ushio-Fukai, 2007).

L'aumento dei ROS nei tessuti è, nell'uomo, associato a patologie quali diabete, aterosclerosi, ipertensione, neoplasie, artrite, cirrosi, cataratta (Pryor, 1986; Fletcher, 2010). In tali patologie i ROS danneggiano le cellule irreversibilmente alterando la fluidità delle membrane, sia per denaturazione proteica sia per perossidazione dei lipidi, che peraltro, generano perossidi a loro volta ossidanti, che amplificano la lesione; vengono alterati anche microfilamenti, citoscheletro e le strutture nucleari (Bellomo et al., 1988). Risultano poi alterate strutture extracellulari come l'elastina e il collagene.

Per contrastare l'ossidazione, l'organismo usa meccanismi di difesa enzimatici e non enzimatici. Tra i primi rientrano superossido-dismutasi, catalasi e glutazione perossidasi che inattivano rispettivamente anione superossido, H_2O_2 ed idroperossidi (Halliwell, 1999; Eaton, 2006). Tra i secondi rientrano composti che reagiscono con i ROS stessi, quali glutazione, ubiquinone, acido urico, vitamine E e C, polifenoli, flavonoidi e alcune proteine quali albumine, aptoglobina, ferritina, e ceruloplasmina (Urquiaga e Leighton, 2000). I danni da radicali ossidanti avvengono se queste difese vengono meno.

Alla luce di quanto sopra, emerge che l'eccessiva produzione di ROS può danneggiare cellule e tessuti ma anche che i ROS sono essenziali per l'attività dei fagociti. Per tale motivo alcuni patogeni intracellulari hanno sviluppato meccanismi di adattamento per sopravvivere alle difficili condizioni dell'apparato digerente dei

fagociti. Tra gli organismi in grado di resistere alla digestione rientra *Leishmania donovani*, patogeno trasmesso da flebotomi. *Leishmania* infatti ha sviluppato difese per sopravvivere e riprodursi nel fagolisosoma macrofagico, e manipola la risposta immunitaria dell'ospite per proteggersi e per penetrare nelle cellule (Cunningham, 2002; Zambrano-Villa et al., 2002).

I macrofagi sono le uniche cellule che in vivo permettono crescita e replicazione intracellulari di *Leishmania* (Prina et al., 1996), ma la capacità di resistere all'infezione uccidendo il parassita, risulta essere ROS-dipendente (Mookerjee Basu et al., 2006). I ROS rivestono una grande importanza nella risposta infiammatoria contro *Leishmania*, poiché costituiscono una delle strategie di difesa dell'ospite per uccidere il parassita. Uno studio effettuato nell'uomo conclude che i ROS prodotti dall'organismo amplificano l'attività leishmanicida (Kocygil et al., 2005). Una correlazione positiva tra respiratory burst e capacità di uccidere la *Leishmania* è stata rilevata anche nel cane (Panaro et al., 1998) e nel topo (Bisti et al., 2006).

Leishmania mette in atto varie strategie per sovvertire le funzioni antimicrobiche del macrofago (Denkers e Butcher, 2005): esprime sulla sua superficie il lipofosfoglicano (LPG) e la metalloproteasi gp63 e si protegge dalla degradazione fagolisosomica grazie a meccanismi quali inibizione della fusione fagosoma-lisosoma e degli enzimi idrolitici, modulazione della risposta delle citochine nell'ospite, inibizione della presentazione degli antigeni e della stimolazione dei linfociti T, soppressione della sintesi di metaboliti reattivi dell'ossigeno e dell'azoto (Bodgan e Rollinghoff, 1998). La produzione di metaboliti ossidanti viene infatti inibita quando i parassiti penetrano nella cellula utilizzando il recettore C3b/C3b1. Il LPG forma una barriera intorno al parassita ed capta i radicali liberi, prevenendo anche l'unione di fagosoma e lisosomi. Inoltre la gp63, data la sua attività proteolitica, degrada gli enzimi lisosomiali destinati a distruggere gli amastigoti (Montserrat e Riera, 2002). Le prove sperimentali che sostengono l'ipotesi di un'attiva inibizione della produzione di ROS da parte di *Leishmania* sono numerose: nei pazienti con leishmaniosi viscerale i livelli di perossido di idrogeno e superossido sono significativamente inferiori a quelli di pazienti sani e tornano ad aumentare dopo trattamento (Kumar et al, 2001); i neutrofilii di topo infettati con *L. donovani* riducono del 30-50% la produzione di superossido (Jain et al., 1996); la fosfatasi acida isolata dalla superficie esterna di promastigoti di *L. donovani* inibisce la produzione di anione superossido da parte dei neutrofilii (Remaley et al., 1984); nel topo l'attività NADPH-ossidasi è rilevabile solo nel 2% dei vacuoli parassitofori contenenti amastigoti. (Pham et al., 2005). Negli ultimi anni è cresciuto l'interesse verso la leishmaniosi canina sia come malattia del cane che come zoonosi. Soprattutto nelle aree endemiche, però, la malattia spesso decorre in forma asintomatica per poi esplodere rapidamente nella forma clinica. Ciò suggerisce che nei cani colpiti le difese immunitarie, compresa l'attività leishmanicida intracellulare, siano efficaci nelle fasi iniziali per poi diminuire consentendo la replicazione intracellulare degli elementi parassitari e contribuendo alla diffusione del parassita nell'organismo. In questa parte della tesi abbiamo voluto indagare questi aspetti dell'interazione ospite/*leishmania*, utilizzando indicatori sensibili di infiammazione quali i metaboliti reattivi dell'ossigeno e la proteina C reattiva (CRP), come indicatore della presenza di stati infiammatori latenti. Dato che le esperienze con l'uso dei metaboliti reattivi

dell'ossigeno nel cane sono scarse (Pasquini et al., 2005), la valutazione del ruolo biologico dei radicali ossidanti è stata preceduta da una fase di validazione analitica del metodo di determinazione di tali metaboliti. Di seguito è descritto l'approccio sperimentale seguito ed i principali risultati e considerazioni. Questa parte della tesi è stata oggetto di una pubblicazione in corso di stampa su *Veterinary Journal* (n° 4 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e Metodi

DISEGNO SPERIMENTALE E SELEZIONE DEI CAMPIONI

I 69 campioni inclusi in questo studio sono stati raccolti in parte presso l'Hospital Clinic Veterinari della Facoltà di Veterinaria di Bellaterra (Barcellona), in collaborazione con il Dr. Xavier Roura, in parte presso strutture private di Milano. Per quanto riguarda i soggetti patologici, sono stati inclusi nello studio tutti i cani con segni clinici compatibili con leishmaniosi canina (dermatiti ulcerative, desquamative, papulari, nodulari, lesioni nasali, alopecie focali, stato di nutrizione scadente, cachessia, linfadenomegalia, epato-splenomegalia, pallore delle mucose, epistassi, zoppie, oncopatie). I cani di controllo sono stati selezionati in base all'assenza di sintomi clinici compatibili con leishmaniosi e con altre patologie di natura infiammatoria. Da tutti i cani sopra citati è stato effettuato un prelievo di sangue che è stato posto parte in provette contenenti EDTA e parte in provette prive di anticoagulante, da cui ottenere siero per centrifugazione e un prelievo di urine mediante cistocentesi. Quando l'esame fisico lo richiedeva, i cani sono stati sottoposti a prelievo di altro materiale biologico (es: citologia di cute, midollo o linfonodo, istologia di cute o organi interessati).

I campioni di cui sopra sono stati utilizzati per eseguire:

- esame emocromocitometrico completo, eseguito con contaglobuli laser ADVIA 120 (Bayer Corporation, Tarrytown, NY, USA), contaglobuli ad impedenza (SEAC Hemat 8, SEAC, Calenzano, Firenze) o contaglobuli a lettura mista, laser ed impedenza (Sysmex XT2000V, Sysmex Europe, GMBH, Norderstedt, Germany). Le prestazioni dei tre strumenti, per quanto riguarda le conte cellulari, sono sovrapponibili, come dimostrato da studi di validazione (Tvedten e Lillehook, 2009; Giordano et al., 2008) che consigliano di verificare su vetrino la formula leucocitaria. La formula leucocitaria è stata quindi eseguita al microscopio, su striscio colorato con May Grünwald-Giemsa, contando almeno 200 cellule. La conta dei reticolociti è stata eseguita colorato dopo colorazione con blu brillante di cresile, contando al microscopio almeno 1000 eritrociti (Meinkoth e Clinkenbeard, 2000).
- pannello biochimico di base, per inquadrare la funzionalità e/o la presenza di alterazioni epato-renali. Le determinazioni sono state effettuate con analizzatori automatici (Olympus AU400 --- Amburgo, Germania; Cobas Mira, Roche diagnostic, Basilea, Svizzera). In particolare sono stati determinati la concentrazione di creatinina (metodo di Jaffé), urea (metodo enzimatico dell'ureasi) e proteine totali (metodo al biureto), e l'attività della alanina aminotransferasi (ALT, metodo cinetico enzimatico IFCC)..

- elettroforesi delle sieroproteine: è stata eseguita in gel d'agarosio mediante analizzatore automatico Sebia Hydrasis (Sebia Italia S.r.l., Bagno a Ripoli, Firenze) utilizzando kit appositamente forniti dal produttore dello strumento. Dopo acquisizione dei gel con apposito scanner la lettura densitometrica è stata eseguita con l'apposito software (Phoresis, Sebia Italia S.r.l.).
- esame delle urine con determinazione della proteinuria mediante rapporto proteine/creatinina urinaria (PU/CU): le proteine urinarie sono state misurate con metodo del pirogallolo utilizzando gli stessi analizzatori automatici sopra citati. La creatinina urinaria è stata determinata mediante metodo di Jaffè su urine diluite 1:20. Partendo dai valori ottenuti è stato quindi calcolato il rapporto PU/CU.
- esame sierologico per leishmania mediante tecnica ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay), messa a punto presso l'Università di Barcellona o mediante immunofluorescenza eseguita utilizzando un kit disponibile in commercio (Agrolabo, Torino, Italia) .
- PCR: In caso di positività sierologica o di forte sospetto clinico sono state eseguite PCR midollari presso laboratori esterni o PCR quantitative (PCR real time) eseguite presso il servizio di Genetica Molecolare della Facoltà di Veterinaria dell'Università Autonoma di Barcellona, con metodiche messe a punto e validate dal laboratorio stesso.

Nei casi in cui oltre alla leishmaniosi erano possibili altre diagnosi differenziali e, soprattutto, nei soggetti sintomatici sieronegativi, sono stati eseguiti esami diagnostici collaterali, diversi da caso a caso e scelti sulla base dei segni clinici o delle alterazioni di laboratorio. Quando rilevante ai fini della presente tesi, gli esami effettuati, ed i relativi cenni alla metodica utilizzata, verranno presentati durante la descrizione dei risultati.

VALUTAZIONE DELLA PROTEINA C REATTIVA

La determinazione della CRP è stata effettuata mediante spettrofotometro automatizzato, utilizzando un kit disponibile in commercio (Real Time Diagnostic Systems, Viterbo, Italia) contenente, oltre al tampone di reazione, anticorpi anti-CRP umana legati a particelle di lattice, nonché un calibratore a titolo noto di CRP col quale sono state allestite diverse diluizioni allo scopo di ottenere una curva di taratura semilogaritmica sulla base della quale determinare poi le concentrazioni di CRP dei campioni in esame.

DETERMINAZIONE DELLO STATO OSSIDATIVO

Lo stato ossidativo dei soggetti inclusi nella presente tesi è stato valutato mediante un test teso a rilevare la presenza di radicali ossidanti, il cosiddetto "d-ROMs test". Si tratta di un test spettrofotometrico che permette di valutare la concentrazione di idroperossidi (ROOH) in un campione biologico. Nel test d-ROMs gli idroperossidi vengono messi nelle stesse condizioni di una reazione Fenton per generare in vitro radicali alcossili e perossili: una piccola quantità di campione biologico, per esempio siero, viene diluita in una soluzione acida a pH 4,8 ed in queste condizioni gli ioni ferro, prima legati alle proteine sieriche, divengono disponibili per catalizzare in vitro la rottura degli idroperossidi, che formano radicali alcossili e perossili. A tale

soluzione viene poi aggiunto una sostanza cromogena (N,N,-diethylparafenilen-diamina) che, quando viene ossidata da radicali idroperossile e alcossile, cambia colore, trasformandosi così in un catione colorato con una tonalità che può andare da rosa a rosso. Tale catione è un radicale, ma è sufficientemente stabile da permettere una misurazione della sua quantità per mezzo di un fotometro che legga alla lunghezza d'onda 505 o 546 nm. La concentrazione di idroperossidi nel campione biologico analizzato è direttamente correlata con l'intensità di colore assunto dalla sostanza cromogena. Il risultato viene espresso in unità "CARRATELLI" ("CARR U", dal nome dell'inventore del d-ROMs test), ognuna delle quali corrisponde a 0,08 mg/100ml H₂O₂. In questa tesi è stato utilizzato il kit d-ROMs commercializzato dalla Diacron S.r.l. che è stato adattato allo stesso fotometro Cobas Mira utilizzato per le determinazioni biochimiche sopra accennate. La metodica è stata impostata come consigliato dalla ditta produttrice modificando il metodo manuale in modo da ottenere una soluzione di lavoro contenente sia il cromogeno (reagente R1) che la soluzione tampone (reagente R2). Lo strumento è stato impostato in modo da miscelare 250 µl di tale soluzione e 5 µl del calibratore (incluso nel kit) o di sieri a titolo noto (forniti dalla casa produttrice) nella fase di taratura dello strumento e controllo di qualità, oppure 5 µl di ogni campione, e di leggere poi l'assorbanza a 546 nm dopo 5 minuti. Prima di utilizzare il kit sui campioni oggetto dello studio è stata eseguita una fase di validazione analitica valutando la precisione intra-assay mediante 10 letture ripetute di un pool di sieri a titolo basso (valore medio 140 CARR U) e di un pool di sieri a titolo elevato (546 CARR U). Per valutare la precisione inter-assay gli stessi pool di sieri sono stati sottoposti a lettura giornaliera per 6 giorni consecutivi. L'accuratezza è stata valutata mediante lettura di 4 diluizioni seriali del pool a titolo alto e verifica della corrispondenza tra risultati attesi e risultati ottenuti.

ANALISI STATISTICA

All'interno di ogni gruppo sono state determinate la media e la deviazione standard, la mediana e l'intervallo di distribuzione al 95° percentile. I gruppi sono stati confrontati tra loro sia in maniera indipendente (es. gruppi 1 vs 2, 1 vs 3, e così via), con il test U Mann Withney, sia valutando la significatività globale con il test ANOVA di Kruskal Wallis, seguito dal test di Bonferroni. Nei gruppi 2 e 4, nei quali erano presenti soggetti con reperti fisici diversi e/o alterazioni di laboratorio, la concentrazione sierica di CRP e dei parametri ossidativi è stata confrontata, mediante test di U Mann Withney o, quando i gruppi erano più di due, mediante test ANOVA di Kruskal Wallis, in funzione dei seguenti parametri: presenza di sole alterazioni di laboratorio vs. presenza di reperti fisici e alterazioni di laboratorio; localizzazione della patologia; e, per quanto riguarda il gruppo 4, tipologia di processo patologico (in particolare linfoma vs. infiammazione). All'interno dei gruppi 2 e 3, nei quali erano presenti soggetti con diverso titolo anticorpale, è anche stata investigata l'eventuale differenza di CRP e d-ROMs in funzione delle classi di titolo anticorpale (alto, medio, basso). Nei gruppi 2 e 4 è anche stata indagata, mediante test non parametrico di Spearman, la possibile presenza di correlazioni tra CRP e d-ROMs nonché tra CRP o d-ROMs e numero di leucociti, numero di neutrofilii, titolo anticorpale, concentrazione proteica totale e frazionata (relativamente alle due classi albumine e γ -globuline), rapporto albumine/globuline.

Risultati

PRESTAZIONI ANALITICHE DEL TEST d-ROMS

La validazione analitica del test utilizzato ha rivelato una precisione within-run del 5,67% e between-run del 9,1% per il pool a titolo basso e del 9,5% e 14,8%, rispettivamente, per il controllo a titolo elevato, nonché una accuratezza mediante diluizione seriale che rilevava una deviazione massima dell'1,4% rispetto ai valori attesi.

FORMAZIONE DEI GRUPPI

Sulla base dei dati clinici e di laboratorio, i 69 soggetti inclusi nella tesi sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

- 1) Controllo negativo: 12 cani che non presentavano alterazioni cliniche, ematologiche o elettroforetiche compatibili con leishmaniosi canina e risultavano negativi all'esame sierologico.
- 2) Cani malati di leishmaniosi: 27 cani i quali, oltre a risultare positivi a sierologia e/o accertata a PCR, presentavano alterazioni cliniche e/o di laboratorio compatibili con leishmaniosi. In particolare sono stati rilevati sintomi cutanei in 13 casi (48%), patologie artro-muscolari in 7 casi (26%), linfoadenopatia in 6 casi (22%), astenia o anoressia in 3 casi (11%), sintomi oculari in 2 casi (7%) e sintomi gastroenterici, poliuria o pallore delle mucose in 1 caso (4%). Le alterazioni di laboratorio più frequentemente riscontrate sono risultate essere iperproteinemia (13 casi, 48%), inversione del rapporto A/G (13 casi, 48%), proteinuria (8 casi, 30%), ipoalbuminemia (8 casi, 30%), gammopatia (7 casi, 26%), anemia (7 casi, 26%), leucocitosi/neutrofilia (6 casi, 22%), iperazotemia (5 casi, 19%), aumento di attività dell'ALT (2 casi, 7%).
- 3) Cani infetti da leishmania: 14 soggetti che pur essendo risultati positivi ad indagini sierologiche e/o molecolari per leishmania, generalmente con titoli medio-bassi, non presentavano segni clinici o alterazioni di laboratorio compatibili con leishmaniosi.
- 4) Cani affetti da patologie diverse dalla leishmaniosi: 16 cani con segni clinici e/o alterazioni di laboratorio compatibili con leishmaniosi (tabella 14), nei quali la presenza del parassita è stata esclusa mediante negatività sierologica e, in 5 casi, dalla negatività a test PCR eseguito su midollo osseo. Una volta esclusa la leishmaniosi, in 9 casi si è giunti alla diagnosi di forme infiammatorie pure, per lo più a localizzazione cutanea, con l'eccezione di una forma sistemica antibiotico-responsiva, e di una forma infiammatoria intestinale; in 4 cani con linfoadenopatia, è stato diagnosticato un linfoma; altre diagnosi sono state: insufficienza renale cronica; lupus eritematoso e neoplasia delle ghiandole paranasali, associate a forme flogistiche secondarie.

DETERMINAZIONE DELLA CRP

La concentrazione rilevata nei gruppi 2 (media±SD: 0,57±0,45; mediana: 0,45 mg/dL) e 4 (media±SD: 0,66±0,64; 0,51 mg/dL) è risultata significativamente superiore ($p < 0,05$) a quella dei gruppi 1 (media±SD: 0,23±0,10; 0,26 mg/dL) e 3 (media±SD: 0,28±0,14; 0,27 mg/dL) (figura 7).

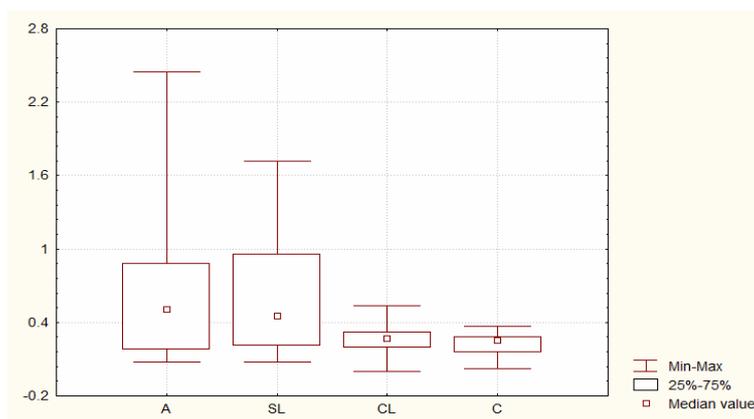


Figura 7 Distribuzione dei valori di CRP nei quattro gruppi in esame. A: patologie diverse da Leishmania; SL: leishmaniosi sintomatica; CL: leishmaniosi asintomatica; C: controllo

L'analisi dei dati individuali non ha evidenziato valori di CRP particolarmente elevati in cani con segni clinici riferibili alla presenza di processi infiammatori acuti, in analogia con quanto riportato da Martinez-Subiela et al. (2002) mentre nel gruppo con patologie diverse i valori più elevati si sono riscontrati nei soggetti con forme infiammatorie sistemiche.

STATO OSSIDATIVO RILEVATO NEI DIVERSI GRUPPI

I valori di d-ROMs sono riportati in tabella 13 e sono riassunti in seguito e in figura 8.

Gruppo 1: i valori rilevati nel gruppo di controllo sono sovrapponibili a quelli riportati nell'unico studio riguardante i d-ROMs nel cane, ma il range di distribuzione è leggermente più ampio (Pasquini et al., 2005).

Gruppo 2: la distribuzione è risultata relativamente ampia ed erano presenti sia valori inferiori (5 casi) che superiori (8 casi) a quelli del gruppo di controllo, con il quale però non si sono rilevate differenze significative. Non è emersa alcuna relazione apparente tra valori bassi o elevati di d-ROMs e presenza di quadri clinici particolari ma i soggetti che oltre a reperti fisici presentavano alterazioni di laboratorio, avevano valori di d-ROMs più elevati (media±SD: 118,9±100,3 CARR U) di quelli rilevati nei cani che non presentavano alterazioni di laboratorio (media±SD: 46,2±24,9 CARR U) ($p < 0,05$). Non sono state rilevate correlazioni con il titolo anticorpale, con il livello di proteine totali o di γ -globuline e con la concentrazione di CRP. Al contrario, è emersa una correlazione negativa ($p < 0,05$; $r = -0,39$) tra concentrazione di d-ROM e di albumine.

Gruppo 3: L'analisi dei dati individuali evidenzia un'estrema variabilità di distribuzione: la gran parte dei cani presentano valori all'interno dell'intervallo di riferimento, ma in 3 casi i valori erano superiori a tale intervallo e in altri 3 erano inferiori. Anche in questo caso non si sono rilevate differenze significative con i controlli, né correlazioni con titolo anticorpale, concentrazione di CRP, albumine o γ -globuline, o rapporto A/G.

Gruppo 1	Gruppo 2	Gruppo 3	Gruppo 4
77,5	10,8	19,7	23,6
65,4	14,0	1,6	60,2
85,6	215,4	2,7	44,7
93,3	29,8	12,5	61,8
120,8	49,3	129,6	218,8
125,7	12,9	62,0	31,4
35,2	49,1	116,0	39,3
36,6	172,5	91,0	103,6
127,1	124,4	n.r.	254,8
18,9	65,1	169,6	334,2
94,7	112,3	55,6	253,2
23,4	89,3	186,8	113,1
	302,1	77,5	85,0
	73,4	30,7	186,1
	196,6		49,3
	16,7		184,2
	392,2		
	7,5		
	55,2		
	207,6		
	45,3		
	173,1		
	88,7		
	56,5		
	88,2		
	63,0		
	209,4		
dROMs CARR U Media ± SD (mediana) Min-Max 75,4 ± 39,5 (81,6) 20,1-126,7	dROMs CARR U Media ± SD (mediana) Min-Max 108,2 ± 96,3 (73,4) 9,6-333,6	dROMs CARR U Media ± SD (mediana) Min-Max 73,5 ± 62,2 (62,0) 1,9-181,6	dROMs CARR U Media ± SD (mediana) Min-Max 127,7 ± 97,3 (94,3) 26,5-304,4

Tabella 13 Risultati relativi alla concentrazione di dROMs rilevata nei cani inclusi nello studio

Gruppo 4: nessuno degli animali inclusi in questo gruppo presentava valori di d-ROMs inferiori alla norma. Dieci soggetti presentavano valori all'interno del range del gruppo di controllo, mentre 6 presentavano valori elevati. Il valore medio, nonostante risultasse molto più simile a quello rilevabile nei cani affetti da leishmaniosi clinicamente manifesta non è risultato significativamente differente da quello degli altri gruppi. I valori di d-ROMs non sono risultati significativamente diversi in cani con patologie a diversa localizzazione (es: cute, linfonodo, ecc...), né in funzione dell'estensione del processo (es: patologie localizzate, patologie sistemiche) e del tipo di processo patologico in atto (es: linfomi, infiammazioni). Anche in questo gruppo non sono risultate correlazioni tra valori di d-ROMs e livelli di CRP, proteine totali e frazionate. Al contrario dei gruppi precedenti, però, i valori di d-ROMs sono risultati positivamente correlati ai valori di leucociti totali e di neutrofili.

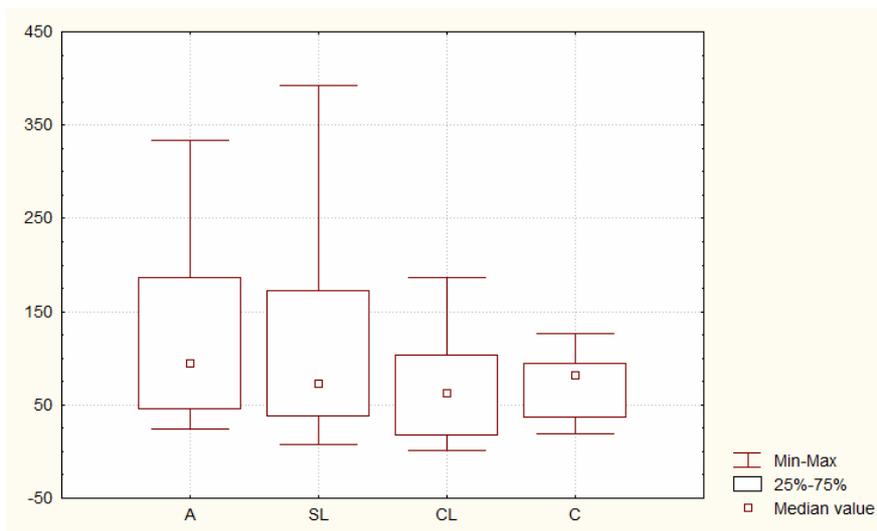


Figura 8 Distribuzione dei valori di dROMs nei quattro gruppi in esame. A: patologie diverse da Leishmania; SL: leishmaniosi sintomatica; CL: leishmaniosi asintomatica; C: controllo

La distribuzione dei dati nei quattro gruppi, per quanto riguarda i d-ROMs, è riportata in figura 9, nella quale è rilevabile come la distribuzione dei valori nei soggetti infetti asintomatici sia sovrapponibile a quella del gruppo di controllo, i cui limiti superiore e inferiore sono indicati dalla linea tratteggiata, anche se già in questo gruppo alcuni cani presentano valori inferiori o superiori ai range. Quest'ultima situazione si presenta anche nei soggetti sintomatici tra i quali si riscontrano sia valori bassi che valori elevati, questi ultimi distribuiti in maniera simile a quanto osservabile nel gruppo di soggetti affetti da patologie diverse dalla leishmaniosi.

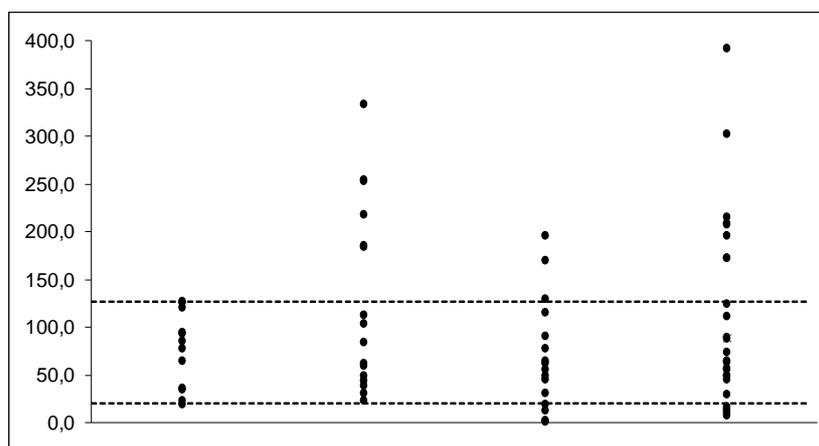


Figura 9 Distribuzione dei valori di dROMs nei quattro gruppi in esame

Il comportamento sopra descritto non è invece rilevabile per l'altro marker infiammatorio incluso nella presente tesi, e cioè la CRP (figura 10), che risulta alterato solo in alcuni soggetti sintomatici (con leishmaniosi o con altre patologie) ma non nei cani con leishmaniosi non sintomatica.

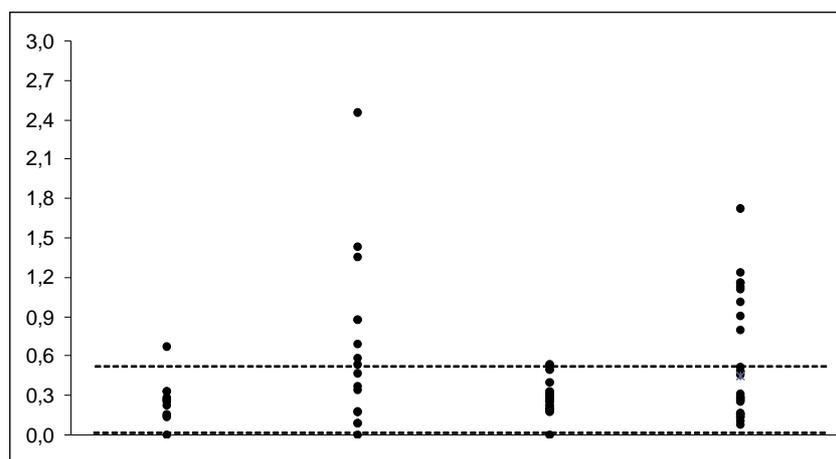


Figura 10 Distribuzione della CRP nei quattro gruppi in esame

Discussione

La sieronegatività rilevata nei gruppi 1 e 4 esclude la presenza di infezione. Gli studi longitudinali effettuati in corso di infezioni sperimentali o spontanee hanno infatti rilevato anticorpi già un a mese dopo infezione, anche se la mediana dei tempi di sieroconversione si aggira sui 5 mesi (Moreno e Alvar, 2002; Oliva et al., 2006). Il fatto che nessuno dei cani inclusi in questi gruppi fosse sieropositivo, permette di affermare che l'eventuale infezione, se presente, sarebbe avvenuta poco prima del prelievo. La gran parte di questi cani, però, viveva in area non endemica e, sebbene l'epidemiologia della leishmaniosi negli ultimi sia cambiata (Pozio et al., 1985; Capelli et al., 2004; Rossi et al., 2005), è poco probabile che la sieronegatività possa dipendere da un'infezione in via di sviluppo. In 5 cani, peraltro, l'assenza di infezione è stata confermata dalla PCR. I cani del gruppo 2 presentavano invece una forma di leishmaniosi poco controllata dall'organismo, associata ad infiammazione. Questo fa di questo gruppo la popolazione ideale per verificare lo stato ossidativo specificamente attivato da *Leishmania*. Eventuali differenze tra questo gruppo ed il gruppo con altre patologie infiammatorie potrebbero permettere di identificare un pattern ossidativo leishmania-specifico. I cani inclusi nel gruppo 3 sono invece quelli più interessanti dal punto di vista dei parametri aggiuntivi (CRP e metaboliti ossidativi) i quali, in caso di risultati differenti da quelli del gruppo 2, potrebbero rivelarsi utili per discriminare i soggetti con patologia "sotto controllo" da quelli che sembrano non contenere l'attacco del parassita. I d-ROMs non sono risultati significativamente diversi nei 4 gruppi ma hanno evidenziato una tendenza a valori alti nei soggetti con quadri infiammatori e in alcuni cani con leishmaniosi asintomatica, e bassi in alcuni cani con leishmaniosi. In molti casi è emersa una correlazione negativa tra d-ROMs e albumine giustificata dal fatto che le albumine sono proteine di fase acuta negative (Ceron et al., 2005) ma non correlazioni positive tra d-ROMs e di CRP. Ciò non sorprende in quanto la CRP indica genericamente una risposta di fase acuta, mentre i d-ROMs evidenziano solo i soggetti in cui sono presenti in circolo radicali ossidanti. A sostegno di questa ipotesi, in alcuni dei gruppi patologici si è rilevata una correlazione tra d-ROMs e leucociti e granulociti. In altri

questa correlazione non si è rilevata ma va sottolineato che il numero di leucociti circolanti non sempre riflette quello delle cellule presenti nel sito di flogosi. E' quindi possibile che situazioni caratterizzate da attivazione "locale" di neutrofilii e quindi da produzione ed immissione in circolo di d-ROMs, non siano associate a neutrofilia periferica, e viceversa è possibile che le citochine responsabili della reazione di fase acuta determinano leucocitosi periferica anche in soggetti in cui localmente la flogosi non è ancora di elevata entità. Tale ipotesi è supportata dal fatto che i d-ROMs erano elevati in molti soggetti con coinvolgimento sistemico (presenza sia di sintomi che di alterazioni di laboratorio). D'altra parte, almeno per quanto riguarda il gruppo 2, va considerato che uno dei meccanismi per cui il parassita sopravvive nelle cellule infette risiede proprio nella sua capacità di inibire i processi digestivi intracellulari di tipo ossigeno-dipendente (Jain et al., 1996; Bodgan e Rollinghoff, 1998). Il riscontro di alcuni cani con livelli di d-ROMs molto bassi, sembra supportare tale ipotesi, e la mancanza di valori elevati di d-ROMs in cani con infiammazione evidente potrebbe essere il risultato di due fenomeni opposti e coesistenti: l'infiammazione, che tende ad innalzare i d-ROMs, e l'infezione da leishmania che tende a ridurli. Anche i risultati del gruppo 3 supportano queste ipotesi e suggeriscono che nonostante l'assenza di alterazioni cliniche e/o di laboratorio, alcuni soggetti stanno interagendo con il parassita. In conclusione, questo studio ha permesso di validare il metodo analitico per la determinazione dei d-ROMs nel cane e ha evidenziato che in alcuni cani con leishmaniosi clinicamente manifesta, associata ad alterazioni cliniche e di laboratorio compatibili con infiammazione, i valori di d-ROMs si elevano come nei cani con patologie infiammatorie di natura diversa. Tale alterazione è però rilevabile anche in alcuni cani con forma non clinicamente evidente a suggerire che l'interazione ospite-parassita determina risposte infiammatorie latenti. Inoltre, in entrambi i gruppi di cani con leishmaniosi, si sono riscontrati alcuni soggetti con valori più bassi dell'intervallo di riferimento a suggerire che questo analita potrebbe permettere di rilevare i soggetti nei quali il parassita sta in qualche modo inibendo la produzione di d-ROMs. Infine, sia nei cani infetti e malati di leishmaniosi, i livelli di d-ROMs sono risultati poco correlabili a quelli della CRP o di altri parametri indicatori di flogosi, ad indicare che CRP e metaboliti ossidativi, pur essendo entrambi parametri in qualche modo legati al processo infiammatorio, sono probabilmente espressione di aspetti diversi della flogosi.

Tali risultati aprono interessanti prospettive circa l'utilizzo dei d-ROMs come marker precoci di leishmaniosi e come ulteriore mezzo diagnostico per stadiare la patologia. In particolare i futuri studi dovranno essere rivolti alla possibile associazione tra variazioni dei d-ROMs ed assetto immunitario, per stabilire se tali alterazioni siano associate agli squilibri tra immunità umorale e cellulo-mediata che caratterizzano l'evoluzione della patologia dalla forma non sintomatica a quella clinicamente evidente e alla disseminazione del parassita.

DETERMINAZIONE DELL'IFN- γ FELINO CON METODO ELISA, DEI dROMs CON METODO ENZIMATICO E MESSA A PUNTO DI UN MODELLO SPERIMENTALE DI VALUTAZIONE DELLE RISPOSTE DI LEUCOCITI EMATICI INCUBATI CON PEPRIDI IMMUNOGENI DI CORONAVIRUS FELINO

Come accennato in precedenza, l'interferone (IFN) è una citochina importante nella regolazione delle risposte immunitarie. L'IFN ad attività immunomodulatrice (IFN- γ) è però solo una delle molecole appartenenti alla famiglia degli interferoni e rappresenta una specie di eccezione in quanto gli altri membri della famiglia hanno prevalentemente proprietà antivirali, tanto che il loro nome deriva dalla loro abilità di interferire con la replicazione virale (Sen, 2001) (tabella 14).

Classe	Interferone	Fonte	Funzione
Tipo 1	α	cellule dendritiche	antivirale
	β	Fibroblasti	antivirale
	ω	Trofoblasto	segnale gravidico
	τ	Trofoblasto bovino	segnale gravidico
	δ	Trofoblasto suino	segnale gravidico
Tipo 2	γ	Cellule Th1, trofoblasto suino	Attivazione immunitaria e segnale gravidico.

Tabella 14 Classificazione dei due tipi di interferone

Gli interferoni antivirali sono prodotti da tutte le cellule ed hanno un'attività del tutto aspecifica nel senso che è rivolta verso qualsiasi virus. Sono prodotti in quantità apprezzabili entro 12-24 ore dall'acme della replicazione virale e portano rapidamente a una drastica riduzione della produzione di virus nei tessuti infetti. L'interferone esplica inoltre un'azione antibatterica e antiprotozoaria e sembra anche contribuire alle antitumorali ed alla regolazione della risposta immunitaria (Poli e Cocilovo, 1998).

L'IFN- γ è invece prodotto da linfociti T attivati (NK, CD4 Th1 e CD8) (Sen, 2001) e, in particolari condizioni, anche da macrofagi e cellule dendritiche. Lo stimolo alla produzione dell'IFN- γ è rappresentato da citochine quali IL-1, IL-2, IL-12, IL-18, IL-15, IL-21, IL-23, IL-27, IFN- γ e TNF- α . La principale è l'IL-12 che sostiene lo sviluppo della risposta Th1 (Malmgaard, 2004). A sua volta, l'IFN- γ attiva la risposta cellulo-mediata amplificando la risposta di cellule T citotossiche, NK ed helper mediante l'aumento di espressione del MCH-II sui macrofagi (Poli e Cocilovo, 1998). In ultima analisi quindi interviene nello sviluppo delle cellule Th1, codificando la sintesi di IL-12 nelle cellule presentanti l'antigene (Murphy et al., 1995), ed inibisce lo sviluppo delle cellule Th2 inducendo apoptosi delle cellule pre-B (Clemens, 2003). L'attivazione IFN- γ -mediata della risposta Th1 risulta protettiva nei confronti di molte malattie infettive (AIDS, tubercolosi, lebbra, leishmaniosi), le quali invece diventano più aggressive in caso di risposta Th2 (Stark et al., 1998; Tizard, 2000).

Per questo motivo molti virus, nel corso di milioni di anni di co-evoluzione hanno cercato di antagonizzare la risposta difensiva IFN-mediata, inibendo i seguenti passaggi coinvolti nell'attivazione del segnale (Alcami e Koszinowski, 2000):

- 1 - interferiscono con espressione genica o sintesi proteica dell'IFN- γ (Gale et al., 2000);
- 2 - riducono l'induzione dell'IFN bloccando la cascata di segnale che lo induce;
- 3 - inibiscono del segnale indotto dall'IFN sulle cellule bersaglio;
- 4 - bloccano l'azione delle proteine antivirali indotte dall'IFN;
- 5 - Utilizzano sistemi di replicazione insensibili all'azione dell'interferone;

Lo resistenza o la suscettibilità alla malattia dipende quindi dall'equilibrio tra meccanismi di evasione virale e risposta IFN-mediata dell'organismo. Questo equilibrio gioca un ruolo importante nella persistenza del virus nell'organismo e in caso di virus ad alta attività replicativa, può portare alla comparsa di nuove varianti virali (quasispecie) o a ricombinazione tra virus diversi. Questo scenario sembra essere implicato nella patogenesi delle coronavirosi feline: grazie all'instabilità del suo genoma, il coronavirus felino (FCoV), normale abitatore dell'intestino, replicando può generare decine di quasispecie, alcune delle quali replicano nei macrofagi e con essi diffondono nell'organismo determinando la peritonite infettiva felina (FIP) (McReynolds e Macy, 1999).

L'evolversi della patologia è a questo punto esclusivo retaggio del sistema immunitario. In assenza di risposta cellulo-mediata, il coronavirus diffonde a livello sistemico e gli anticorpi prodotti formano immunocomplessi che si depositano nell'endotelio delle vene di piccolo calibro, inducendo una vasculite da cui derivano i versamenti tipici della forma umida (McReynolds e Macy, 1999). Un'efficace risposta immunitaria cellulo-mediata determina invece lo sviluppo di infezioni latenti, bassi livelli di viremia e un certo grado di resistenza immunitaria (Pedersen, 1987), che può venire meno in caso di eventi stressanti o immunodepressione, con conseguente shift immunitario da Th1 a Th2 (Gunn-Moore et al., 1998). La forma non effusiva invece compare quando si è in presenza di una modica risposta cellulo-mediata che permette così la replicazione del virus, cui conseguono fenomeni di ipersensibilità di tipo IV che portano alla comparsa di granulomi (Paltrinieri et al., 1998a).

Nelle coronavirosi feline, l'espressione e la concentrazione di IFN- γ diminuisce nelle forme clinicamente evidenti (FIP) mentre sembra aumentare in animali resistenti. Questo ha fatto ipotizzare un ruolo protettivo di questa citochina nei confronti di FCoV.

Come sopra accennato, il primo evento coinvolto nella patogenesi della FIP dovrebbe essere rappresentato da mutazioni in grado di rendere il FCoV in grado di replicare nei macrofagi. I geni più "sospetti" sono quelli della proteina S o geni non strutturali come il 7b o il 3c del FCoV. Non è stata però evidenziata una mutazione univoca e rilievi sperimentali o in patologia spontanea, indicano che la mutazione virale è solo uno degli eventi responsabili dello sviluppo di FIP. L'altro evento importante è rappresentato dal tipo di risposta immunitaria. Sebbene sia possibile che l'assetto immunitario dei soggetti dipenda da caratteristiche individuali, indipendenti dal FCoV, recentemente è stato ipotizzato che sia lo stesso FCoV a influenzare in qualche modo le risposte immunitarie. Tale ipotesi nasce dal fatto che virus isolati da diverse situazioni di campo (gatti malati, ambienti a diversa prevalenza di FIP) hanno sequenze diverse a carico della proteina N, solitamente non considerata tra le sequenze mutanti dei coronavirus (Battilani et al., 2010). Analisi bioinformatiche fanno ritenere che

alcune delle sequenze isolate possano corrispondere a epitopi immunostimolanti l'immunità cellulo-mediata. Scopo di questa parte della tesi è stato quindi quello di verificare se le diverse sequenze immunogene della proteina N del FCoV possano indurre risposte diverse in leucociti felini, con particolare riferimento alla produzione di perossidi (indicatori indiretti della risposta fagocitaria/macrofagica, come descritto nello studio su leishmaniosi illustrato in precedenza) e di IFN- γ . In particolare si è voluto mettere a punto un sistema in vitro di stimolazione dei leucociti con peptidi immunogeni e verificarne l'applicabilità su sangue di gatto. Per quanto riguarda la valutazione dei perossidi, poi, si è testato un kit diverso da quello utilizzato per la leishmaniosi canina e si è quindi proceduto a una preliminare fase di validazione analitica del kit stesso.

Di seguito è descritto l'approccio sperimentale ed i principali risultati e considerazioni. Questa parte della tesi è stata presentata in forma preliminare al VI congresso AIPVet (n° 7 dell'elenco pubblicazioni) e, per quanto riguarda la sola parte relativa all'IFN- γ , è oggetto di una pubblicazione sulla rivista *Veterinary Microbiology* attualmente in revisione dopo accettazione con "major revision" (n° 20 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e Metodi

Sono stati raccolti 16 campioni di sangue intero, prelevato da altrettanti gatti clinicamente sani o affetti da patologie diverse (vedi risultati) di cui si è valutata anche la sieropositività a FCoV con il metodo sierologico in uso presso il nostro Dipartimento (Paltrinieri et al., 2007a). Sui campioni posti in EDTA è stato eseguito un esame emocromocitometrico con contaglobuli Laser (Sysmex XT2000iV), seguito da verifica al microscopio della formula leucocitaria su striscio di sangue colorato con May Grunwald-Giemsa. Ogni campione è stato poi suddiviso in aliquote da 250 μ l, in numero variabile in funzione del volume di sangue di partenza. Quando possibile sono state preparate 9 aliquote in modo da testare gli 8 peptidi ed un'aliquota di controllo. In caso di volume ridotto, il campione è stato suddiviso in un numero minore di aliquote in modo da testare il controllo negativo ed almeno uno dei peptidi. Ogni aliquota è stata posta in un pozzetto di una piastra ELISA a fondo tondo a cui sono poi stati aggiunti i peptidi messi a punto in precedenza (Battilani et al., 2010) in base alle sequenze nei residui 14, 182 e 198 della proteina N di FCoV (tabella 15). In particolare, per ogni residuo erano state riscontrate sequenze tipiche di virus presenti nelle feci di gatti sani (ceppi "avirulenti"), o di virus presenti in tessuti di gatti con FIP (ceppi "virulenti"). Altre sequenze, invece erano identiche in virus intestinali e tissutali (ceppi "misti"). Ogni peptide è stato utilizzato alla concentrazione di 5 μ g per ogni ml di campione contenente 1×10^6 leucociti/ μ l. La piastra è stata posta ad incubare a 37°C in camera umida in presenza del 5% di CO $_2$.

Residuo	Peptide N°	Nome peptide	Sequenza	ceppi virulenti	ceppi di origine avirulenti
14	1	N14-S	PSKRRGRSN	seven, 419, 420, 453	Trento, Milano
	2	N14-A	PSKSGRSNS		Piacenza
182	3	N182	SNNQNNVEDTIV	seven	Piacenza
	4	N182-453	PNNQNNNVDTIV	Teramo-453	
	5	N182-M	FNNQNNNVEDTI		Piacenza, Bimba e Macchia
198	6	N198-S	KLGVTDKLRS	Seven	
	7	N198-MI	RLGVTSDNKO		Milano
	8	N198A-PC	KLGVTDKQRS	Piacenza, Trento, Milano	Piacenza, Trento, Milano

Tabella 15 Identificativi, sequenze e ceppi di origine dei peptidi utilizzati per le prove in vitro

Dopo un'ora di incubazione la piastra ogni aliquota di sangue è stata trasferita in una provetta eppendorf e centrifugata (3.000g x 8 minuti). Il plasma ottenuto è stato utilizzato per determinare la concentrazione di IFN- γ con metodo ELISA (DuoSet® ELISA, R&D Systems Europe, Ltd.; Abingdon, UK) validato in uno studio precedente (Giordano e Paltrinieri, 2009) e per determinare, in 6 gatti, la concentrazione di perossidi con un kit (Real Time Diagnostic System S.r.l., Viterbo, Italia) basato sulla reazione di Fenton: l'interazione in ambiente acquoso a pH acido, tra H₂O₂ e Fe²⁺ forma radicali ossidrilici ad alto potere ossidante. Tali radicali reagiscono in tampone acido con un cromogeno che produce un colore rosso, proporzionale alla concentrazione di H₂O₂ nel campione, rilevato mediante lo spettrofotometro Cobas Mira sopra citato. La fase di validazione del metodo ha determinato:

- l'imprecisione analitica intra-assay determinata mediante letture ripetute (da 4 a 15) in una singola sessione di lavoro) di un pool di sieri di gatto, seguita dal calcolo del CV.
- l'imprecisione analitica inter-assay determinata mediante letture ripetute, in sessioni di lavoro differenti, dello stesso pool di sieri di gatto, seguita dal calcolo del CV.
- l'influenza della conservazione del campione e/o dalle modalità di conservazione determinata mediante 3 letture consecutive eseguite ogni 60 minuti su due aliquote dello stesso campione conservate l'una in provetta chiusa e l'altra in provette aperte ed esposte all'aria, seguite da calcolo del CV intra- ed inter-assay, e dalla valutazione della differenza tra campioni esposti e non esposti all'aria, mediante test di Wilcoxon.
- l'inaccuratezza analitica, mediante linearità di diluizione (LUD) e confronto tra valori attesi e osservati su un pool di sieri misurato tal quale e diluito al 90%, 80%, 70%, 60%, 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, misurando in parallelo la LUD di un analita a lettura accurata (glucosio) per verificare la correttezza delle diluizioni.
- il lower limit of detection (LLOD) determinato mediante letture ripetute del bianco reattivo, e il lower limit of quantification (LLOQ), determinato valutando la ripetibilità di lettura dei valori bassi ottenuti nella prova di LUD.
- l'influenza degli anticoagulanti, mediante lettura di campioni di plasma e siero degli stessi soggetti, seguita da valutazione statistica delle eventuali differenze riscontrate.

Risultati

I soggetti inclusi nello studio non presentavano alterazioni ematologiche, ad eccezione di modica neutrofilia in 5 casi, lieve linfocitosi con monocitosi in uno e linfopenia in tre. Negli altri 8 gatti l'emogramma era normale,

nonostante in 6 di essi fossero comunque presenti patologie croniche quali lipidosi epatica, neoplasie, malattie gastroenteriche. In 3 soggetti è stato rilevato un titolo anticorpale sicuramente indicativo di infezione da FCoV.

VALIDAZIONE DEL TEST PER LA DETERMINAZIONE DEI PEROSSIDI

La precisione intra-assay ha evidenziato CV variabili tra il 4.17% e il 14.71%, con valori migliori nei campioni analizzati subito dopo il prelievo. La precisione inter-assay, invece, ha evidenziato CV pari al 23,1% e al 24%. I risultati delle prove di stabilità (figura 11) hanno evidenziato che la concentrazione di perossidi tende ad aumentare nel tempo, con differenze statisticamente significative rispetto al valore basale rilevabili già dopo due ore, indipendentemente dal fatto che la provetta sia esposta all'aria o meno.

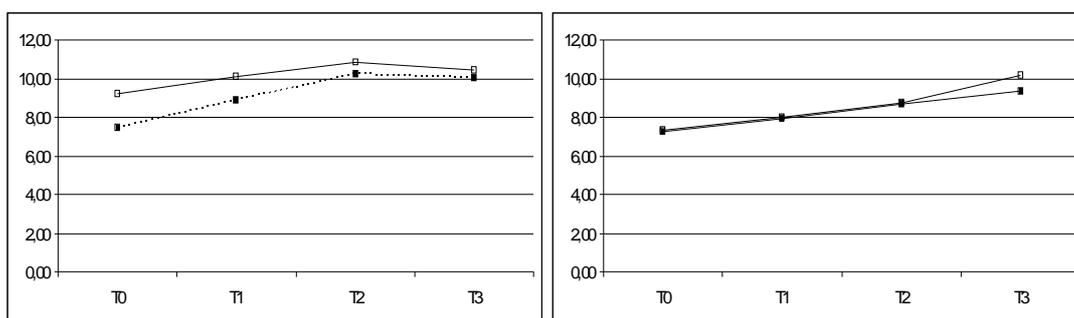


Figura 11 Rappresentazione schematica dei risultati delle prove di ripetibilità a tempi diversi in presenza o assenza di aria: la linea tratteggiata rappresenta i risultati relativi a provette aperte, quella continua i risultati relativi a provette chiuse

I risultati delle prove di LUD (figura 12) hanno evidenziato un'ottima linearità sia per l'analita di riferimento ($P < 0.001$; lack of fit: $P = 1.000$), sia nelle prove di diluizione dei radicali ossidanti (ROS-1 e ROS-2: $P < 0.001$; lack of fit: $P = 1.000$). La precisione diventa insoddisfacente a diluizioni inferiori al 20% (concentrazione di perossidi pari a 1 mg/dL), mentre è accettabile per diluizioni comprese tra 100% e 30%, corrispondenti a valori compresi tra 1,81 e 7,37 mg/dL. Questo è quindi il range di riportabilità ideale e il valore più basso corrisponde al LLOQ. Il LLOD invece è risultato pari a 0.

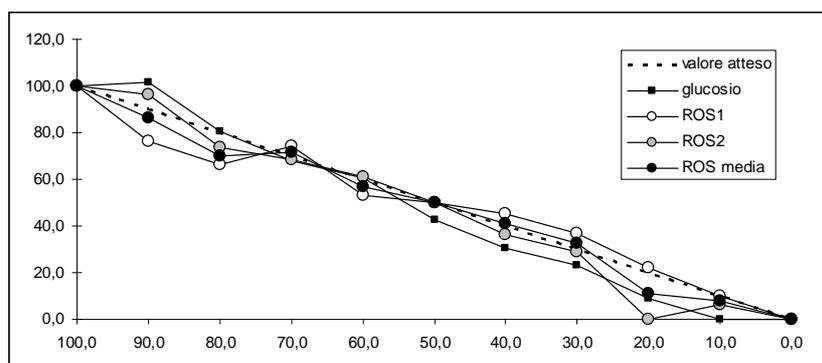


Figura 12 Risultati delle prove di LUD espressi in percentuale rispetto al valore atteso

I risultati ottenuti con anticoagulanti e con siero (tabella 16) erano diversi tra loro, anche se la significatività statistica è rilevabile solo in EDTA forse perché la variabilità gli altri anticoagulanti è stata più elevata.

	NaCITR	EDTA	EPARINA	SIERO
	3,42	3,30	6,87	5,86
	3,32	2,73		5,72
	2,60	2,85	10,07	5,50
MEDIA ± DS (CV)	3,11 ± 0,45* (14,37)	2,96 ± 0,30*, ** (10,15)	8,47 ± 2,26 (26,7)	5,69 ± 0,18 (3,19)

Tabella 16 Risultati delle prove svolte con e senza anticoagulanti. * = P<0.05 vs eparina; ** = P<0.05 vs siero

INCUBAZIONE CON PEPTIDI

I risultati della misurazione di perossidi dopo incubazione (tabella 17), evidenziano che la semplice permanenza del sangue per un'ora in incubatore ha determinato, in 4 gatti su 6, valori molto più bassi di quelli ottenuti nel pool usato in fase di validazione. In due gatti, invece, la concentrazione di perossidi rilevata nel pozzetto di controllo è risultata elevata. Quasi tutti i peptidi, con rare eccezioni, hanno determinato un aumento drastico della concentrazione di perossidi rispetto al campione P0. Gli unici casi in cui l'aumento non è risultato sensibile sono quelli in cui già si partiva da un valore elevato di perossidi. In particolare, le risposte ossidative sono risultate quantitativamente sovrapponibili indipendentemente dal residuo analizzato e dall'origine del peptide (es: ceppi più o meno virulenti).

	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
gatto 1	0,10 ± 0,05	4,24 ± 0,48	nd	5,46 ± 0,87	4,26 ± 0,31	4,44 ± 0,54	nd	nd	4,06 ± 0,38
gatto 2	5,20 ± 0,63	nd	nd	nd	4,79 ± 0,46	nd	nd	nd	Nd
gatto 3	0,40 ± 0,03	3,52 ± 0,01	4,15 ± 0,28	4,04 ± 0,38	4,95 ± 0,40	3,49 ± 0,23	3,45 ± 0,32	3,36 ± 0,57	3,86 ± 0,20
gatto 4	0,52 ± 0,02	8,16 ± 0,24	Nd	nd	nd	nd	nd	nd	Nd
gatto 5	0,40 ± 0,03	9,86 ± 0,13	Nd	7,49 ± 0,11	9,94 ± 2,45	0,33 ± 0,17	nd	nd	10,84 ± 0,95
gatto 6	10,85 ± 0,13	Nd	Nd	12,78 ± 0,03	nd	nd	nd	nd	Nd

Tabella 17 Risultati (in mg/dL) delle prove di determinazione dei perossidi in campioni di sangue incubati in presenza di 8 peptidi immunogeni (da P1 a P8) e del controllo negativo (P0). In tabella è riportata la media di tre letture successive.

I risultati relativi al dosaggio dell'IFN- γ dopo incubazione sono riportati in tabella 18.

gatto	plasma	P0	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8
1	8,98	4,12	2,49		1,41	0,66	0,2			0,15
2	0,29	6,81				4,29				
3	1,73	1,67	0,76	0,33	0,22	0,18	8,55	2,69	1,47	1,75
4	0,89	0,26	0,2							
5		7,77	4,68		3,09	1,65	0,9			0,25
6	0,44	0,14			6,34					
7		4,12	1,65	1,52	0,35	0,16	0,19	0,12	2,62	
8		1,63	1,16	0,98	0,53	0,26	0,25			0,17
9		5,04	4		3,06	1,98	0,98			0,48
10	0,41	0,17	6,02	3,14	2,13	2,2	0,78	0,36	0,49	0,17
11	6,9	5,96	1,92	1,94	0,7	0,3	0,37	0,15	10,72	6,97
12		4,22	2,05	0,47	0,19		0,2	0,15	10,43	
13	4,19	3,07		1,48				2,25		
14	1,04	0,64		0,62				0,44		
15	1,39	0,57		0,47				0,6		
16		3,34		1,15				0,66		

Tabella 18 Valori di interferone (ng/mL) rilevati nei 16 gatti esaminati

I dati in tabella evidenziano che la concentrazione nel plasma è risultata particolarmente variabile, in gran parte sovrapponibile ai valori rilevati in un lavoro precedente (Giordano e Paltrinieri, 2009), con l'eccezione di 3 soggetti, che presentavano valori elevati. Nessuno di questi tre gatti presentava alterazioni ematologiche di rilievo ma erano gatti con patologie croniche (gastroenterica, cardiaca ed epatica).

Nei dieci soggetti in cui l'IFN- γ è stato misurato anche nel plasma non si sono rilevate differenze significative tra i due campioni (plasma = $2,62 \pm 3,06$ ng/mL; P0 = $2,34 \pm 2,52$ ng/mL; P = 0,08) ma in 9 soggetti su 10 il campione P0 ha presentato valori di interferone sensibilmente inferiori a quelli rilevati nel plasma. Eliminando l'unico campione in cui la concentrazione è la differenza diventa altamente significativa (plasma = $2,88 \pm 3,12$ ng/mL; P0 = $1,85 \pm 2,09$ ng/mL; P = 0,004).

Per quanto riguarda i peptidi disegnati sulle sequenze del residuo 14, l'analisi per dati appaiati non ha evidenziato differenze significative, nei 6 casi in cui tutti e 2 i peptidi sono stati misurati nella stessa prova (P0 = $3,03 \pm 2,49$ ng/mL; P1 = $2,49 \pm 1,85$ ng/mL; P2 = $1,21 \pm 0,86$ ng/mL; P = 0,069). Per quanto riguarda il P1, è però rilevabile una tendenza alla diminuzione dei valori, ad eccezione di un caso, rimuovendo il quale, la diviene significativa (P0 = $3,87 \pm 2,35$ ng/mL; P1 = $2,10 \pm 1,45$ ng/mL; P = 0,004). Per quanto riguarda il P2, nei 10 casi in cui si sono misurati sia P0 che P2 è stata rilevata un diminuzione statisticamente significativa (P0 = $2,54 \pm 1,90$ ng/mL; P1 = $1,21 \pm 0,87$ ng/mL; P = 0,048).

L'analisi dei dati ottenuti negli 8 soggetti in cui sono stati testati tutti e tre i peptidi (oltre al P0) evidenzia una significatività statistica (P = 0,018) con tendenza alla riduzione di produzione di IFN- γ in tutti e tre i peptidi (P3 = $1,80 \pm 1,95$ ng/mL; P4 = $1,30 \pm 1,38$ ng/mL; P5 = $1,38 \pm 2,70$ ng/mL) rispetto al P0 ($3,10 \pm 2,49$ ng/mL). L'analisi visiva dei dati sopra riportati evidenzia come la diminuzione maggiore e più costante si verifichi nel P4 che non nel P3 e nel P5, nei quali il valore medio è anche ridotto ma la variabilità individuale è molto elevata.

L'analisi dei dati rilevati nei 3 soggetti in cui sono stati testati, oltre al P0 tutti e tre i peptidi disegnati sul residuo a98 non ha mostrato differenze significative tra i gruppi (P = 0,651), nonostante il valore medio rilevato in presenza dei peptidi P6 ($0,83 \pm 0,96$ ng/mL) e P8 ($1,42 \pm 2,51$ ng/mL) siano sensibilmente inferiori a quelli rilevati nel P0 ($3,10 \pm 2,49$ ng/mL) e quello rilevato in presenza del peptide P7 ($5,15 \pm 5,01$ ng/mL). La variabilità di comportamento in presenza dei diversi peptidi è sempre risultata elevatissima e inoltre la mancanza di significatività statistica è fortemente influenzata dalla bassa numerosità del campione esaminato. L'analisi dei dati relativi ai campioni in cui è stato determinato sia il P0 che uno dei peptidi in esame, però, evidenzia che mentre per il P6 permane la mancanza di significatività statistica rispetto a P, per il quanto riguarda il P7, pur in assenza di una significatività statistica, in 3 dei 5 gatti esaminati si registrano forti aumenti (più di tre volte) mentre negli altri 2 la diminuzione rispetto a P0 è minima. Per quanto riguarda il P8, pur in assenza di significatività statistica, in 4 soggetti la concentrazione di IFN cala moltissimo ($0,26 \pm 0,15$ ng/mL) rispetto al P0 ($4,64 \pm 2,53$ ng/mL): mentre in 3 soggetti (la concentrazione rilevata nel P8 ($2,96 \pm 3,55$ ng/mL) è sovrapponibile a quella rilevata nel P0 ($2,60 \pm 3,00$ ng/mL).

Discussione

Le alterazioni di laboratorio rilevate in 8 gatti erano di modica entità e riferibili a stress acuto (es: paura al momento del prelievo) o cronico piuttosto che a patologie evidenti. Ciò supporta la correttezza dell'inclusione di tali soggetti nello studio, in quanto questo permette di valutare le risposte leucocitarie dei soggetti con patologie croniche solo alla luce di un'eventuale attivazione immunitaria associata a tali patologie e non ad alterazioni del leucogramma effettivamente presenti.

Allo stesso modo, l'analisi sierologica ha permesso di includere nello studio sia soggetti che al momento del prelievo erano probabilmente portatori del virus (i tre gatti sieropositivi) che gatti che non lo erano (i gatti sieronegativi), in quanto le nostre conoscenze sulla cinetica anticorpale (Addie e Jarrett, 2001) ci dicono che esiste una buona correlazione tra sieropositività e attuale presenza del virus nell'organismo.

Il test per la determinazione dei perossidi è preciso e accurato e ha una buona sensibilità analitica, il che permette di interpretare correttamente i risultati ottenuti in una singola sessione di test come nel caso di questo studio. Evidenza però limiti analitici che ne impediscono l'utilizzo clinico, rappresentati dall'interferenza di anticoagulanti (che non influenza questo studio perché tutti i campioni erano stati raccolti con lo stesso anticoagulante e risultavano, quindi, confrontabili tra loro) e dalla ridotta conservabilità nel tempo, forse dovuta a ossidazioni spontanee del campione) che determina un'alta variabilità inter-assay. L'applicazione di questo metodo al modello in vitro testato in questo studio, seppur viziata dal basso numero di osservazioni, suggerisce che la semplice incubazione del sangue riduca la concentrazione di perossidi, forse per esaurimento funzionale delle cellule incubate, tranne in due gatti, uno dei quali però presentava le modiche alterazioni ematologiche sopra citate, mentre tutti i peptidi testati, indipendentemente dalla loro origine (ceppi più o meno virulenti) inducono una forte risposta ossidativa. Si può ipotizzare che questa stimolazione dipenda da effetto diretto dei peptidi sui fagociti o da effetti indiretti dovuti a stimolazione, da parte dei peptidi, dei linfociti T, i quali a loro volta possono attivare i fagociti. Quest'ultimo meccanismo appare più probabile alla luce della predizione della struttura immunogena dei diversi peptidi (Anton et al., 1995).

Per quanto riguarda l'analisi dell'IFN- γ , il riscontro di valori elevati nel plasma di 3 soggetti con patologie croniche suggerisce che in alcune condizioni patologiche il sistema immunitario è cronicamente pre-attivato. La semplice incubazione (P0) induce una diminuzione della produzione di interferone in gran parte dei soggetti. Il motivo per cui in un singolo soggetto si è invece rilevato un notevole aumento della concentrazione di interferone dopo incubazione non è chiaro in quanto tale soggetto era ematologicamente normale e negativo alla sierologia per coronavirus. Anche in questo caso, come nel caso dei risultati nel plasma potrebbe trattarsi di variabilità individuale o di uno stato di priming o preattivazione in vivo per cui anche la sola incubazione ha portato ad una risposta sensibilmente superiore a quella rilevata negli altri soggetti.

I dati riferiti all'incubazione con i peptidi tendono ad evidenziare come due dei tre residui presi in esame (residuo 14 e 182) tutto sommato possano essere considerati coinvolti nella patogenesi della FIP, indipendentemente dalla sequenza che li caratterizza e quindi dal fatto che siano stati riscontrati in soggetti

sintomatici o no (e che quindi siano riferibili o meno a ceppi "virulenti") sia per i peptidi disegnati sul residuo 14 che per quelli disegnati sul residuo 182, infatti, si è osservata prevalentemente una riduzione di produzione di interferone ed in nessun caso l'entità di tale diminuzione è risultata diversa per peptidi differenti. Per quanto riguarda il residuo 198, invece, solo il peptide disegnato sulla sequenza di ceppi virulenti, ha depresso la risposta Th1 riducendo la produzione di interferone, mentre uno ha avuto effetti contrastanti ed uno ha indotto, nella maggioranza dei casi, un sensibile, anche se non statisticamente significativo, aumento della produzione di IFN. Quest'ultimo peptide è stato disegnato sulla base della sequenza di ceppi non virulenti e potrebbe quindi essere coinvolto nella resistenza alla FIP, in quanto i ceppi che lo contengono riescono quantomeno a non deprimere la risposta Th1 se non addirittura ad aumentarla. Le variazioni di cui sopra presentano un'elevata variabilità individuale e nella popolazione felina possono essere presenti gatti iper-responsivi nei quali anche i peptidi che inducono sensibili riduzioni della concentrazione di IFN nella maggior parte della popolazione riescono invece ad indurre aumento di produzione di tale citochina. E' quindi possibile che in gatti per qualche motivo più "pronti" nella risposta immunitaria, verosimilmente per una preattivazione del sistema immunitario specifico, anche ceppi virali particolarmente "virulenti" (in grado cioè di deprimere la risposta immunitaria Th1 nella gran parte dei soggetti con cui entrano in contatto) possono essere ben tollerati grazie all'attivazione di una risposta Th1 apparentemente indipendente dalle caratteristiche molecolari dei ceppi virali.

In conclusione, i dati raccolti in questa parte dello studio hanno portato alla validazione, nel gatto, di un metodo per determinare i perossidi, anche se i risultati di tale validazione non sono risultati soddisfacenti circa una possibile utilità clinica del metodo, che presenta una bassa riproducibilità. E' stato inoltre possibile mettere a punto un metodo in vitro per valutare le risposte cellulari di leucociti felini a peptidi potenzialmente immunogeni di FCoV. Tali peptidi hanno sempre indotto una risposta ossidativa indipendentemente dalla loro origine (ceppi più o meno virulenti) e hanno evidenziato invece risposte differenti per quanto riguarda la produzione di IFN- γ , che sembra essere depressa indipendentemente dalla sequenza di origine per quanto riguarda i peptidi disegnati sul residuo 14 e 182. Per i peptidi disegnati sulla sequenza del residuo 198 si è invece osservato che i peptidi disegnati su sequenze virulente deprimono la risposta Th1 e possono essere coinvolti nella patogenesi della FIP mentre i peptidi disegnati su sequenze virulente o miste aumentano la produzione di interferone e possono essere quindi coinvolti nella resistenza a FIP.

Questi risultati confermano che lo sviluppo della FIP non dipende solo dal ceppo virale o dalla risposta immunitaria dell'ospite, ma dalle interazioni tra proteine virali e risposte dell'ospite. In altri termini, è verosimile che sia la presenza di ceppi provvisti di particolari epitopi in grado di interagire col sistema immunitario a indurre risposte protettive o, al contrario, a facilitare l'immunopatogenesi della FIP. Le caratteristiche e la rilevanza in vivo di queste osservazioni meritano quindi di essere ulteriormente approfondite in futuro.

VALIDAZIONE ANALITICA DI UN METODO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ENZIMA PARAOXONASI (PON1) E INDAGINI PRELIMINARI DEL SUO RUOLO COME PROTEINA DI FASE ACUTA NEGATIVA NEL CANE E NEL VITELLO

La paraoxonasi (PON) è stata inizialmente identificata e studiata per le sue proprietà idrolitiche nei confronti di alcuni insetticidi organofosforati e del gas nervino. In particolare il nome paraoxonasi deriva dalla sua capacità di metabolizzare il paraoxone, un metabolita dell'insetticida parathion.

La paraoxonasi (PON) è una famiglia di enzimi che comprende tre membri: PON1, PON2 e PON 3 (La Du et al., 1999). Nell'uomo la sintesi di PON1 è esclusivamente epatica e nel circolo ematico questa proteina è legata quasi esclusivamente alle lipoproteine ad alta densità (HDL) (Durrington et al., 2001), mentre l'espressione dei geni che codificano per la PON3 sono espressi sia a livello epatico che renale e solo nell'uomo e nel coniglio è stato dimostrato il loro trasporto nel circolo ematico legato all'HDL (Draganov et al., 2000; Reddy et al., 2001). I geni che codificano per la PON2 invece vengono espressi da numerosi tessuti, in particolare dalle cellule associate alla parete vascolare e dai macrofagi, ma contrariamente agli altri membri di questa famiglia la PON2 non viene rilasciata in circolo (Ng et al., 2001).

La PON1 è coinvolta nel processo antiossidante e antinfiammatorio ed esplica queste funzioni mediante tre attività enzimatiche: paraoxonasi, arilesterasi e lattonasi (Billecke et al., 2000). L'azione antiossidativa dipende dall'attività lattonasica ed è rivolta verso le lipoproteine a bassa densità (LDL) responsabili dell'aterosclerosi (Aviram e Rosenblat, 2004). Per quanto riguarda le altre forme la PON2, non entrando nel circolo ematico, esplica la propria attività antiossidante all'interno del citoplasma ritardando lo stress ossidativo cellulare e prevenendo l'apoptosi nelle cellule endoteliali vascolari (Horke et al., 2007). La PON3 è la forma meno studiata, ha anche essa l'attività lattonasica e quindi possiede le stesse attività antiossidanti della PON1, ma è priva dell'attività paraoxonasica (Draganov et al., 2000; Reddy et al., 2001).

Le molecole di HDL hanno proprietà antiossidanti e antinfiammatorie, in particolare inducono la soppressione delle molecole di adesione delle cellule endoteliali indotte dalle citochine (CAM) (Cockerill et al., 1995). È stata dimostrata una stretta correlazione tra i livelli di HDL e la reazione infiammatoria in risposta a stimoli endotossici, l'incidenza e la gravità dei segni clinici e la concentrazione plasmatica di TNF, IL-1, 6 e 8. Inoltre l'espressione della MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1) diventa maggiore nei soggetti con bassa concentrazione di HDL rispetto a quelli con concentrazione normale di HDL (Birjmohun et al., 2007).

L'interazione tra PON1, ossidazione lipidica e processo infiammatorio è riassunta in figura 13. In sintesi: la MCP-1 regola la migrazione dei monociti nei tessuti e la loro differenziazione in macrofagi (Simpson et al., 2003). Sono sufficienti minime quantità di LDL ossidate per stimolare la produzione di MCP-1. *In vitro* la PON1, proteggendo le LDL dall'ossidazione, inibisce indirettamente la produzione di MCP-1 stimolata da LDL ossidate (Mackness et al., 2004). La PON1 inoltre aumenta l'efflusso di colesterolo dai macrofagi e il corrispondente uptake da parte delle HDL, riducendo il rischio di aterosclerosi (Rosenblat et al., 2005).

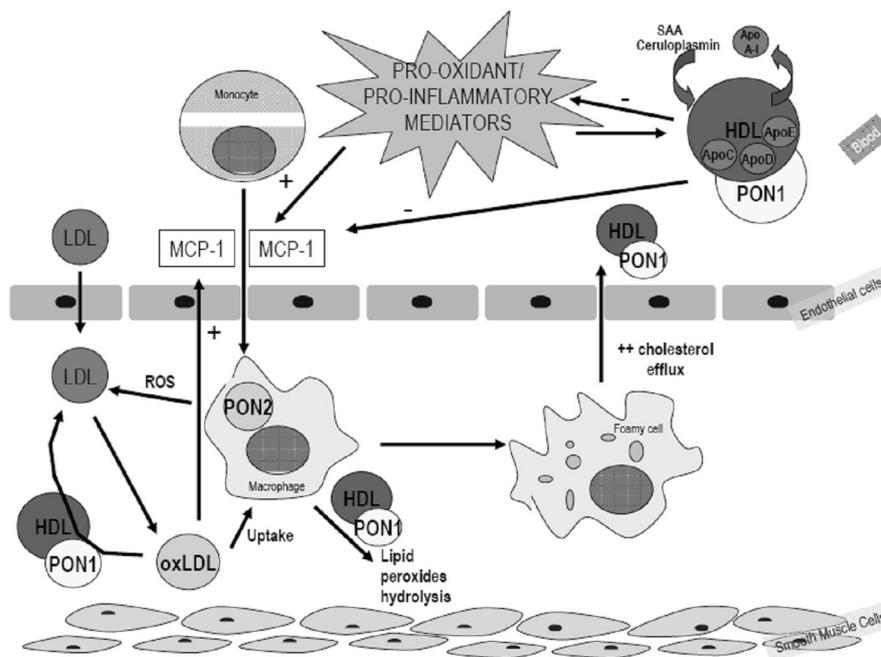


Figura 13 Schema dell'interazione tra paraoxonasi, molecole infiammatorie e ossidazione lipidica

L'azione antiossidante della PON1 è strettamente correlata con il ruolo antinfiammatorio. La risposta di fase acuta scatenata dai processi infiammatori e infettivi, induce sia un'inattivazione delle molecole di PON1 già sintetizzate che un'inibizione della loro sintesi epatica (Feingold et al., 1998). Per tale motivo nell'uomo la PON1 è considerata una proteina di fase acuta negativa. Con la diminuzione dell'attività della PON1 nel siero viene a mancare anche la protezione verso i radicali ossidanti che aggravano il processo infiammatorio.

Durante la risposta di fase acuta le proprietà e la composizione delle molecole di HDL vanno incontro a modificazioni. Tra le proteine di fase acuta, la CRP, la SAA e la ceruloplasmina sono quelle che interagiscono con le lipoproteine: la CRP si lega principalmente alla apolipoproteina B, mentre l'SAA e la ceruloplasmina aderiscono alle molecole di HDL (Khovidhunkit et al., 2000). La PON1 necessita del legame con l'HDL per esplicare la sua attività e le alterazioni della molecola di HDL influenzano questa attività. Durante il processo infiammatorio le molecole di HDL perdono il loro contenuto di apolipoproteine A-1, di colesterolo esterificato e molti degli enzimi associati all'HDL inclusa la PON1 che perde così le proprie capacità antiossidanti. All'interno della molecola di HDL viene sostituita principalmente dalla SAA (Van Lenten et al., 1995).

Nell'uomo la diminuzione di attività della PON1 funge da marker diagnostico, prognostico e da fattore di rischio in numerose patologie. Le patologie cardiovascolari (Chait et al., 2005) sono le più studiate dato il ruolo della PON1 nella prevenzione della formazione dell'ateroma, ma numerosi studi riguardano anche l'insufficienza epatica cronica (Marsillach et al., 2010), il diabete (Mackness et al., 2006) e la sepsi (Novak et al., 2010).

Mentre per l'uomo gli studi che coinvolgono la PON1 sono sempre maggiori, se si escludono gli animali da laboratorio in letteratura è presente un numero limitato di lavori svolti in medicina veterinaria. La PON1 è stata indagata nel bovino durante diversi momenti della gravidanza perché la fase di asciutta che precede il parto è

un momento ad alto rischio per lo sviluppo di patologie metaboliche e riproduttive e sembra che una delle possibili cause sia da attribuire allo stress ossidativo (Turk et al, 2005). Quindi ipotizzando un ruolo protettivo della PON1 nei confronti dell'ossidazione lipidica anche nel bovino, è stata valutata la sua attività ed è stato dimostrato che nelle vacche, durante il periodo di asciutta, l'attività della paraoxonasi è significativamente minore rispetto alle bovine in lattazione e tale diminuzione è correlata con la diminuzione della concentrazione di HDL che viene registrata in concomitanza. Da questi risultati si può quindi ipotizzare che nel bovino l'attività della PON1 è simile a quella riscontrata nell'uomo e che anche in questa specie conferisce la protezione dai radicali ossidanti. In un altro studio (Bionaz et al., 2007), la paraoxonasi è stata confrontata in diversi momenti della lattazione e della gravidanza con le altre proteine di fase acuta del bovino (come l'aptoglobina) e il comportamento biologico della PON1 è stato analogo a quello di proteina di fase acuta negativa riportato nell'uomo. Tuttavia la misurazione dell'attività della PON1 è stata effettuata senza informazioni su precisione e accuratezza analitica e in molti casi è stata misurata in campioni di plasma invece che nel siero, anche se l'attività della PON1 è Ca^{++} dipendente e la maggior parte degli anticoagulanti agisce chelando il Ca^{++} .

Per quanto riguarda il cane invece l'attività della paraoxonasi non è mai stata validata o analizzata in nessuna condizione fisio-patologica. Sebbene per il cane esistano numerose proteine di fase acuta, comunemente usate nella pratica clinica, manca attualmente una proteina di fase acuta negativa rapida. Le proteine di fase acuta si dividono in positive e negative, come precedentemente spiegato, e in rapide o "lente" a seconda del tempo che trascorre dallo stimolo infiammatorio al cambiamento di concentrazione ematica. Le proteine di fase acuta più usate sono positive e rapide, perché consentono di monitorare il reale andamento del processo infiammatorio. Tuttavia tali proteine riflettono soprattutto i cambiamenti delle fasi più acute, ma il loro potere diagnostico diminuisce nella valutazione di stadi subacuti. Per tale motivo l'utilizzo di un rapporto tra proteine di fase acuta positive e negative rapide e lente potrebbe essere risolutivo. Tuttavia, al momento, non è stata identificata ancora una proteina di fase acuta negativa rapida nel cane e la PON1 sembra il candidato ideale. Pertanto lo scopo di questo lavoro è duplice: da una parte validare un metodo per la misurazione della PON1 nel cane e successivamente valutare la capacità del test di differenziare gli animali sani da quelli malati, in particolare cani affetti da processi infiammatori acuti dimostrati dall'aumento della CRP.

Il secondo obiettivo del lavoro è quello di indagare l'attività della PON1 nei vitelli, dato che la setticemia è una delle cause principali che porta a morte i neonati e l'aptoglobina (principale APP nei bovini) è difficilmente misurabile con metodi automatizzati. Dopo un primo step costituito dalla validazione analitica, si è proceduto con la valutazione dell'attività della PON1 dal momento immediatamente dopo la nascita fino a 3 settimane e in un gruppo fino a 4 mesi, per determinare l'andamento della PON1 a seconda dell'età considerando che la concentrazione di molte proteine di fase acuta è influenzata proprio dall'età dell'animale. Infine la PON1 è stata valutata in bovini sani e malati per valutare il potenziale diagnostico di questo enzima.

Entrambi i lavori sono stati presentati sotto forma di presentazione orale all'VIII European Colloquium on Acute Phase Protein (N. 16 e 17 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e metodi

Metodo di valutazione della PON1 e validazione analitica

L'attività della PON1 è stata misurata automatizzando il metodo proposto da Ferrè et al. (2002). Il metodo si basa sul dosaggio della quantità di paraoxone idrolizzata al minuto, formando p-nitrofenolo.

Nel bovino la validazione analitica è stata eseguita secondo lo schema riportato nell'introduzione di questa tesi. In particolare la ripetibilità intra- e inter-assay sono state valutate su 3 pool di sieri con bassa, media e alta attività di PON1. L'accuratezza è stata valutata mediante diluizioni scalari del pool con attività di PON1 elevata e anche mediante spiking recovery test.

Anche nel cane la validazione analitica è stata eseguita secondo il modello riportato in precedenza valutando la precisione mediante 20 misurazioni ripetute su 8 campioni di sangue di cane, e l'accuratezza mediante diluizioni scalari su 4 campioni di sangue. Per completare le informazioni riguardo l'attività della PON1, è stata eseguita anche una prova di conservabilità dividendo il siero in 3 differenti aliquote: una da conservare a temperatura ambiente (RT), refrigerate a 4°C e l'ultima congelata a -20°C. I campioni a temperatura ambiente sono stato misurati immediatamente dopo il prelievo e poi dopo 12, 24, 48 e 72 ore. I campioni refrigerati sono stati letti in concomitanza con i precedenti, ma con una lettura ulteriore dopo una settimana dal prelievo. Infine i campioni congelati sono stati misurati anche settimanalmente fino a un mese e poi dopo 6 mesi.

Definizione degli intervalli di riferimento e ruolo diagnostico nel vitello

Per stabilire le differenze di attività della PON1 nei vitelli a seconda dell'età, è stato prelevato il sangue da 9 vitelli dopo 10, 20 e 30 minuti; 3, 6, 12 e 24 ore; 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 14, 17, 21 giorni dal parto; da 7 vitelli di età compresa tra 28 a 120 giorni e da 45 vacche adulte non gravide e non in lattazione. Per il confronto tra animali sani e malati sono stati selezionati 45 vitelli sani con differenti età e 17 vitelli affetti da processi infiammatori, confrontando i risultati nei gruppi a parità di età.

Correlazione con i livelli di CRP

Dopo la validazione analitica, per ottenere dati preliminari sul potenziale ruolo diagnostico della PON1 nel cane, è stato selezionato un gruppo di 76 cani costituito da animali sani e da cani con processi infiammatori. In tutti gli animali è stata misurata la CRP, principale proteina di fase acuta positiva del cane il cui incremento in circolo è visibile poco dopo lo stimolo infiammatorio. Gli stessi campioni sono stati utilizzati per la valutazione dell'attività della PON1, che essendo una proteina di fase acuta negativa rapida, dovrebbe avere un comportamento opposto. I risultati sono poi stati confrontati mediante correlazione di Spearman.

Risultati

Analisi nel bovino

I risultati della ripetibilità intra-assay mostrano un CV molto basso per tutte e tre le diverse concentrazioni di

PON1: 2.3, 1.9 e 5.3% per il pool a bassa, media e alta concentrazione, rispettivamente.

La ripetibilità inter-assay dimostra performances sovrapponibili a quelle intra-assay, con CV pari al 3.4, 2.5 e 2.7% per il pool a bassa, media e alta concentrazione, rispettivamente.

In entrambi i casi la precisione non è risultata correlata al livello di attività media (figura 14).

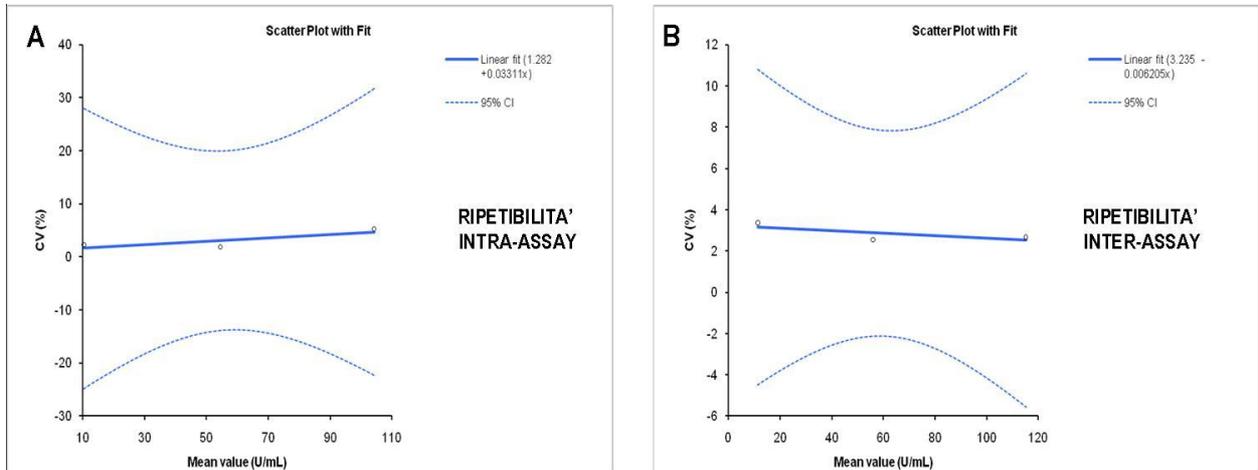


Figura 14 Correlazione di Spearman tra i valori medi di PON1 nei vitelli e i rispettivi CV ottenuti dalla ripetibilità intra-assay (A) e inter-assay (B)

L'accuratezza, valutata mediante diluizioni scalari (figura 15A) e spiking recovery test (figura 15B), ha evidenziato alti coefficienti di correlazione tra risultati attesi e ottenuti ($p < 0.001$ $r^2 = 0.99$ e $p < 0.001$ $r^2 = 0.994$).

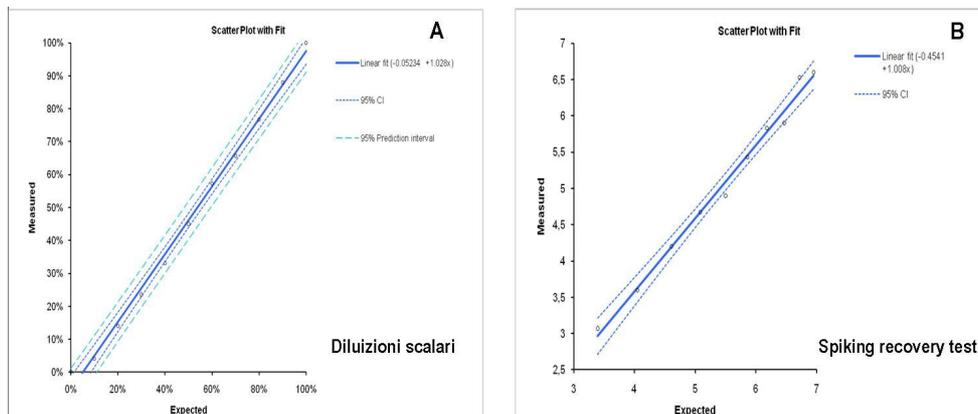


Figura 15 Correlazione tra i valori di PON1 attesi e ottenuti per la valutazione dell'accuratezza

Considerando l'incidenza dei processi infiammatori settici nei vitelli neonati, la selezione di animali per la seconda fase del processo di validazione diagnostica è stata fatta selezionando animali neonati e monitorati nel tempo per il periodo considerato a rischio. I risultati hanno dimostrato un incremento dell'attività della PON1 nei vitelli, proporzionale all'aumento dell'età. L'aumento è risultato significativo per quasi tutti i tempi monitorati (tabella 19). In particolare differenze significative sono state rilevate tra i valori medi misurati dei vitelli di 3 giorni, in confronto ai valori di PON1 nei campioni prelevati 10 minuti dopo il parto. La stessa

differenza è osservabile tra i vitelli di 4 giorni confrontati con quelli di 5 e così via per tutti i tempi di prelievo riportati in tabella confrontati con la misurazione antecedente.

	10 min	3 gg	4gg	5 gg	6 gg	7 gg	10 gg	14 gg	17 gg	21 gg
Media ± SD U/mL	3.5±1.2	4.6±1.7	5.9±2.6	6.0±2.2	7.3±2.9	7.6±3.5	10.5±5.0	15.7±7.5	28.9±14.2	40.4±17.0
Min-Max U/mL	2.3-5.1	2.1-7.4	2.8-9.4	3.9-10.4	4.1-11.8	4.0-12.6	4.9-17.9	7.5-28.2	4.6-49.4	16.2-61.4
Statistica	P<0.001 [§]									

Tabella 19 Valori medi dell'attività PON1 nei diversi tempi di prelievo. §differenze significative tra due misurazioni contigue

Il gruppo di animali di età compresa tra 28 e 120 giorni di vita non ha mostrato differenze significative rispetto ai vitelli di 21 giorni (media±SD a 21 giorni: 46.50±16.9 U/mL; media±SD a 28-120 giorni: 46.50±11.1 U/mL). Le differenze diventano invece significative (p<0.001) quando vengono confrontati i valori medi dei neonati (0-21 giorni) e degli animali giovani (28-120 giorni) con quelli degli adulti che hanno un'attività PON1 decisamente superiore rispetto agli altri gruppi (media±SD: 88.03±22.7 U/mL) (figura 16).

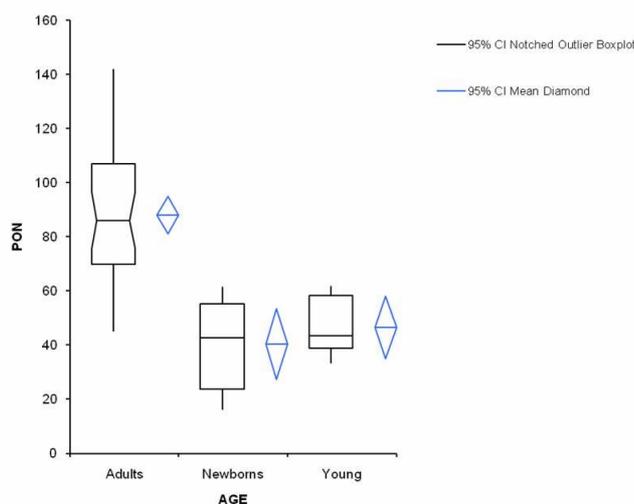


Figura 16 Confronto dei valori di PON1 nei vitelli in base all'età

Alla luce delle differenze sopra evidenziate, il confronto tra sani e malati è stato eseguito separatamente in funzione dell'età dei soggetti malati. In particolare sono stati confrontati tra loro i risultati rilevati in vitelli sani e malati di 7 giorni, sani e malati di 10 giorni e sani e malati di età compresa tra 28 e 120 giorni (figura17). Nello specifico sono stati confrontati 5 vitelli di 7 giorni di età con processi infiammatori con 20 vitelli sani di pari età. Il valore medio di PON1 nei vitelli malati (media±SD: 3.1±1.42 U/mL) è risultato significativamente (p<0.01) più basso rispetto a quello del gruppo di sani (media±SD: 8.9±5.16 U/mL). Il gruppo di vitelli di 10 giorni di età era costituito da 4 vitelli con processi infiammatori e 10 sani: il confronto non ha rilevato differenze significative tra i due gruppi (media±SD: 12.9±8.82 U/mL e 10.4±3.24 U/mL, gruppo sano e malato, rispettivamente). L'ultimo gruppo era costituito da animali di 28-120 giorni) di cui 15 sani e 8 malati. Dal confronto sono emerse

differenze significative ($p < 0.01$) tra il valore dei controlli che ha mostrato valori maggiori (media \pm SD: 42.8 \pm 14.75 U/mL) e quello degli animali con processo infiammatorio (media \pm SD: 24.5 \pm 13.44 U/mL).

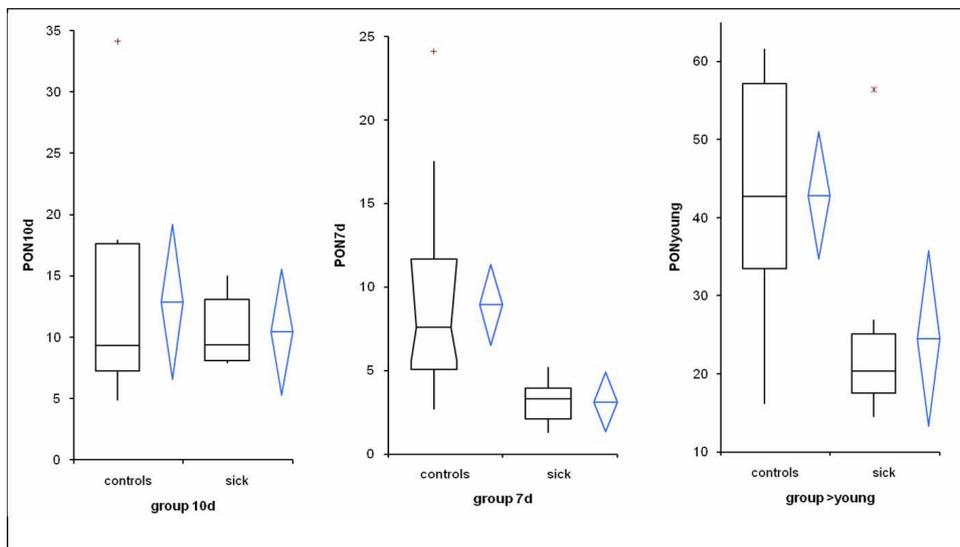


Figura 17 Confronto tra vitelli sani e malati eseguito in funzione dell'età

Analisi nel cane

Per quanto riguarda i risultati della validazione analitica del cane, la ripetibilità intra-assay è stata valutata mediante ripetizioni consecutive su 8 campioni ed ha dimostrato un CV molto basso (CV medio \pm SD: 2.2 \pm 0.6%) a prescindere dalla concentrazione di PON1 come dimostrato dalla correlazione di Spearman ($p=0.888$, $r^2=-0.16$) che evidenzia come sia a bassi valori che ad alti di PON1 il CV rimane uguale (figura 18). Anche la ripetibilità inter-assay ha dimostrato un elevato livello di precisione (CV medio \pm SD: 5.8 \pm 0.4%)

L'accuratezza è stata valutata su 4 campioni mediante diluizioni scalari e i risultati hanno dimostrato un'eccellente linearità anche con diluizioni elevate, dimostrando l'assenza di errori proporzionali (figura 19).

Per quanto riguarda le prove di conservabilità (figura 20) nei campioni conservati a temperatura ambiente (RT) si può osservare una tendenza all'aumento nel tempo, anche se non significativo ($p=0.08$).

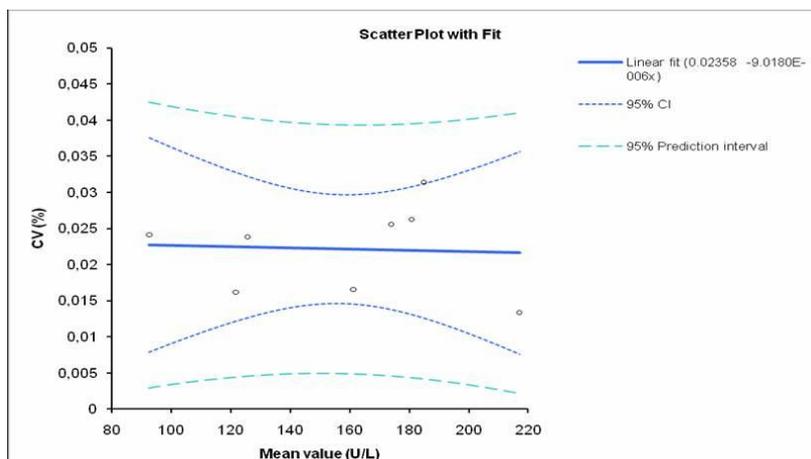


Figura 18 Correlazione di Spermann tra valori medi di PON1 nel cane e i rispettivi CV

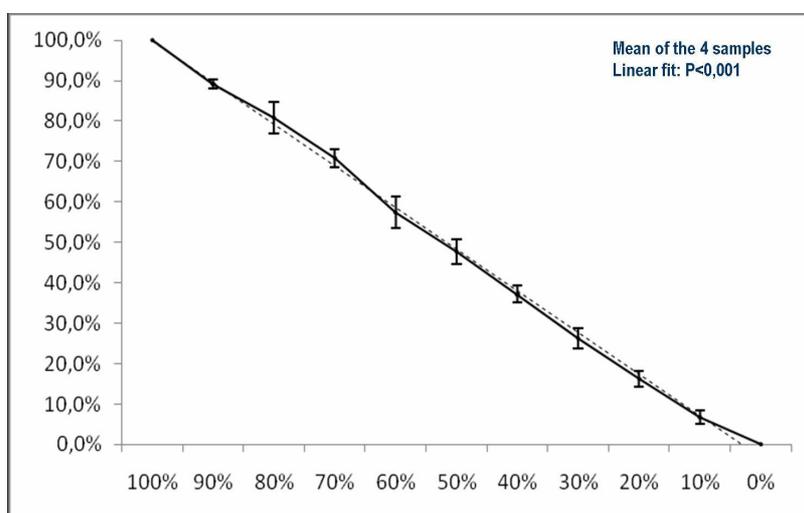


Figura 19 Diluizioni scalari per la valutazione dell'accuratezza nel cane

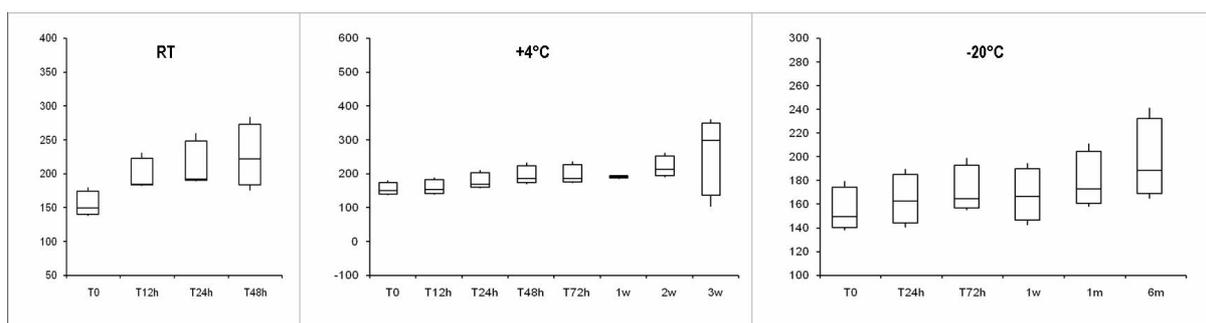


Figura 20 Risultati delle prove di conservabilità dell'attività paraoxonase nel cane a seconda del tempo e della temperatura di conservazione

Anche i campioni refrigerati (+4°C) non dimostrano differenze statisticamente significative ($p=0.08$), nonostante si possa vedere una tendenza all'aumento a partire dalle 48 ore di conservazione. I campioni congelati sono gli unici che hanno mostrato un incremento significativo ($p=0.014$) dell'attività della PON1 nel tempo, sebbene i valori medi rimangano molto simili nel primo mese per poi aumentare costantemente fino a 6

mesi. Tuttavia anche in questo caso è presente un'elevata variabilità individuale probabilmente a causa del basso numero di campioni utilizzato.

Una volta superata la validazione analitica, è stato valutato il rapporto tra la CRP e la PON1 in 76 cani, di cui una parte affetta da processi infiammatori (nei quali si presume una concentrazione elevata di CRP e una bassa attività paraossidasica) e una parte di soggetti sani (per i quali ci aspetta una concentrazione di CRP bassa e una attività della PON1 più elevata). La correlazione di Spearman ha dimostrato una correlazione negativa significativa ($p=0.015$; $r^2=-0.28$). Per meglio indagare questa correlazione i soggetti sono stati divisi in tre gruppi a seconda della concentrazione di CRP: bassa, alta e molto alta (più del triplo del cutoff) e sono stati confrontati con i corrispettivi livelli di PON1 dimostrando differenze statisticamente significative ($p=0.01$) solo nel gruppo con CRP molto alta, nei quali la PON1 era significativamente più bassa. Nessuna differenza significativa invece è stata rilevata tra gli altri gruppi (figura 21).

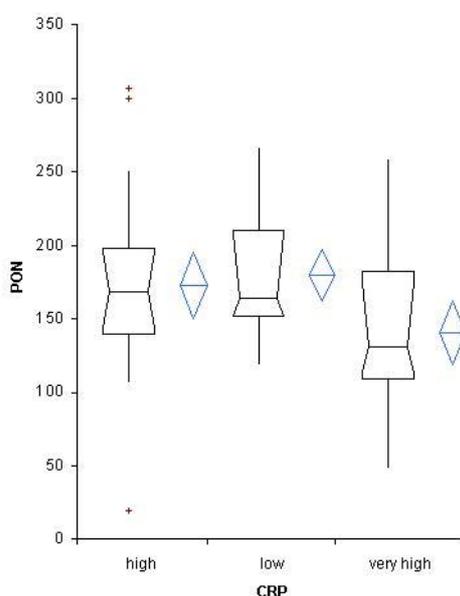


Figura 21 Confronto tra gruppi con differenti concentrazioni di CRP

Discussione

Sulla base di questi risultati il metodo riportato da Ferrè e colleghi nel 2002, modificato per adattarlo ad un sistema di misurazione automatizzato dimostra un'ottima precisione e un'eccellente accuratezza.

Sulla base di questi risultati emerge quindi che il metodo usato per misurare l'attività della PON1 è eccellente sia in termini di precisione che di accuratezza sia nel cane che nel bovino anche se nel cane lo studio per la conservabilità ha indicato che la temperatura ambiente induce un aumento dell'attività della PON1 dopo 48 ore. Tuttavia graficamente è già visibile un aumento dell'attività già dopo 24 ore e la mancanza della significatività statistica potrebbe dipendere dall'elevata variabilità individuale o dal numero ridotto di soggetti

coinvolti in questa fase dello studio. E' comunque consigliabile non conservare i campioni a temperatura ambiente per più di 24 ore se si vuole misurare l'attività paraoxonasi, ma refrigerare o congelare i campioni. L'attività della paraoxonasi nel vitello sembra essere influenzata dall'età e quindi è necessario identificare degli intervalli di riferimento suddivisi in base ai range di età rilevati in questo studio. L'utilizzo di range specifici per le diverse fasce di età è particolarmente importante alla luce del fatto che i neonati hanno valori molto più bassi degli adulti, e, visto che si suppone un ruolo di proteina di fase acuta negativa per la PON1, se usassimo i range di riferimento degli adulti, potremmo erroneamente diagnosticare una bassa attività paraoxonasi in animali che in realtà presentano valori bassi solo perché molto giovani. Il motivo per cui i valori sono così bassi nel neonato non può essere desunto dai risultati di questo studio ma è verosimile che giochi un ruolo importante il diverso metabolismo lipidico del neonato rispetto all'adulto, vista la stretta relazione tra metabolismo lipidico e paraoxonasi, e considerato il fatto che nel vitello, in particolare neonato, la sollecitazione metabolica cui sono sottoposti i bovini adulti non è ancora sviluppata. A questo proposito, in futuro sarà importante indagare non solo il rapporto tra PON1 e altre proteine infiammatorie del bovino (aptoglobina in particolare) ma anche quello tra PON1 e quadro lipidico e lipoproteico.

Indipendentemente da tali considerazioni, quando l'attività della PON1 di animali sani e malati viene valutata in funzione del range di età, si è potuto verificare che essa è risultata diminuita nei soggetti affetti da processi infiammatori e questo suggerisce che nel bovino, analogamente all'uomo, la PON1 si comporta come proteina di fase acuta negativa rapida data la sua diminuzione precocemente rispetto all'albumina. Inoltre questo metodo risulta essere veloce da eseguire ed economico, due requisiti che possono essere essenziali per introdurlo nei pannelli di esame di base utilizzati nel monitoraggio sanitario degli animali in produzione.

Anche nel cane la PON1 sembra comportarsi come una proteina di fase acuta negativa, vista la sua correlazione negativa con la CRP. Dai dati prodotti in questo studio preliminare non è possibile confermare che nel cane si tratti a tutti gli effetti di una proteina di fase acuta negativa rapida, diminuendo velocemente nelle fasi acute della risposta infiammatoria, in quanto i campioni oggetto di questo studio non erano riferiti ad un'osservazione longitudinale (es: campioni ripetuti in corso di infiammazione). E' inoltre necessario approfondire questo studio anche analizzando l'attività della PON1 in relazione a specifiche patologie, magari in correlazione con i radicali ossidanti e le lipoproteine associate alla paraoxonasi che influenzano la sua attività. Inoltre è necessario stabilire i valori fisiologici nel cane per determinare un cut-off o degli intervalli di riferimento che possano aiutare nell'interpretazione dei risultati di questo test.

OBIETTIVO 3 - VALIDAZIONE ANALITICA E DIAGNOSTICA DI MARKER DI IPERTENSIONE NELLE PATOLOGIE CARDIACHE E RENALI DEL CANE: OMOCISTEINA ED ENDOTELINA-1

FISIOPATOLOGIA DELL'IPERTENSIONE

L'ipertensione, definita come l'aumento della pressione arteriosa sistemica, può essere di origine primaria (essenziale o idiopatica), o secondaria. Mentre nell'uomo la forma riscontrata più frequentemente è quella primaria, nel cane e nel gatto prevalgono le forme secondarie che si verificano quando una patologia altera più fattori fisici o neuroendocrini che regolano la pressione ematica. In particolare nel cane e nel gatto esistono alcune patologie che possono essere associate all'ipertensione: patologie renali (insufficienza renale cronica, glomerulonefrite, amiloidosi, glomerulo sclerosi, pielonefrite) che agiscono sulla pressione sistemica tramite l'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone (RAA) e il rilascio di fattori di crescita, e cardiopatie quali l'insufficienza cardiaca cronica che è associata al rilascio di catecolamine e all'attivazione del sistema RAA. A prescindere dalla causa scatenante, l'ipertensione di solito riflette la progressione della patologia. Per questo motivo, può essere utile, dal punto di vista clinico, identificare markers che riflettano l'andamento della patologia sia per le lesioni specifiche dell'organo colpito, ma che riflettano anche le ripercussioni sistemiche che ne derivano. A tale scopo, abbiamo indagato due molecole: l'omocisteina (Hcy) e l'endotelina 1 (ET-1) che, nell'uomo, vengono usate come marker soprattutto nel monitoraggio della terapia, come fattore prognostico e di rischio per patologie cardiovascolari e renali, entrambe causa di ipertensione secondaria.

OMOCISTEINA

L'omocisteina (Hcy) è un aminoacido solforato non essenziale derivato dal metabolismo della metionina. Il metabolismo dell'Hcy è strettamente correlato alla disponibilità di folati, vitamina B₁₂ e B₆ nella dieta. Infatti questa rappresenta una delle cause di iperomocisteinemia (HHcy).

In medicina umana è stata dimostrata la correlazione tra iperomocisteinemia e insufficienza cardiaca cronica (Blacher et al., 1999; Cooke et al., 2000; Ventura et al., 2001). L'aumento di concentrazione di Hcy è considerato un fattore di rischio, in quanto è associato a un aumento della mortalità nei pazienti cardiopatici con valori di Hcy più elevati (Ueland et al., 2001; Ventura et al., 2001; Vasan et al., 2003). Hermann et al. (2005) hanno dimostrato che l'HHcy non solo è correlata all'insufficienza cardiaca, ma anche alla gravità della patologia stessa, pertanto la concentrazione di Hcy ematica può essere un ottimo indice prognostico, oltre che un indicatore di rischio. Non è però ancora stato chiarito se l'iperomocisteinemia sia meccanicamente coinvolta nell'insufficienza cardiaca o sia solo un indicatore di rischio senza alcun effetto diretto sul miocardio. Il meccanismo attraverso il quale l'Hcy provoca il danno vascolare non è ancora stato chiarito, ma le possibili ipotesi includono un danno ossidativo all'endotelio vascolare, un potenziale trombotico alterato a livello di endotelio, un aumento della coagulabilità e una diminuzione della produzione di ossido nitrico (NO). L'ossido

nitrico è essenziale per il normale tono vasodilatatorio ed inibisce le endoteline e l'aggregazione e l'adesione piastrinica, diminuisce la proliferazione della muscolatura liscia dei vasi e rilassa l'endotelio vascolare.

Numerose indagini hanno dimostrato che la presenza di insufficienza renale concomitante a quella cardiaca è uno dei maggiori fattori di rischio per la sopravvivenza dei pazienti (Dries et al., 2000; Hillege et al., 2000; Mahon et al., 2002; Bibbins-Domingo K et al., 2004; Shlipak and Massie, 2004; Shlipak et al., 2004).

A prescindere dal fatto che l'insufficienza renale sia o meno associata a quella cardiaca, è stata dimostrata una correlazione tra insufficienza renale cronica e HHcy, specialmente negli stadi finali della patologia (van Guldener e Stehouwer, 2003). I meccanismi che possono spiegare l'HHcy nei pazienti affetti da insufficienza renale sono molteplici. Tuttavia considerando che l'escrezione di Hcy è esclusivamente renale e che la perdita di funzionalità renale genera una corrispondente diminuzione della GFR, è plausibile che l'iperomocisteinemia dipenda da una ridotta escrezione renale di Hcy (Guttormsen et al., 1997). Tra le altre possibili cause ci sono fattori renali come uno squilibrio tra escrezione renale e/o metabolismo tubulare dell'omocisteina (Guttormsen et al., 1997; Stam et al., 2004; Obeid et al., 2005) e fattori extra renali come carenze vitaminiche secondarie (ad esempio durante emodialisi), cause genetiche e alterato metabolismo dell'Hcy (Friedman et al., 2001).

Per quanto riguarda la relazione tra Hcy e pressione sistemica non è ancora stato chiarito se l'HHcy sia la causa o l'effetto dell'ipertensione. Tuttavia fisiologicamente l'Hcy può indurre ipertensione mediante l'aumento della costrizione arteriolare, del riassorbimento di sodio dal rene, dell'attività del sistema nervoso simpatico, dell'attività del sistema renina-angiotensina-aldosterone e della rigidità arteriosa.

ENDOTELINA 1

L'endotelina 1 (ET-1) è un potente vasoconstrictore, che ha il ruolo di mantenere la resistenza vascolare basale, di favorire la proliferazione cellulare e il rimodellamento vascolare. È l'isoforma maggiormente prodotta dalle cellule del mesangio e la maggiormente attiva a questo livello. L'endotelina -1 viene prodotta dal peptide "prepro ET-1" che dà origine al precursore denominato big ET-1 (Suzuki et al., 1992). ET-1 agisce a livello locale in maniera autocrina e paracrina (Biondo et al., 2003; Barton e Yanagisawa, 2008). La sua produzione viene stimolata da dilatazione vascolare, ischemia e da diverse molecole come: angiotensina II, ADH, citochine, fattori di crescita, ROS e trombina; il suo rilascio è invece inibito dalle prostacicline, dal peptide natriuretico atriale e dall'ossido nitrico (Bender e Klabunde, 2007). L'endotelina matura è ben conservata nelle diverse specie. Infatti gli anticorpi anti-ET delle altre specie di mammiferi possono essere efficacemente utilizzati per la determinazione dell'ET-1 nel cane (Biondo et al., 2003). Viceversa la struttura del precursore big ET-1 risulta poco conservata. Tuttavia uno studio di validazione di Schellenberg et al. (2008) ha dimostrato la cross-reattività degli anticorpi anti-big ET-1 disegnati per la molecola umana con la molecola del cane.

L'azione della molecola di endotelina si esplica attraverso il suo legame con specifici recettori, detti ET-R_A ed ET-R_B accoppiati alla proteina G e situati sulle cellule endoteliali e sulle fibrocellule muscolari lisce (Yanagisawa et al. 1988; Davenport, 2002). L'affinità per tali recettori è maggiore per l'ET-1, che rappresenta

la forma più comune di endotelina prodotta (Levin, 1995; Levin, 1996; Biondo et al. 2003). In seguito al legame dell'endotelina ad ET-R_A viene esplicata un'importante azione di vasocostrizione e di crescita cellulare; al contrario, il legame con ET-R_B sulle cellule endoteliali inibisce queste funzioni. Questo recettore è anche detto "clearance receptor" poiché evita l'accumulo di endotelina nei tessuti, in particolar modo a livello polmonare (Lusher e Barton, 2000; Barton e Yanagisawa, 2008). L'endotelina esplica differenti funzioni nell'organismo:

- Nel sistema vascolare permette, tramite i recettori ET-R_A, il mantenimento di un tono vascolare basale, ed è coinvolta nello sviluppo di patologie vascolari in corso di ipertensione e aterosclerosi.
- A livello cardiaco esercita un'azione cronotropa positiva ed incrementa la contrattilità cardiaca e aritmogena nel momento di rimodellamento miocardico successivo a scompenso cardiaco.
- Nel polmone regola il tono dei bronchioli, e la proliferazione dei vasi delle vie aeree e, a causa di queste funzioni, è responsabile dello sviluppo di ipertensione polmonare.
- A livello renale regola l'escrezione di acqua e sodio, coadiuvando il controllo renale dell'equilibrio acido base. Di contro però accelera lo sviluppo di glomerulo-sclerosi.
- Nel sistema nervoso centrale modula i centri cardiaci e respiratori, il rilascio di ormoni, e contribuisce allo sviluppo dei neuroni del sistema nervoso simpatico.
- E' stato segnalato il suo ruolo anche in altri tessuti ed organi come la cute, il fegato, la prostata, l'apparato muscolo scheletrico, il sistema riproduttivo e il sistema immunitario; ed è infine coinvolta nell'omeostasi del glucosio (Barton e Yanagisawa, 2008).

L'identificazione dell'ET-1 come vasocostrittore e del suo rilascio da parte dell'endotelio permette di correlarla alla patogenesi di ipertensione e patologie vascolari. I suoi effetti sono confermati dall'aumento rilevato in casi di ipertensione e dall'azione antiipertensiva di antagonisti dei suoi recettori (Schiffrin, 1999; Barton e Lusher, 1999, Barton e Kiowski, 2001). In condizioni fisiologiche il suo ruolo è quello di regolatore del flusso ematico, mentre in condizioni patologiche essa può indurre contrazione di muscolatura liscia e proliferazione cellulare in quanto viene sovra espresso il suo gene (Schiffrin et al., 1997; Schiffrin, 1999).

Sia il cuore che i polmoni sono importanti sedi di produzione di ET-1. Pazienti con ipertensione polmonare presentano maggiori livelli plasmatici di ET-1 rispetto a soggetti sani (Kedzierski e Yanagisawa, 2001); tale aumento è stato riscontrato maggiormente a livello di sangue arterioso polmonare, e ciò può indicare la presenza di un'aumentata produzione di ET-1 da parte del polmone o di una sua ridotta clearance. A livello cardiaco ET-1 incrementa la contrattilità del miocardio con azione inotropa positiva a breve termine, caratterizzata da una ridotta risposta beta adrenergica (Miyachi e Masaki, 1999). Tuttavia la continua stimolazione miocardica mediata dal sistema endotelina, determina alterazioni della funzionalità cardiaca influenzando negativamente sull'insufficienza cardiaca (Yoricane e Koike, 1990) fino ad esitare in aritmie fatali. Per questi motivi sia l'ET-1 che il suo precursore sono noti fattori prognostici e trattamenti preventivi con bloccanti dei recettori per ET-1, possono influire in modo benefico sulla sopravvivenza del paziente e sul rimodellamento del ventricolo sinistro dopo infarto del miocardio (Miyachi et al., 1989).

Per quanto riguarda il ruolo dell'ET-1 come marker di patologie renali, è stato evidenziato che l'endotelina 1 stimola la crescita delle cellule del mesangio e l'escrezione urinaria di ET-1 è correlata alla gravità del danno renale (Yanagisawa et al., 1988; Simonson et al., 1989; Hocher et al., 1997; Ohta et al., 1991; Peppas-Patrikiou et al., 1998; Lee et al., 1994). Un altro studio ha dimostrato che il sistema endotelina viene attivato in soggetti con patologie renali croniche e che il livello di espressione di mRNA sia a livello tubulare che glomerulare è correlato all'entità della proteinuria (Lehrke et al., 2001). Quindi l'azione nefrotossica della proteinuria, a prescindere dalla causa, induce la produzione di ET-1 a livello renale, a cui risulta correlata.

In medicina veterinaria è stata dimostrata una concentrazione di ET-1 maggiore in cani affetti da insufficienza cardiaca e patologie respiratorie rispetto ad animali sani. In particolare è stata identificata una correlazione tra gravità della patologia e concentrazione di ET-1, identificando quindi l'ET-1 come un fattore di rischio. Inoltre è anche un marker prognostico, dato che nel follow up si è visto come i pazienti con concentrazione di ET-1 più elevata hanno dimostrato un tempo di sopravvivenza minore (Tessier-Vetzel et al., 2006).

In letteratura non sono invece riportati studi sul possibile utilizzo dell'ET-1 come marker prognostico o di rischio in corso di patologie renali, come invece riportato nell'uomo. Per quanto riguarda l'omocisteina invece non è presente nessun lavoro nel cane e il suo ruolo come potenziale marker non è ancora stata valutato.

Nell'ambito di questa tesi si è quindi provveduto a validare un metodo enzimatico per la misurazione della concentrazione di Hcy nel cane, ed i risultati di questo studio sono stati pubblicati su una rivista internazionale (N. 1 nell'elenco delle pubblicazioni). Abbiamo poi indagato un possibile ruolo come marker prognostico in cani affetti da cardiomiopatia presentando i risultati sottoforma di poster al IXX congresso dell'ECVIM a Porto (N. 13 dell'elenco pubblicazioni) ed infine è stato valutato il ruolo come marker diagnostico, prognostico o di rischio in cani affetti da malattie intestinali o da insufficienza renale cronica, presentando i risultati come comunicazione orale all'XI congresso dell'ESVCP (N.14 dell'elenco pubblicazioni). La concentrazione di ET-1 è stata invece indagata in cani affetti da patologie renali. I risultati, presentati anch'essi all'XI congresso ESVCP (N. 15 dell'elenco pubblicazioni) sono stati poi valutati in associazione a quelli relativi all'Hcy.

Di seguito verranno presentati separatamente i risultati relativi al lavoro iniziale di validazione, quelli relativi a cani con patologia intestinale, quelli relativi a cardiopatia e quelli relativi a insufficienza renale, in cui verrà fatta una valutazione di insieme di Hcy ed ET-1.

MISURAZIONE DELL'OMOCISTEINA CON UN METODO ENZIMATICO E VALUTAZIONE DEL POTENZIALE RUOLO DELL'OMOCISTEINA COME BIOMARKER NEL CANE

Sulla base di quanto riportato precedentemente, questo studio ha come primo scopo quello di valutare le performances analitiche di un metodo enzimatico per la misurazione dell'omocisteina nel siero di cane. Nell'ambito della validazione analitica è stata valutata anche l'interferenza di emoglobina, trigliceridi e bilirubina ed infine le differenze tra siero e plasma ottenuto da sangue conservato con differenti anticoagulanti.

Successivamente, al fine di valutare preliminarmente il potenziale ruolo diagnostico, prognostico o come fattore di rischio nelle patologie per le quali in medicina umana si osserva un incremento dell'omocisteinemia, abbiamo indagato la concentrazione di Hcy in cani affetti da patologie cardiache, da patologie infiammatorie, da disordini gastro-intestinali, da neoplasie, da patologie renali, da traumi e da patologie di altra natura.

Materiali e metodi

In totale per questo studio è stato utilizzato il sangue prelevato da 56 cani, suddivisi in:

- *Controllo* (n=8): gruppo costituito da cani sani. Il criterio di inclusione è stato l'assenza di segni clinici o di laboratorio con particolare attenzione agli indicatori di funzionalità renale e cardiaca.
- *Patologie cardiache* (n=10): gruppo costituito da cani affetti da patologie quali insufficienza mitralica, cardiomiopatia dilatativa, stenosi polmonare, aritmia congenita e persistenza del dotto arterioso.
- *Processi infiammatori*: (n=7): gruppo costituito da cani affetti da processi infiammatori. Due soggetti erano affetti da piometra, gli altri da polmonite eosinofila, ehrlichiosi, leishmaniosi o pododermite.
- *Patologie gastrointestinali* (n=7): cani affetti da patologie quali stenosi pilorica (n=3), ostruzione intestinale (n=3) ed infine un caso di ulcera gastrica.
- *Neoplasie* (n=8): gruppo costituito da cani affetti da istiocitoma, carcinoma mammario, lipoma, carcinoma polmonare, carcinoma ovario, sinoviosarcoma e un caso sospetto di insulinoma. In un caso è stata identificata una massa splenica, ma non è stato eseguito né un esame citologico né istologico.
- *Patologie renali* (n=4): gruppo costituito da cani con insufficienza renale cronica (n=3) o acuta (n=1).
- *Trauma* (n=7): gruppo costituito da cani che hanno subito eventi traumatici (fratture e danni articolari).
- *Miscellanea* (n=6): cani con patologie varie che non rientrano nella precedente classificazione (dilatazione-torsione gastrica, emorragia post-chirurgica, ernia diaframmatica e segni neurologici di origine sconosciuta).

La misurazione dell'Hcy è stata effettuata come step preliminare su tutti i campioni mediante uno spettrofotometro automatico usando un kit presente in commercio basato sulla misurazione dell'omocisteina mediante una serie di reazioni cicliche atte a rilevare la concentrazione di Hcy nel siero o nel plasma umano (Dou et al., 2005). All'inizio di ogni sessione di lavoro lo strumento è stato eseguito il controllo qualità analizzando due controlli ad alta e bassa concentrazione, forniti dalla casa produttrice e in caso di risultati non soddisfacenti lo strumento è stato calibrato utilizzando il calibratore presente nel kit. Ogni campione è stato letto in triplicato e il valore medio, la deviazione standard e il coefficiente di variazione sono stati calcolati. Sulla base dei risultati ottenuti, alcuni dei sieri dei singoli soggetti sono stati utilizzati per preparare dei pool a diversa concentrazione di Hcy (tabella 20). Tale materiale è stato utilizzato per eseguire la validazione analitica e le prove di interferenza, in particolare sono stati uniti i campioni con concentrazioni simili di Hcy per avere sufficiente materiale da aliquotare in modo da completare la validazione analitica.

Campione	Valore medio di Hcy dopo lettura in triplicato ($\mu\text{mol/L}$)	Test per il quale il campione è stato impiegato
A	32.07	Pool alto per ripetibilità intra- e inter-assay
B	14.10	Pool medio per ripetibilità intra- e inter-assay
C	6.07	Pool basso per ripetibilità intra- e inter-assay
D	23.97	Accuratezza mediante diluizioni scalari e spiking recovery test
E	12.16	Spiking recovery test
F	10.26	Interferenza per emoglobina e lipemia
G	11.85	Interferenza per bilirubina

Tabella 20 Pool con rispettive concentrazioni di Hcy allestiti per le diverse prove di validazione analitica

La validazione analitica è stata eseguita secondo la procedura riportata nell'introduzione di questa tesi, valutando la precisione mediante ripetibilità intra- ed inter-assay, l'accuratezza mediante diluizioni scalari e lo spiking recovery test. Inoltre è stata valutata l'effetto dell'interferenza dell'emoglobina (simulando campioni emolitici), della lipemia e della bilirubina (simulando campioni prelevati da animali con ittero) seguendo il protocollo suggerito da Martinez-Subiela e Cerón (2005). Per questo scopo alle aliquote predisposte per la valutazione dell'interferenza sono state aggiunte differenti concentrazioni di emoglobina (Hb), bilirubina (Bil) e un'emulsione lipidica (Trig) e tutti i campioni così trattati sono stati letti in triplicato. In particolare sono stati simulati i seguenti livelli di emoglobina, lipemia e ittero:

- lieve (Hb<1.25 g/L; Trig<2.1 g/L; Bil=0.0275 g/L)
- moderata (Hb=2.5 g/L; Trig=6.1 g/L; Bil=0.045)
- grave (Hb=5.0 g/L; Trig=6.1 g/L; Bil=0.045 g/L)
- estrema (Hb=7.5 g/L; Trig=8.6 g/L; Bil=0.15 g/L).

Le prove per valutare l'influenza dell'anticoagulante sono state effettuate su 8 campioni divisi in tre aliquote: una posta in una provetta con gel separatore e attivatore della coagulazione per la separazione del siero, una in EDTA e una in litio eparina. Il siero e il plasma ottenuti mediante centrifugazione sono stati analizzati in triplicato. I risultati ottenuti dal medesimo soggetto sono stati confrontati mediante tests statistici.

Risultati

La ripetibilità intra- ed inter-assay ha mostrato una buona precisione a tutti e tre i livelli di concentrazione di Hcy. Nella ripetibilità intra-assay i CV erano pari a: 4.1, 9.0 e 11.7% rispettivamente per il pool alto, medio e basso, mentre per la ripetibilità inter-assay erano pari a: 10.6, 7.0 e 2.8% rispettivamente per il pool alto, medio e basso.

Per valutare l'accuratezza sono stati confrontati i valori ottenuti ad ogni diluizione con quelli attesi ed espressi in percentuale. I risultati sono riportati in tabella 21 e per entrambi i test la percentuale recuperata è sempre stata vicino al 100% ad eccezione dell'ultima diluizione al 20%.

	[Hcy] attesa (μmol/L)	N. di letture replicate	Valore medio	% recuperata	SD	CV %
Diluizioni scalari	23.97	3	23.97	100.0	0.91	3.8
	19.17	3	19.83	103.4	2.52	12.7
	14.38	3	13.67	95.0	0.78	5.7
	9.59	3	10.00	104.3	0.70	7.0
	4.79	3	3.67	76.5	1.29	35.1
Spiking recovery test	12.17	3	12.17	100.0	2.24	18.4
	14.13	3	13.87	98.1	2.59	18.7
	15.54	3	15.63	100.6	1.42	9.1
	16.60	3	17.43	105.0	1.27	7.3

Tabella 21 Risultati delle diluizioni scalari e dello spiking recovery test per la determinazione dell'accuratezza del metodo

La regressione lineare ha dimostrato un'eccellente grado di correlazione sia per le diluizioni scalari ($r^2=0.99$; $p=0.000$) che per lo spiking recovery test ($r^2=0.98$; $p=0.011$). Questo indica che il metodo analitico è accurato e lineare nei range di valori analizzati e che non è presente né un errore proporzionale né sistematico.

Per valutare l'interferenza è stata confrontata graficamente (figura 22) la percentuale di variazione della concentrazione di Hcy, per ogni sostanza interferente, con i rispettivi campioni basali costituiti dal siero più una quantità di acqua distillata pari al volume della sostanza interferente aggiunta al campione nei quali le concentrazioni di emoglobina, trigliceridi e bilirubina erano rispettivamente: 0 g/L, 1.1 g/L e 0.01 g/L..

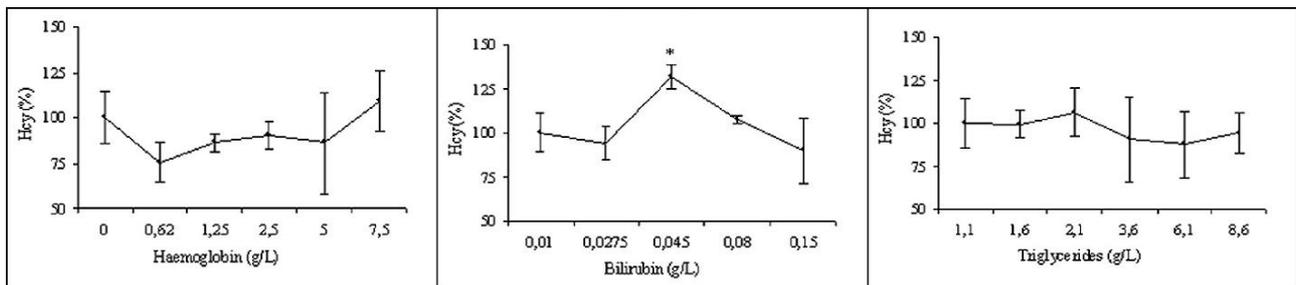


Figura 22 Interferogramma per emoglobina, trigliceridi e bilirubina. I risultati sono espressi come percentuale del valore originario. Ciascun punto rappresenta il valore medio±SD delle misure triplicate, espresse come percentuale di variazione in confronto al valore basale. *=significativamente più elevato ($p<0.001$) del valore basale

I valori medi osservati in presenza di emoglobina e trigliceridi fluttuano intorno al 100% del valore basale, senza differenze significative. Ciò suggerisce che emoglobina e trigliceridi hanno un effetto limitato sulla misurazione di Hcy, nonostante nei campioni nei quali sono simulate emolisi o lipemia grave o estrema, l'imprecisione del test aumenta mascherando quindi delle possibili differenze significative. Per quanto riguarda la bilirubina invece induce un aumento significativo a concentrazioni che corrispondono a un ittero moderato (0.045 g/L). Questo suggerisce di evitare di misurare l'Hcy in campioni evidentemente itterici.

Il confronto dei risultati ottenuti nel siero erano pari a 6.4 ± 4.1 μmol/L, quelli in EDTA a 4.7 ± 4.0 μmol/L ($p<0.001$ vs. siero) e quelli in litio-eparina a 4.2 ± 3.2 μmol/L ($p<0.001$ vs. siero). Il motivo di questa diminuzione non è chiaro, tuttavia emerge che il siero è il campione d'elezione per la misurazione dell'Hcy.

Il potenziale diagnostico dell'Hcy è stato valutato confrontando i valori di Hcy nei diversi gruppi di cani affetti da diverse patologie. Rispetto al gruppo di controllo (media±SD: 5.72±3.26; mediana: 5.82 μmol/l; min.–max: 1.43–11.23 μmol/l) gli unici gruppi che hanno mostrato differenze significative sono stati quello delle patologie renali (media±SD: 18.86±10.15 μmol/l; mediana: 16.99 μmol/l; min–max: 9.38–32.07 μmol/l) e quello delle patologie cardiache (media±SD: 10.21±6.09 μmol/l; mediana: 7.64 μmol/l; min–max: 4.47–24.50 μmol/l), entrambi significativamente aumentati rispetto al gruppo di controllo con significatività pari a $p < 0.001$ e $p < 0.05$, rispettivamente (figura 23). Da questi risultati preliminari si può dedurre che l'omocisteina ha valori più elevati nei pazienti con patologie cardiache e renali.

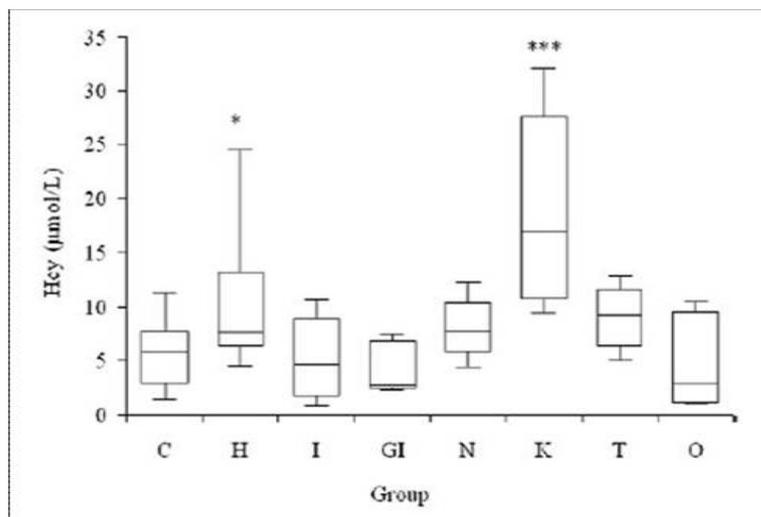


Figura 23 Concentrazione di Hcy registrata nei seguenti gruppi di cani: C=controllo; H=patologie cardiache; I: infiammazione; GI= patologie gastrointestinali; N= neoplasie; K= patologie renali; T= traumi; O= altre patologie (miscellanea). Boxes = I-III interquartile range; linee orizzontali= valore mediano; linee verticali= valori minimi e massimi; *= $p < 0.05$ vs controllo; ***= $p < 0.001$ vs controllo

Discussione

Con questo studio è stato dimostrato che il metodo enzimatico messo a punto è preciso ed accurato per la misurazione dell'Hcy nel cane. La misurazione va effettuata esclusivamente su campioni di siero e l'emolisi e la lipemia non interferiscono con la misurazione, mentre campioni itterici andrebbero esclusi dalle analisi.

Sulla scorta delle informazioni preliminari ottenute in questo studio di validazione analitica è possibile ipotizzare che l'Hcy sia un marker diagnostico nei pazienti affetti da patologie cardiache e renali, mentre non si rileva HHcy in condizioni come patologie gastrointestinali, che nell'uomo possono indurre iperomocisteinemia. Va però sottolineato che i campioni inclusi nel gruppo delle patologie gastroenteriche erano molto eterogenei in quanto a tipo di patologia presente e a stadio di gravità. Tale aspetto, quindi merita di essere approfondito, così come vanno approfondite le relazioni tra patologia cardiaca e renale ed iperomocisteinemia, attraverso una migliore standardizzazione, in termini di stadio evolutivo e di presenza di alterazioni associate, prima fra tutte l'ipertensione.

CONCENTRAZIONE DI OMOCISTEINA IN CANI AFFETTI DA INFLAMMATORY BOWEL DISEASE

Materiali e metodi

La determinazione dell'Hcy è stata eseguita in 13 cani sani (gruppo di controllo) e in 17 cani con alterazioni endoscopiche e/o istologiche riferibili a quadri infiammatori intestinali, nella gran parte dei casi di tipo linfoplasmacellulare, aspetto che caratterizza molte delle cosiddette "inflammatory bowel diseases" (IBD), patologie ad eziologia multifattoriale caratterizzata dalla rottura dell'equilibrio immunitario mucosale favorita a sua volta da eventi scatenanti non bene identificati, tra i quali sono spesso chiamati in causa fenomeni autoimmuni, forme di ipersensibilità e/o allergia verso antigeni batterici o di origine alimentare. Oltre al dosaggio dell'Hcy in tutti i soggetti esaminati è stato effettuato un pannello ematologico e biochimico di base per verificare la presenza di ripercussioni generali associate all'enteropatia, con particolare riferimento alla presenza di infiammazione (dosaggio CRP ed elettroforesi) e di malassorbimento (determinazione di albumine e glucosio), condizioni che spesso caratterizzano le IBD.

Risultati

L'ematologia e la biochimica dei soggetti in esame ha raramente mostrato gravi ripercussioni sistemiche. Occasionalmente erano infatti presenti anemia normocitica normocromica compatibile con un quadro di malattia infiammatoria cronica, linfopenia, neutropenia incrementi delle α 2-globuline e/o di CRP, mentre l'ipoalbuminemia che dovrebbe indicare malassorbimento era spesso sostituita da iperalbuminemia, imputabile a stati di disidratazione che caratterizzano le perdite di liquidi associate a diarrea. Solo due soggetti erano ipoproteinemici, mentre è risultata frequente l'ipocolesterolemia, altro dato riferibile a malassorbimento. Nessuno dei cani esaminati presentava alterazioni della funzionalità renale che avrebbero potuto influire sulla concentrazione di Hcy. In ultima analisi quindi, tutti i soggetti presentavano alterazioni istologiche compatibili con quadri infiammatori locali ma soltanto 10 cani presentavano alterazioni di laboratorio di un certo rilievo.

Nonostante non fossero disponibili i valori relativi ai livelli di vit. B₁₂, unico indice attendibile di malassorbimento, è verosimile ritenere che i dieci soggetti con alterazioni di laboratorio avessero gradi variabili di malassorbimento, che come noto nell'uomo, può indurre HHcy.

La concentrazione di Hcy nei cani enteropatici però, non è risultata significativamente diversa da quella del gruppo di controllo (figura 24), forse anche a causa della maggiore ampiezza di distribuzione dei dati.

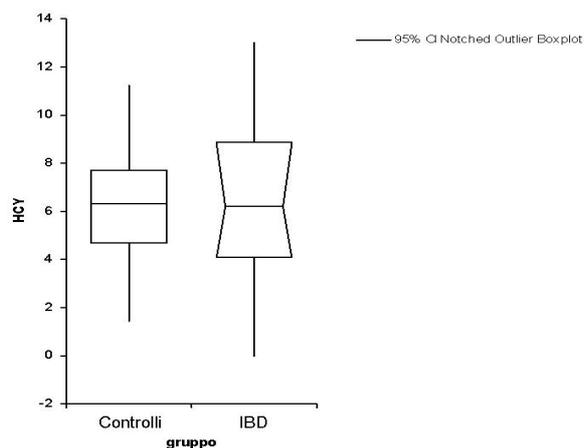


Figura 24 Confronto dei valori di Hcy tra il gruppo di controllo e i cani affetti da IBD

Come sopra accennato, però il gruppo di cani con patologie intestinali era molto eterogeneo in termini di estensione e gravità delle alterazioni rilevate localmente e di ripercussioni sistemiche. Si è voluto allora verificare se la concentrazione di Hcy fosse diversa raggruppando i cani in base alla gravità delle lesioni locali (grave vs. moderata) all'estensione delle lesioni (tenue vs. colon, dato che il malassorbimento delle vitamine indispensabili per il metabolismo dell'Hcy avviene principalmente nel tenue) o alla presenza/assenza di ripercussioni sistemiche. Anche questo confronto non ha però evidenziato differenze significative (figura 25)

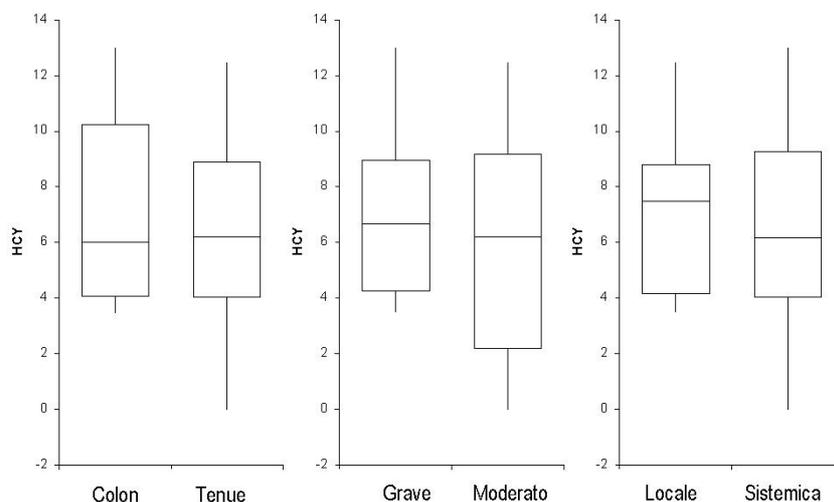


Figura 25 Confronto della concentrazione di Hcy tra i gruppi con diverse forme di IBD

Discussione

I risultati di queste analisi confermano che, nel cane, la concentrazione di Hcy non è influenzata dalla presenza di patologie intestinali caratterizzate da infiammazione e malassorbimento, indipendentemente dalla gravità della lesione o delle ripercussioni sistemiche o dalla sede o estensione della lesione. Questo conferma

quanto osservato nel nostro lavoro preliminare di valutazione dell'omocisteinemia del cane (Rossi et al., 2008), nel quale erano presenti soggetti con patologie gastrointestinali di varia natura, prevalentemente non associate a malassorbimento, e nel quale non erano stati osservati fenomeni di iperomocisteinemia.

Pur non disponendo di informazioni sui livelli di vitamina B₁₂ nei soggetti esaminati, è verosimile supporre che almeno in alcuni dei cani patologici fosse presente malassorbimento ed ipovitaminosi B₁₂ e/o B₆, che dovrebbe, almeno teoricamente, rallentare il metabolismo dell'omocisteina aumentandone così la concentrazione in circolo (Danese et al., 2005; Peyrin-Biroulet et al., 2007). Il fatto che questo non avvenga nel cane lascia pensare che in questa specie esistano vie alternative che regolano il metabolismo dell'Hcy come già supposto nel gatto (Ruaux et al., 2005) e di conseguenza i suoi livelli ematici restino normali anche in condizioni di malassorbimento associato ad enteropatie. Se tali risultati venissero confermati da una casistica più ampia e/o se tale via alternativa venisse identificata, le lesioni enteriche ed il malassorbimento potrebbero essere esclusi dalla lista di patologie potenzialmente in grado di determinare iperomocisteinemia (e rischi associati) nel cane, sia da un punto di vista patogenetico che diagnostico o di monitoraggio.

CONCENTRAZIONI DI OMOCISTEINA IN CANI CARDIOPATICI

Alla luce dei risultati emersi nello studio di validazione, che evidenziavano modica HHcy in cani cardiopatici, abbiamo effettuato uno studio, in associazione con il gruppo di cardiologia del Dip. Di Scienze cliniche veterinarie della nostra Facoltà, per cercare conferma a questa nostra osservazione preliminare e per valutare se ci fosse un grado di associazione tra HHcy e grado di insufficienza cardiaca.

Materiali e metodi

Sono stati campionati 58 cani affetti da patologia mitralica degenerativa (MVD) o da miocardiopatia dilatativa (DCM) e su tali soggetti è stata eseguita la determinazione dell'Hcy, da paragonare poi con i valori dei 13 cani del gruppo di controllo utilizzato per lo studio delle enteropatie sopra citato.

I 58 cani cardiopatici sono stati classificati nelle 3 classi di gravità codificate dall' ISACHC (International Small Animal Cardiac Health Council.), sulla base dei riscontri clinici, elettrocardiografici ed ecocardiografici e la distribuzione dei valori è stata verificata anche in funzione della classe di gravità. In particolare, 32 cani rientravano in classe I, 18 in classe II e 8 in classe III.

6 cani cardiopatici, tutti in classe I, sono stati poi campionati ripetutamente (2 o 3 volte) durante il follow up.

Risultati

I valori di omocisteina rilevati nelle tre classi di cardiopatici sono risultati pari a 6.70 ± 3.94 , 8.16 ± 6.30 and 10.91 ± 5.82 $\mu\text{mol/L}$, rispettivamente ma non si sono riscontrate differenze significative tra i tre gruppi o rispetto al gruppo di controllo (6.34 ± 2.25 $\mu\text{mol/L}$).

Mediante regressione logistica si è cercato di definire un cut-off che differenziasse i cani di classe III dagli altri. Tale cut off è risultato essere pari a 9.4 $\mu\text{mol/L}$.

I risultati relativi ai cani campionati ripetutamente sono riportati in tabella 22 e non evidenziano variazioni significative della omocisteinemia durante il follow up, ad eccezione dell'unico cane che partiva da valori elevati, nel quale, a seguito della terapia cardiologica, la concentrazione di Hcy si è normalizzata.

	PRELIEVO 1	PRELIEVO 2	PRELIEVO 3
CANE 1	4,5	5,5	5,8
CANE 2	0	3,1	
CANE 3	4,3	4,2	
CANE 4	5,7	4,6	
CANE 5	12,3	4,7	5,5
CANE 6	8,6	8,9	

Tabella 22 Valori di Hcy nei cani cardiopatici durante il follow up

Rispetto allo studio precedente, che aveva evidenziato valori di Hcy significativamente più alti nei cani cardiopatici rispetto a quelli sani, in questo caso non si sono rilevate differenze significative, probabilmente perchè il presente campionamento includeva soprattutto cani cardiopatici ma con classi di gravità ridotte rispetto a quelle dello studio precedente. L'analisi dei valori medi infatti evidenzia un aumento progressivamente crescente della concentrazione di Hcy nei cani appartenenti alle classi di maggiore gravità, tanto da poter definire un cut-off utile a classificare questi soggetti.

Dal punto di vista patogenetico l'HHcy nei cani più gravi potrebbe dipendere dall'ipertensione che spesso accompagna queste forme (i valori di pressione sistolica non erano purtroppo disponibili). Da un punto di vista pratico, l'informazione raccolta in questi soggetti non è di per se importante da un punto di vista diagnostico, in quanto la diagnosi di cardiopatia grave può essere agevolmente basata su dati clinici e strumentali, ma può assumere rilevanza dal punto di vista del follow-up in quanto la eventuale normalizzazione dell'Hcy durante la terapia potrebbe indicare un miglioramento del quadro cardiologico, facendo assumere a tale analita il ruolo di fattore di rischio già identificato nell'uomo. In quest'ottica i dati dei prelievi ripetuti sono confortanti in quanto evidenziano un mantenimento dei valori di Hcy nei range di normalità nei soggetti che si mantengono in classe I e una normalizzazione dopo terapia nell'unico soggetto che partiva da valori alterati.

Tali risultati indicano una possibile utilità clinica dell'Hcy nel monitoraggio dei pazienti cardiopatici e andranno verificati in studi successivi associando alla valutazione clinica la determinazione della pressione sistolica.

CONCENTRAZIONI DI OMOCISTEINA E DI ENDOTELINA 1 IN CANI CON MALATTIA RENALE

Analogamente a quanto sopra riportato per le cardiopatie, anche per quanto riguarda la malattia renale si è voluta approfondire l'analisi, partendo dal fatto che nello studio preliminare erano stati evidenziati valori più elevati di Hcy in pazienti "renali". Per avere un quadro più esaustivo dell'eventuale HHcy in cani con

insufficienza renale, si è però associata alla determinazione dell'Hcy anche la determinazione dell'ET-1, altro analita potenzialmente coinvolto in patologia renale, facendo precedere all'analisi dei campioni patologici, una breve fase di validazione analitica del metodo, peraltro già estesamente validato in letteratura. Inoltre sono stati raccolti anche dati relativi a alterazioni fisiopatologiche frequentemente associate alla patologia renale, oltre alla concentrazione di creatinina, quali la pressione sistolica e la presenza e gravità della proteinuria.

Materiale e metodi

La concentrazione di Hcy ed ET-1 è stata determinata in 12 cani sani di controllo, privi di alterazioni cliniche compatibili con insufficienza renale, iperazotemia, proteinuria ed ipertensione, e in 113 cani patologici nei quali è stata determinata la concentrazione di creatinina, il rapporto PU/CU (per i dettagli metodologici vedi obiettivo 2) e la pressione sistolica mediante metodo oscillometrico. Sulla base di tali dati i cani sono stati classificati secondo la classificazione IRIS come riportato nelle tabelle 23, 24 e 25.

STADIO	CREATININA PLASMATICA
1	< 1.4 mg/dL
2	1.4-2.0 mg/dL
3	2.1-5.0 mg/dL
4	> 5.0 mg/dL

Tabella 23 Stadiazione IRIS basata sulla creatininemia

SOTTOSTADIO	UPC
Non proteinurico	< 0.2
Bordeline proteinurico	0.2-0.5
Proteinurico	> 0.5

Tabella 24 Sottostadiazione IRIS basata sul rapporto tra proteine e creatinina urinaria (UPC)

PRESSIONE SISTOLICA	PRESSIONE DIASTOLICA	SOTTOSTADIO IN BASE AL RISCHIO DI DANNO D'ORGANO	VALORI DA UTILIZZARE IN CASO DI RANGE DI RAZZA DIVERSO DA QUELLO STANDARD
< 149 mmHg	< 95 mmHg	0 (Minimo)	< 10 mmHg sopra il range di riferimento
150-159 mmHg	95-99 mmHg	1 (Basso)	10-20 mmHg sopra il range di riferimento
160-179 mmHg	100-119 mmHg	2 (Moderato)	20-40 mmHg sopra il range di riferimento
> 180 mmHg	> 120 mmHg	3 (Alto)	> 40 mmHg sopra il range di riferimento
Nessuna complicazione (NC)		Nessuna evidenza di complicanze o danno dell'organo	
Complicazioni (C)		Evidenza di complicanze o danno d'organo	
Rischio non determinato (RND)		Pressione ematica non misurata	

Tabella 25 Sottostadiazione IRIS basata sulla pressione sistolica-diastolica

Per quanto riguarda l'ET-1, che è stata analizzata con un metodo ELISA disponibile commercialmente, sono stati analizzati con l'approccio metodologico descritto in precedenza la ripetibilità intra- ed inter-assay.

I valori riscontrati nei cani con malattie renali sono poi stati paragonati con quelli di controllo mediante test di U Mann Withney e quelli rilevati nei diversi gruppi classificati sulla base di creatinina, proteinuria e ipertensione sono stati paragonati tra loro con test di Kruskal Wallis seguito da analisi di Bonferroni. Sia per Hcy che per

ET-1 poi, è stata valutata la presenza di correlazioni con gli altri parametri su scala continua (creatinina, PU/CU e pressione).

Risultati

La prova preliminare di validazione ha evidenziato per l'ET-1 valori di CV relativi alle prove intra-assay sono risultati pari a $6,45 \pm 5,50\%$ (mediana: 5,90%) e quelli inter-assay pari a $20,47 \pm 16,00$ (mediana = 15,08%), senza correlazione con il valore medio di ET-1.

Hcy e ET-1 in funzione della classe IRIS

Dato che i valori rilevati nei controlli e nei soggetti di classe I non sono risultati significativamente diversi tra loro, sono stati uniti a formare un unico gruppo di cani di controllo.

Rispetto a tale gruppo, si sono rilevate differenze statisticamente significative per quanto riguarda la Hcy nei soggetti di classe II ($P = 0,008$) che in quelli di classe IV ($P < 0,001$) e differenze vicine al limite di significatività statistica nei soggetti di classe III ($P = 0,095$). Anche i valori di ET-1 evidenziano un progressivo aumento rispetto ai controlli, con differenze significative nelle classi III ($P = 0,050$) e IV ($P < 0,001$). I valori della classe IV sono significativamente superiori anche a quelli delle classi II ($P = 0,017$) e III ($P = 0,007$) (figura 26).

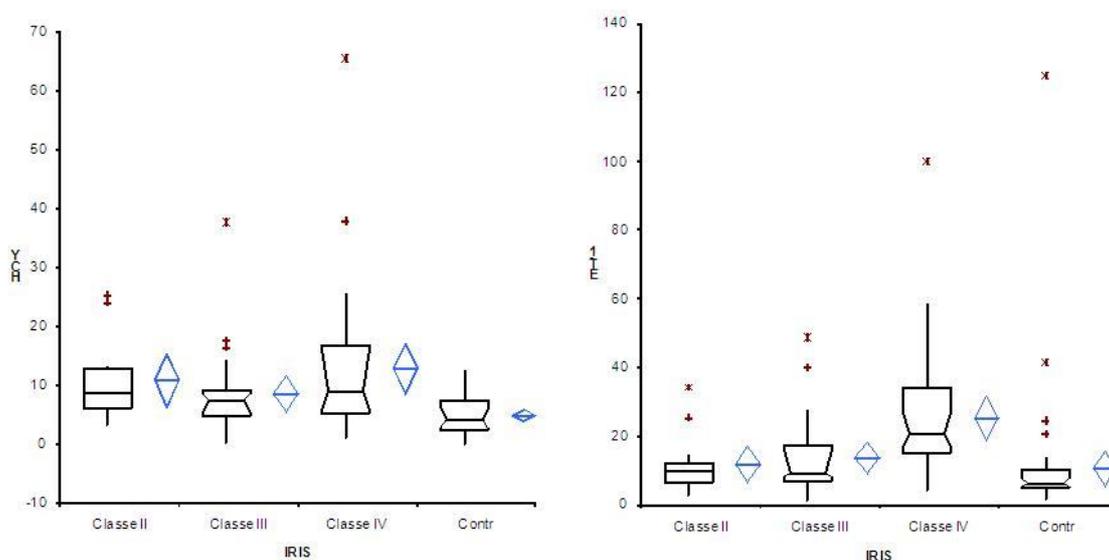


Figura 26 Valori di Hcy (a sinistra) e di ET-1 (a destra) nei controlli (sani+classe I) e nelle classi IRIS II, III, e IV

I valori di creatinina sono risultati significativamente correlati sia all'Hcy ($P < 0,010$; $r = 0,41$) che alla ET-1 ($P = 0,001$; $r = 0,66$) (figura 27).

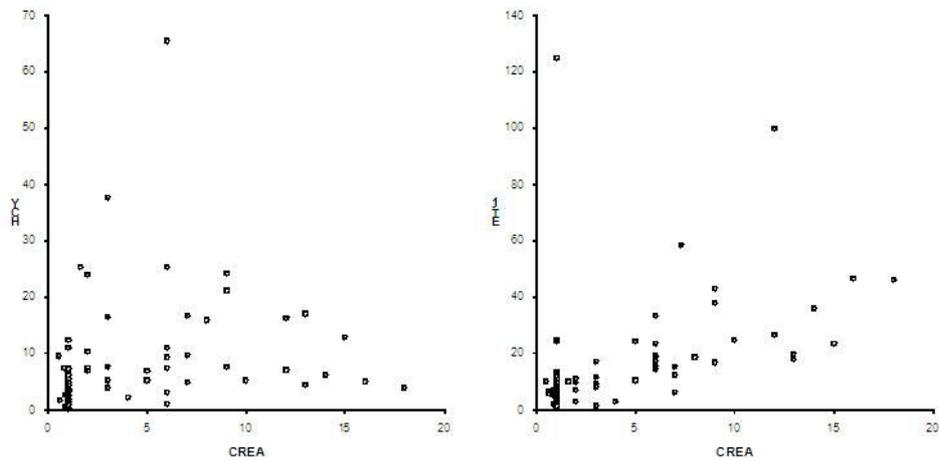


Figura 27 Correlazione tra la concentrazione ematica di creatinina e di Hcy (a sinistra) e di ET-1 (a destra)

Hcy e ET-1 in funzione della proteinuria

Tale valutazione è stata eseguita su 123 campioni (24 NP, 11 BP, 88 P). Solo di 105 campioni si conosceva anche la classificazione IRIS. I valori di Hcy mostrano aumenti paralleli a quelli della proteinuria ma non significativi, anche per la dispersione dei valori I valori di ET-1 evidenziano che rispetto ai cani NP già i cani BP mostrano valori mediamente più alti ma solo nei cani P la differenza è significativa ($P=0,002$) (figura 28).

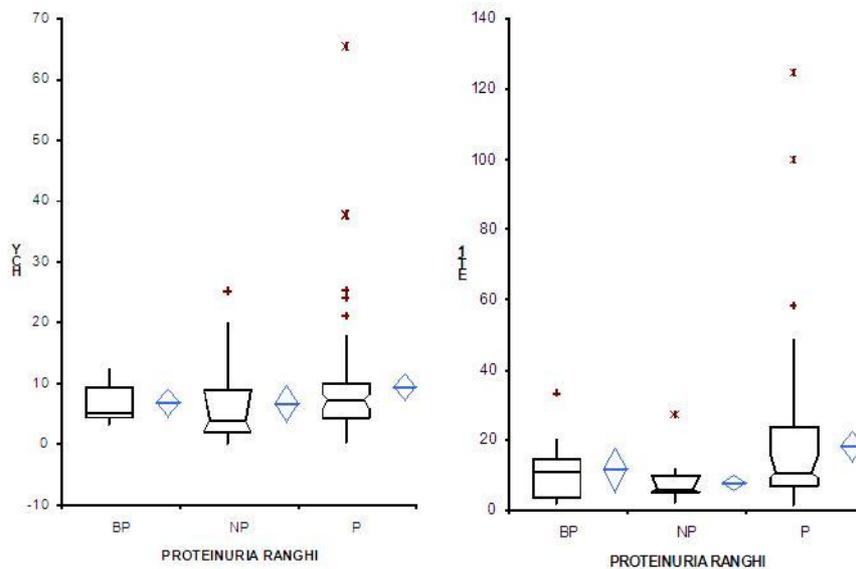


Figura 28 Valori medi di Hcy (a sinistra) e ET-1 (a destra) nelle tre diverse classi di proteinuria

Tra i due analiti, solo l'ET-1 risulta positivamente correlata anche se modestamente, con quelli di PU/CU ($P=0,027$; $r^2=0,21$; figura 29).

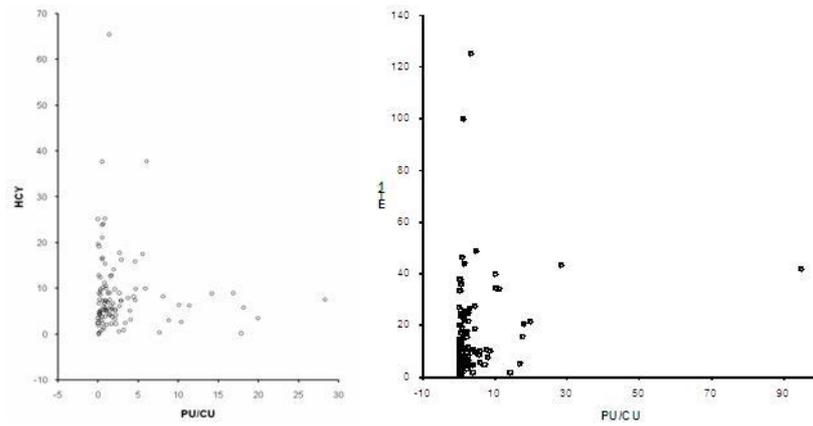


Figura 29 Correlazione tra la concentrazione ematica di Hcy (a sinistra) e di ET-1(a destra) e PU/CU

Hcy e ET-1 in funzione della pressione sistolica

Questa valutazione è stata eseguita su 103 campioni di sangue (60 "minimal risk", 12 "Low risk", 15 "moderate risk" e 17 "high risk"). Di 95 campioni si conosceva anche la classe IRIS. I valori di Hcy non mostrano differenze significative tra i gruppi. Al contrario, l'ET-1 ha evidenziato un aumento proporzionale alle classi di rischio con differenza significativa ($P=0,016$) tra "high" e "minimal risk" (figura 30).

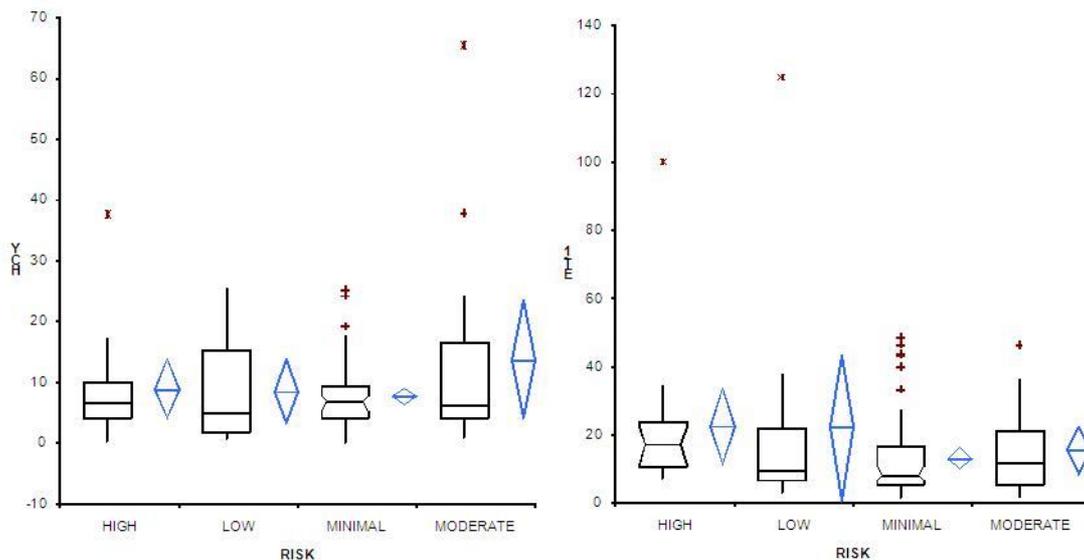


Figura 30 Distribuzione dei valori di Hcy (a sinistra) e di ET-1 (a destra) nelle classi IRIS di pressione sistolica

La pressione non è correlata all'Hcy ($P=0,916$; $r^2=0,01$; figura 14), ma è correlata alla ET-1 ($P<0,001$; $r^2=0,36$) (figura 31).

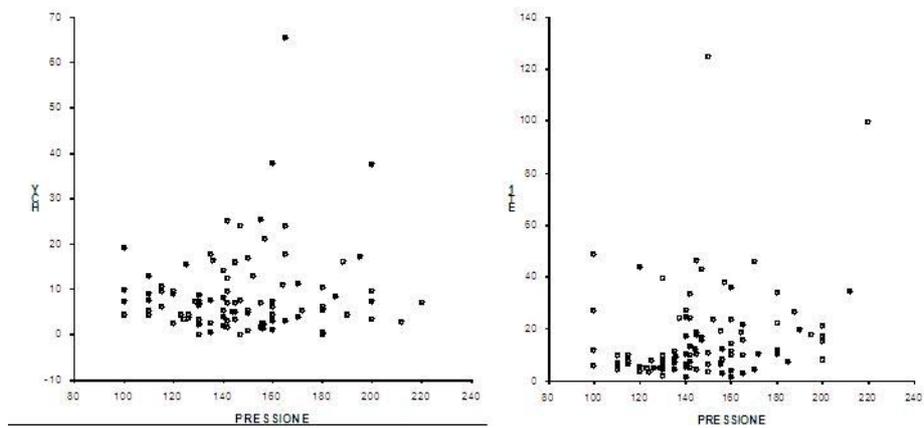


Figura 31 Correlazione tra la concentrazione di Hcy (a sinistra) ed ET-1 (a destra) e pressione sistolica

Hcy e ET-1 in funzione della presenza di infiammazione

La concentrazione di Hcy in cani con CRP normale o elevata non è risultata significativamente differente ($P=0,928$). Al contrario i valori di ET-1 sono significativamente più alti in caso di infiammazione ($P<0,001$) (figura 32).

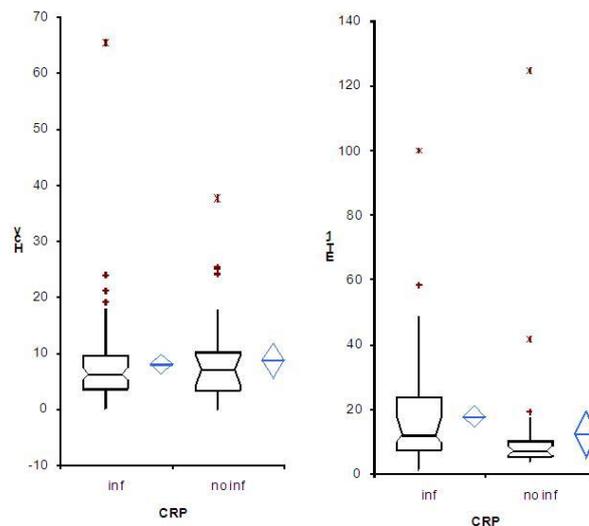


Figura 32 Valori medi di Hcy (a sinistra) e ET-1 (a destra) nei soggetti con e senza infiammazione

I valori di Hcy e CRP non sono statisticamente correlati ($P=0,553$; $r = -0,06$). E' inoltre significativa la correlazione tra CRP e ET-1 ($P<0,001$) (figura 33).

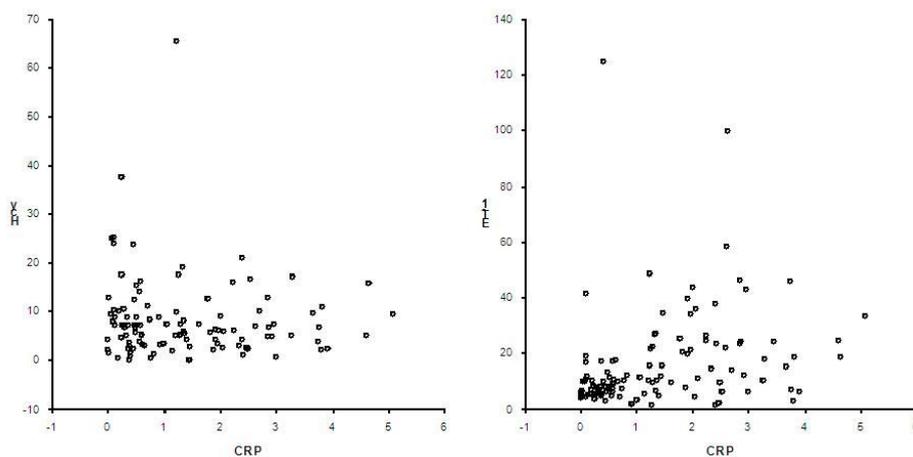


Figura 33 Correlazione tra Hcy (a sinistra) ed ET-1 (a destra) e CRP

Discussione

La determinazione dell'ET-1 mostra un buon grado di precisione, sovrapponibile a quello dimostrato dalla Hcy in studi precedenti (Rossi et al., 2008).

Sebbene sia la concentrazione di Hcy che quella di ET-1 aumentino col progredire della classe IRIS, l'ET-1 plasmatica mostra una correlazione più marcata con i livelli di creatinina. A differenza dell'Hcy, inoltre, l'ET-1 risulta anche correlata con il grado di proteinuria ed è significativamente più alta nei cani proteinurici che non in quelli non proteinurici. E' stata inoltre rilevata una chiara associazione tra grado di ipertensione e presenza di infiammazione, da un lato, e concentrazioni plasmatiche di ET-1, dall'altro, ma non tra ipertensione o infiammazione ed Hcy. Ciò sembra contrastare con i risultati dello studio preliminare. Come possibile spiegazione, nello studio precedente i valori nei gruppi "minimal risk" e "low risk" erano leggermente inferiori ($5,2 \pm 4,4$) a quelli qui riscontrati, pur in presenza di una simile distribuzione dei valori (0,0-16,7) e dall'altro la classificazione precedente utilizzava valori soglia tra classi di rischio diversi da quelli suggeriti dall'IRIS. Resta comunque il fatto che i soggetti classificati come "high risk" hanno comunque valori pressori molto elevati e dovrebbero in ogni caso presentare valori di Hcy più elevati, mentre in questo caso sembrano addirittura diminuire rispetto ai valori riscontrati nella classe di rischio moderato.

Nell'insieme tali dati indicano che sebbene entrambi gli analiti possano elevarsi in un caso di malattie renali caratterizzate da ipertensione e/o infiammazione, l'ET-1 è più decisamente associata ai fenomeni ipertensivi ed infiammatori. Anche la mancanza di correlazioni significative tra Hcy e ET-1 conferma che quest'ultima i due analiti sono probabilmente regolati da meccanismi indipendenti tra loro. Questo supporta quanto osservato nell'uomo, dove si suppone che l'HHcy associata a patologia renale dipenda più dall'alterata clearance renale che non dall'ipertensione, nonostante la concentrazione di Hcy possa poi giocare un ruolo "predittivo" nei confronti di complicanze ipertensive. Per quanto riguarda l'ET-1, i risultati concordano con quanto segnalato nell'uomo e in alcuni animali di laboratorio, ma non nel cane, circa l'associazione tra aumento di ET-1 e fenomeni ipertensivi e/o infiammatori. Tale associazione dipende dalla complessa rete di

segnali molecolari che regolano la liberazione di ET-1, dipendenti da stimoli neuroendocrini coinvolti nella regolazione del tono vasale ma anche dal rilascio di citochine pro-infiammatorie.

In conclusione, questi risultati confermano anche nel cane il potenziale ruolo dell'ET-1 nella diagnosi e nell'inquadramento patogenetico delle malattie renali associate a ipertensione e/o a infiammazione. Dal punto di vista diagnostico è necessario impostare studi che includano soggetti con patologie diverse da quelle renali, per potere definire i cut-off e valutare la sensibilità e la specificità diagnostica di ET-1 e Hcy. Il riscontro di aumenti di ET-1 progressivamente più intensi man mano che patologia renale e ipertensione peggiorano apre interessanti prospettive circa il possibile ruolo dell'ET-1, nel sangue più che nelle urine, come fattore prognostico, da valutare tramite studi longitudinali durante il follow up di pazienti renali.

OBIETTIVO 4 - SVILUPPO DI METODI E VALIDAZIONE BIOLOGICA DELL'ACIDO SIALICO TOTALE, DEL TIPO DI SIALILAZIONE E DELL'ATTIVITÀ DELL'ENZIMA SIALILTRASFERASI

L'acido sialico (figura 34) è un derivato N-acetilato dell'acido neuramico che si trova frequentemente alle estremità dei terminali oligosaccaridici di glicoproteine e glicolipidi presenti sulla membrana cellulare.

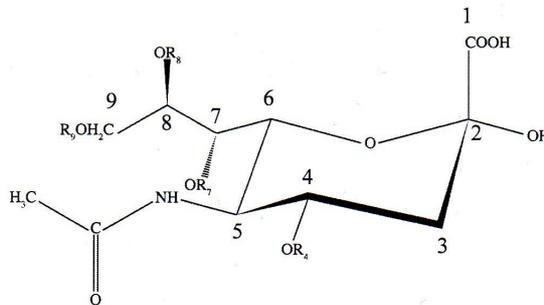


Figura 34 Struttura dell'acido N-acetilneuraminico (NeuAc)

La sua principale funzione è costituita dalla mediazione dei fenomeni di adesione fra proteine. Dato che come sopra citato è particolarmente frequente la presenza di acido sialico sulle glicoproteine di membrana, ne deriva che le glicoproteine sialilate possono quindi fungere da ligando per altre molecole affini all'acido sialico o costituite anch'esse da proteine sialilate. Le situazioni patologiche che più frequentemente vedono coinvolte le proteine sialilate sono quindi le infezioni virali, i processi infiammatori e i tumori. Molti virus, infatti, usano recettori sialilati per aderire e successivamente penetrare nelle cellule da infettare. Per quanto riguarda il processo infiammatorio, numerose sono le fasi della flogosi che coinvolgono molecole sialilate: nella prima fase della diapedesi i leucociti interagiscono in maniera labile con l'endotelio grazie all'interazione tra selectine espresse sui due tipi cellulari (leucocita e cellula endoteliale) e molecole sialilate espresse sulla controparte (cellula endoteliale e leucocita, rispettivamente); la presenza di molecole sialilate (tra cui proteine di fase acuta come la alfa-1-glicoproteina acida), poi, può modificare gli stati di attivazione di cellule coinvolte nella risposta infiammatoria, contribuendo quindi all'immunomodulazione che caratterizza le risposte infiammatorie o immunitarie. Per quanto riguarda i tumori, poi, visto che la presenza di acido sialico è fondamentale per l'interazione e l'adesione tra cellule vicine, quando la sialilazione cellulare è alterata, si altera anche il rapporto tra cellule vicine, favorendo quindi fenomeni come la crescita neoplastica e la comparsa di metastasi.

I fenomeni sopra descritti dipendono però non solo dalla presenza/assenza di acido sialico ma anche dal tipo di sialilazione presente. L'acido sialico può infatti legarsi in siti diversi dei carboidrati presenti sulle glicoproteine, e in particolare del galattosio. I due tipi di sialilazione più frequenti, o quantomeno più importanti dal punto di vista biologico, sono quelli in cui l'acido sialico è legato in posizione α 2,3 e α 2,6. In tutti i fenomeni sopra citati la prevalenza di uno o dell'altro tipo di legame condiziona la risposta delle cellule. Ad

esempio, l'acquisizione di caratteristiche di maggiore virulenza da parte di alcuni virus (es: virus influenzali, alcuni corona- o parvo-virus) è legata alla loro capacità di legare l'acido sialico in posizione $\alpha 2,6$ invece che $\alpha 2,3$. Allo stesso modo la capacità di metastatizzare di alcuni tumori dipende, nell'uomo, da una prevalenza di glicoproteine $\alpha 2,6$ sulle glicoproteine $\alpha 2,3$ nel siero e sulle cellule stesse. A sua volta, la prevalenza dell'una o dell'altra glicofrorma di acido sialico dipende dall'attività degli enzimi sialiltrasferasi 2,3 e 2,6, rispettivamente. Tali enzimi sono infatti in grado di trasferire, per l'appunto in posizione $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$, sulle proteine sieriche o di membrana l'acido sialico presente nei fluidi extracellulari. Anche per quanto riguarda l'enzima, l'attività prevalente nei tumori metastatizzanti dell'uomo è quella dell'enzima $\alpha 2,6$.

In medicina veterinaria gli studi sulla quantificazione dell'acido sialico sono limitati e quelli sulla sialiltrasferasi del tutto assenti, fatta eccezione per alcuni studi eseguiti in topi e ratti. In questa parte della tesi ci siamo quindi rivolti alla determinazione dell'acido sialico totale nel gatto, in funzione dell'importanza che le proteine sialilate sembrano assumere in corso di coronavirosi, nonché alla validazione di un metodo su fase solida per la determinazione simultanea del tipo di sialilazione presente e dell'attività sialiltrasferasica in siero e tessuti, valutando in via preliminare l'utilità di tale test in corso di metastatizzazione dei tumori mammari del cane.

VALIDAZIONE DEL METODO ANALITICO PER LA DETERMINAZIONE DELL'ACIDO SIALICO TOTALE (TSA) NEL GATTO E VERIFICA DEL POTENZIALE RUOLO DEL TSA NELLE CORONAVIROSIS FELINE

Come citato in precedenza, l'acido sialico sembra giocare un ruolo importante in alcune malattie virali e, più in generale, nelle forme infiammatorie.

Tra le diverse forme virali in cui potrebbero essere implicate variazioni quali-quantitative della sialilazione di proteine plasmatiche e tissutali rientrano le coronavirosi. Tra queste, riveste particolare importanza, in medicina veterinaria, quella del gatto, che nella sua forma clinica determina la peritonite infettiva felina (FIP), patologia letale del gatto la cui patogenesi presenta alcuni punti non chiari, come descritto nell'obiettivo 2, nell'ambito del quale si erano indagati alcuni aspetti della risposta immunitaria.

L'interesse sull'acido sialico in corso di coronavirosi felina deriva da due osservazioni sperimentali, una delle quali legata al ruolo di molecole sialilate come recettore del virus, l'altra legata al riscontro di variazioni nella concentrazione ematica e nel tipo di sialilazione di proteine circolanti in gatti affetti da coronavirosi.

Per quanto riguarda il primo punto, è noto che tra i Coronavirus, a seconda del gruppo di appartenenza, alcuni utilizzano come recettore "determinante" l'acido sialico mentre altri presentano come recettore specifiche proteine di superficie (tabella 26).

Virus	TGEV	BCoV, HCoV-OC43	MHV	IBV	SARS-CoV
Legame con: a. acido sialico b. proteine recettoriali	(Neu5Gc, Neu5Ac) Aminopeptidasi N	Neu5,9Ac -----	(Neu5,9Ac, Neu4,5Ac) CEACAM1	Neu5Ac ----	--- ACE2

Tabella 26 Attività di legame dei Coronavirus (Da Schwegmann-Wessels e Herrler, 2006).

Sebbene sia noto che il FCoV di tipo II utilizza l'aminopeptidasi (APN) come porta di ingresso nelle cellule, non è noto quale sia il recettore utilizzato dai FCoV di tipo I, i più diffusi in campo e recentemente è stato dimostrato che ligandi dell'acido sialico inibiscono la penetrazione cellulare di FCoV di tipo II (Regan et al., 2010). E' quindi possibile che variazioni dell'acido sialico circolante possano influenzare la quantità di virus "libero" in circolo, influenzando così lo sviluppo di patologia.

Per quanto riguarda il secondo punto, è possibile che oltre a un potenziale ruolo di ligando del virus, l'acido sialico circolante svolga un'importante funzione modulatrice delle risposte infiammatorie, grazie alla sua affinità con le selectine (McEver, 2002; Ley, 2003), molecole che partecipano alla prima fase di "rolling" che precede l'adesione e la fuoriuscita di leucociti dai vasi. L'acido sialico si trova nel siero o legato a proteine o in minor parte sotto forma di acido sialico libero, anche se sembra che quest'ultima parte incida poco sulla sua concentrazione totale nel sangue, mentre l'incremento del TSA durante i processi infiammatori è spesso dovuto ad un incremento delle glicoproteine sieriche (Crook et al, 1994; Tuma e Sorrel, 1984; Chrostek et al, 2007) rappresentate per lo più da proteine di fase acuta (vedasi descrizione della fase acuta nell'introduzione dell'Obiettivo 2). La proteina di fase acuta maggiore del gatto, la α 1- glicoproteina acida (AGP) rappresenta una delle proteine più glicosilate dell'organismo in cui l'acido sialico terminale più comune è quello legato al galattosio in posizione α 2,3 o in quella α 2,6. Nel gatto il suo peso molecolare varia da 46 a 50 kDa; poiché il peso della sequenza amminoacidica è di 21 kDa, si ritiene che la componente oligosaccaridica corrisponda ad almeno il 50% del peso dell'intera proteina (Pocacqua et al., 2005). Effettuando un paragone tra AGP di gatto e umana (hAGP) si è potuto constatare che quella felina si presenta più glicosilata rispetto a quella umana poiché a parità di peso molecolare della parte amminoacidica il peso molecolare complessivo dell'hAGP è inferiore (40-44 kDa). Nell'uomo il tipo di glicosilazione della AGP sembra essere associato a resistenza o a suscettibilità a malattie infettive o immunomediate come l'artrite reumatoide (Pawloski et al., 1989) e l'AIDS (Rabehi et al., 1995).

Nei gatti affetti da FIP si ha un notevole incremento della quantità sierica di AGP il cui livello aumenta da 0-1,5 a 4-8 g/l (Duthie et al., 1997; Giordano et al., 2004a), si è perciò andati ad indagare le eventuali modificazioni post-traduzionali di questa proteina in corso di peritonite infettiva felina. E' stato in particolar modo analizzato il pattern di glicosilazione dell'AGP di animali colpiti dalla patologia e di animali clinicamente sani rilevando che in corso di FIP l'AGP è iposialilata, sia in posizione α 2,3 (sialilazione pari al 44% del normale), sia in posizione α 2,6, (sialilazione pari al 76% dei controlli). E' possibile quindi ipotizzare che la desialilazione di questa proteina in corso di FIP sia connessa con la patogenesi di questa patologia (Cecilianì et al., 2004).

Ulteriori studi hanno preso in considerazione il grado di sialilazione dell'AGP in gatti infettati con FCoV ma asintomatici e la sua eventuale modificazione nel tempo. Alcuni gatti FCoV-positivi hanno presentato fluttuazioni nella concentrazione ematica e nel pattern di glicosilazione dell'AGP, soprattutto per la presenza di ipersialilazioni in posizione α 2,3. Tale aumento è avvenuto in concomitanza con un aumento della carica virale

ambientale associata allo sviluppo di FIP in altri animali del gruppo, nei quali l'AGP è risultata aumentata ma iposialilata (Paltrinieri et al., 2007b; Paltrinieri et al., 2008). Tale riscontro può quindi essere interpretato come un'ulteriore supporto all'ipotesi che l'incremento di sialilazione dell'AGP possa essere associato alla resistenza alla malattia mentre una sua diminuzione possa favorire lo sviluppo della patologia (Cecilianì et al., 2004).

Da quanto sopra riportato emerge come l'acido sialico possa giocare un ruolo fondamentale nella resistenza/suscettibilità al FCoV sia come recettore del virus sia come proteina immunomodulatrice. Mancano però informazioni sull'eventuale relazione tra acido sialico totale e coronavirusi felini, anche perché non sono stati validati, nel gatto, metodi di determinazione del TSA felino. Scopo di questa parte della tesi è proprio quello di validare un metodo per la determinazione dell'acido sialico totale nel siero felino e di valutare le eventuali variazioni nella concentrazione di TSA in gatti con coronavirusi.

Di seguito è descritto l'approccio sperimentale e sono riassunti i principali risultati e considerazioni, da cui è scaturito uno studio pubblicato sulla rivista *Canadian Journal of Veterinary Research* (n° 3 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e Metodi

VALIDAZIONE ANALITICA DEL METODO DI MISURAZIONE DELL'ACIDO SIALICO TOTALE NEL SIERO

Il metodo utilizzato è rappresentato dall'automazione di un kit commerciale (Roche diagnostic, Mannheim, Germania) basato su un principio enzimatico attraverso il quale l'acido sialico legato alle glicoproteine sieriche viene liberato per poi essere scisso in N-acetil-mannosamina e piruvato. Quest'ultimo viene ossidato a formare perossido di idrogeno che viene convertito grazie alla toluidina in composto di colore rosso che può essere misurato mediante uno spettrofotometro automatico (Cobas Mira, Roche diagnostic, Basilea, Svizzera) alla lunghezza d'onda di 550 nm.

Nella fase di validazione sono state effettuate le seguenti prove:

- precisione intra-assay: valutata mediante 5 letture ripetute di un siero nel quale una preliminare lettura aveva permesso di rilevare un'alta concentrazione di TSA (471,42 mg/L), e di uno caratterizzato da bassa concentrazione di TSA (10,79 mg/L). Utilizzando media e deviazione standard delle 5 letture è stato calcolato il CV (deviazione standard/media x 100).
- precisione inter-assay: valutata leggendo in triplicato, in tre sessioni successive, il campione di siero a concentrazione elevata sopra descritto diluito al 50% in soluzione fisiologica e calcolando poi il CV come sopra descritto.
- accuratezza analitica: valutata mediante prova di linearità di diluizione, nella quale il siero a concentrazione elevata sopra citato è stato diluito in soluzione fisiologica in modo da ottenere diluizioni finali del 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125%. Ogni campione è stato sottoposto a 5 letture ed i valori ottenuti sono stati confrontati con quelli attesi in modo da valutare la linearità della risposta.

- LLOQ: determinato in base a media, deviazione standard e CV per delle letture a bassa concentrazione della LUD
- LLOD: valutato leggendo in triplicato il bianco campione

DETERMINAZIONE DEL TSA NEL SIERO FELINO

Sono stati analizzati 108 campioni di siero prelevati da veterinari liberi professionisti ed inviati nel periodo 1997-2007 presso il nostro Dipartimento e conservati in congelatore a -20°C. I campioni in oggetto sono stati scelti tra i circa 1000 archiviati presso il Dipartimento se rispondevano ai seguenti criteri di inclusione: 1) presenza di informazioni relative alla diagnosi; 2) presenza di dati di laboratorio completi; 3) presenza di informazioni relative al follow up; 4) disponibilità di adeguate quantità di campione in buone condizioni di conservazione

In base alle informazioni di cui sopra i sieri sono stati suddivisi nei seguenti gruppi:

- Gruppo A (controlli): 9 campioni prelevati da gatti clinicamente sani, sieronegativi per coronavirus, e privi di alterazioni clinico-patologiche;
- Gruppo B (FCoV-positivi non sintomatici): 48 campioni di siero prelevati da 40 gatti clinicamente sani (alcuni campionati più volte nel tempo), ma positivi a test sierologici (titoli per lo più variabili tra 1:100 e 1:400) e/o PCR nelle feci per coronavirus
- Gruppo C (FIP): 28 campioni prelevati da altrettanti gatti malati di FIP (25 in forma essudativa e 3 in forma non essudativa), come confermato in sede post-mortale
- Gruppo D malattie diverse dalla FIP: 23 campioni prelevati da altrettanti gatti inclusi in precedenti studi (Giordano et al, 2004b; Ceciliani et al., 2004; Paltrinieri et al., 2007a; Paltrinieri et al., 2008) e colpiti da forme neoplastiche o infiammatorie (queste ultime ovviamente non dovute a FIP).

In tutti i campioni in cui tale dato non era stato acquisito al momento della prima diagnosi, la concentrazione ematica di AGP è stata determinata utilizzando un kit presente in commercio (Tridelta feline AGP, Maynoot Co. Kildare, Irlanda), basato sulla metodica di immunodiffusione radiale in gel.

In 9 casi, oltre alla concentrazione di AGP, era stato determinato, in un precedente lavoro (Paltrinieri et al., 2008) anche il grado di sialilazione della AGP stessa, nonché, negli stessi gatti, il titolo anticorpale e la quantità di coronavirus eliminata con le feci.

Su tutti i campioni il TSA è stato poi determinato con il metodo sopra citato, riducendo al minimo le sessioni di lavoro per minimizzare gli effetti della variabilità "inter-assay".

I valori di TSA rilevati nei diversi gruppi sono stati utilizzati per definire, con statistiche descrittive, la media e la deviazione standard, nonché il valore mediano, e l'intervallo di distribuzione al 95° percentile e poi sono stati confrontati tra loro mediante ANOVA non parametrico per dati indipendenti (test di Kruskal-Wallis), seguita da test di Tukey HSD (honest difference test).

La concentrazione di TSA e di AGP rilevata nei prelievi ripetuti degli stessi soggetti è stata confrontata mediante test t per dati appaiati non parametrico di Wilcoxon.

L'eventuale correlazione tra TSA ed AGP è stata verificata mediante test di correlazione di Spearman. Lo stesso test è stato utilizzato, nei 9 soggetti in cui tali dati erano disponibili, per ricercare eventuali correlazioni tra concentrazione di TSA, AGP, carica virale (in termini di numero di copie di RNA nelle feci) e entità di sialilazione della AGP in rapporto a un pool di sieri a titolo noto di sialilazione.

Alla luce della diagnosi finale per ogni osservazione su scala continua corrispondente a valori di TSA o di AGP sono stati calcolati il numero di veri positivi (VP = animali con FIP con valore di TSA o AGP superiore ad ogni specifico valore rilevato), veri negativi (VN = animali senza FIP con valore di TSA o AGP inferiore ad ogni specifico valore rilevato), falsi positivi (FP = animali senza FIP con valore di TSA o AGP superiore ad ogni specifico valore rilevato) e falsi negativi (FN = animali con FIP con valore di TSA o AGP inferiore ad ogni specifico valore rilevato).

Utilizzando i dati di VP, FP, VN, FN, sono stati calcolati, per ogni dato osservato, i valori di specificità e sensibilità e con essi i valori di likelihood ratio e predittività.

I valori di specificità e sensibilità rilevati per ogni valore sono stati confrontati tra loro per definire il punto-valore in cui i due dati si incrociavano, da utilizzare come cut-off che massimizza la resa diagnostica dei due test. E per disegnare una curva ROC per valutare il potere discriminante espresso in termini di differenza rispetto alla linea di identità. Le curve ROC ottenute per TSA ed AGP sono state poi confrontate tra loro per definire la differenza in termini di potere informativo

I valori di sensibilità e specificità, le curve ROC e i rapporti di verosimiglianza sono stati calcolati sia sull'intero campione di animali incluso sia dopo rimozione dal campione dei soggetti con neoplasia cutanea, che non costituiscono, evidentemente, un problema diagnostico compatibile con FIP.

Risultati

Il metodo utilizzato ha mostrato un CV dello 0,6 % sul siero a valore alto di TSA e del 47,5% sul siero a valore basso. Il CV inter-assay, calcolato su siero con concentrazione media rispetto alle precedenti, è risultato essere del 5,3%.

Il risultato della prova di linearità di diluizione (figura 35) ha evidenziato un'ottima linearità (linear fit $P = 0,00$) e ha evidenziato perdita di precisione a valori inferiori a 50 mg/dL (LLOQ). Il LLOD è invece risultato pari a 0.

I livelli di TSA rilevati nei diversi gruppi (tabella 27) hanno evidenziato, nel gruppo di controllo, valori sovrapponibili a quelli rilevati negli animali sani di altre specie (Thougaard et al., 1994).

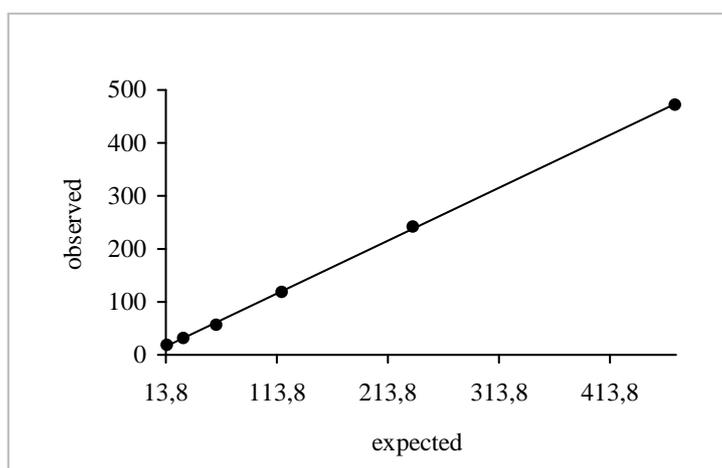


Figura 35 Correlazione lineare tra valori attesi ed osservati nella prova di diluizione.

	Controllo mg/L	FCoV mg/L	FIP mg/L	non FIP mg/L
Media±SD (mediana)	433,5 ± 179,0 (402,4)	385,6 ± 192,2 (379,7)	556,7 ± 268,3 (475,7)	512,6 ± 281,2 (433,8)
Min-Max	265,5-749,8	159,3-995,3	187,2-1174,7	194,1-1099,3

Tabella 27 Livelli di TSA rilevati nei diversi gruppi

Rispetto al gruppo di controllo non si sono rilevati valori significativamente diversi nei gatti FCoV positivi per cui questi due gruppi di animali sono stati considerati un unico gruppo di controllo (A1) la cui concentrazione di TSA è di $393,2 \pm 189,4$ mg/L (mediana = 380,2 mg/L), con range di distribuzione pari a $160,9 \pm 956,9$ mg/L.

Nei gatti con FIP, la concentrazione media di TSA è risultata significativamente più elevata di quella dei gruppi A ($p = 0,017$) e B ($p = 0,002$), ma anche del gruppo A1 ($p=0,002$). Anche i gatti con malattie diverse dalla FIP, nel loro insieme, presentano valori medi di TSA superiori a quelli dei gruppi A ($p = 0,045$), B ($p = 0,034$) e A1 ($p = 0,040$). All'interno di questo gruppo, sono stati poi creati due sottogruppi di numerosità sovrapponibile, quello dei fibrosarcomi iniezione indotti (D1) e quello delle patologie infiammatorie (D2). Il gruppo D1 presenta valori di TSA pari a $546,5 \pm 331,8$ mg/L (mediana 433,8 mg/L, intervallo di riferimento: 211,5-1117,8 mg/L) mentre quello D2 presenta valori di TSA pari a $468,6 \pm 206,7$ mg/L (mediana 445,4 mg/L; intervallo di riferimento: 205,9-789,7 mg/L). Quando i di questi gruppi vengono confrontati tra loro, nonostante un più alto valore medio nel gruppo D1, non si rinvengono differenze statisticamente significative.

La curva ROC disegnata utilizzando i valori di sensibilità e specificità del TSA per la diagnosi di FIP (figura 36) evidenzia una significatività ($p < 0,001$) ma l'area sotto la curva è relativamente ridotta (68%; intervallo di confidenza al 95% = 56-79%).

L'analisi dei valori di sensibilità e specificità evidenzia la massima resa diagnostica a valori pari a 444,3 mg/L di TSA, concentrazione alla quale corrispondono però bassi valori di sensibilità (60,7%), specificità (61,3%) e likelihood ratio (1,57).

Dato che molto dell'acido sialico circolante è legato a proteine e che la più ricca di queste proteine sialilate è l'AGP, sono stati confrontati i valori di AGP rilevati nei diversi gruppi (tabella 28).

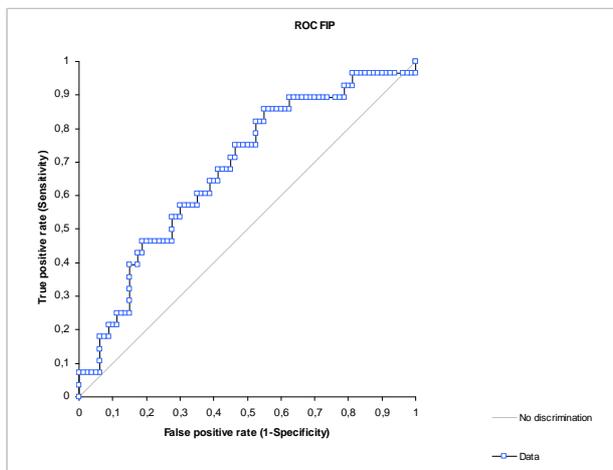


Figura 36 Curva ROC sulla sensibilità e specificità del TSA come metodo diagnostico per FIP

	A	B	C	D2	D1
AGP (mg/mL)	0,43	0,65	3,14	1,25	0,53
	0,23	0,43	1,60	1,29	0,48

Tabella 28 Concentrazione di AGP rilevate nei sieri dei diversi gruppi presi in esame

Solo i gatti con FIP e, in minor misura, quelli con malattie infiammatorie (D2) presentavano valori significativamente diversi da quelli dei controlli. Pur in presenza di una di statistica correlazione tra valori di TSA e ($p = 0,006$) i coefficienti di correlazione sono risultati molto bassi sia considerando la popolazione nel suo insieme ($r^2 = 0,23$), sia considerando separatamente i controlli ($r^2 = 0,02$), i gatti con FIP ($r^2 = 0,14$) e quelli con patologie diverse dalla FIP ($r^2 = 0,65$). L'analisi delle curve ROC (figura 37) rileva performances maggiori per l'AGP (AUC = 96%) di quelle sopra citate per il TSA (58%) (ma $P < 0,001$ in entrambi i casi).

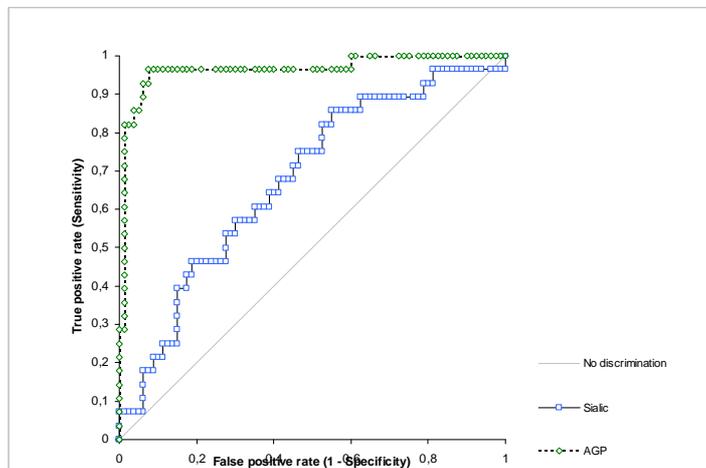


Figura 37 Confronto delle curve ROC circa l'efficienza diagnostica per FIP di AGP e TSA

I risultati dei 9 gatti in cui erano disponibili informazioni circa il grado di sialilazione e lo "status" di portatore/eliminatore di coronavirus sono riportati in tabella 29.

GATTO	MAA (%)	SNAI (%)	AGP (mg/mL x 100)	SIAL (mg/L)	FCoV (copie RNA / 100)	TITOLO / 10
32	86	77	35,35	335,1	143,0	5
34	89	117	77,08	158,1	347,0	320
35	77	116	38,55	176,8	0,3	40
37	86	101	52,20	190,9	0,0	80
38	98	108	23,94	176,8	4,5	40
39	77	96	21,95	200,7	240,0	5
41	66	97	87,77	165,0	213,0	20
43	97	99	87,77	233,3	11,8	10
44	145	87	54,51	307,4	0,0	10

Tabella 29 Dati relativi a concentrazione e grado di sialilazione dell' AGP, stato di portatore/eliminatore di coronavirus e concentrazione ematica di TSA.

L'analisi visiva dei dati sembra evidenziare un certo grado di correlazione negativa tra la concentrazione di TSA e i dati relativi ai coronavirus (titolo anticorpale e copie di RNA rilevate nelle feci) o alla marcatura dell'acido sialico sulla AGP mediante lectina SNA, che evidenzia l'acido sialico in posizione $\alpha 2,3$: i soggetti in cui il TSA è elevato mostrano infatti titoli bassi, poco RNA nelle feci e minore sialilazione in posizione $\alpha 2,3$ rispetto agli altri e viceversa. Tutti gli altri parametri non sembrano molto correlati, con l'eccezione del confronto tra TSA e quantità di acido sialico in posizione $\alpha 2,6$, rilevabile con la lectina SNA, che sembra muoversi, nei diversi gatti, in maniera più o meno parallela al TSA. Al di là delle impressioni "visive" l'analisi di comportamento tra TSA e altri dati ha fornito i risultati statistici riportati in tabella 30.

:

	TSA vs MAA	TSA vs SNA	TSA vs AGP	TSA vs FCoV	TSA vs TITOLO
r ²	0,26	-0,79	-0,24	-0,35	-0,77
P	0,5003	0,0104	0,5275	0,3515	0,0150

Tabella 30 Correlazione di Spearman tra TSA, lectina SNA, AGP e titolo anti-FCoV.

I risultati relativi all'andamento di AGP e TSA in campioni ripetuti degli stessi animali (figura 38) non evidenziano differenze significative tra i prelievi sequenziali

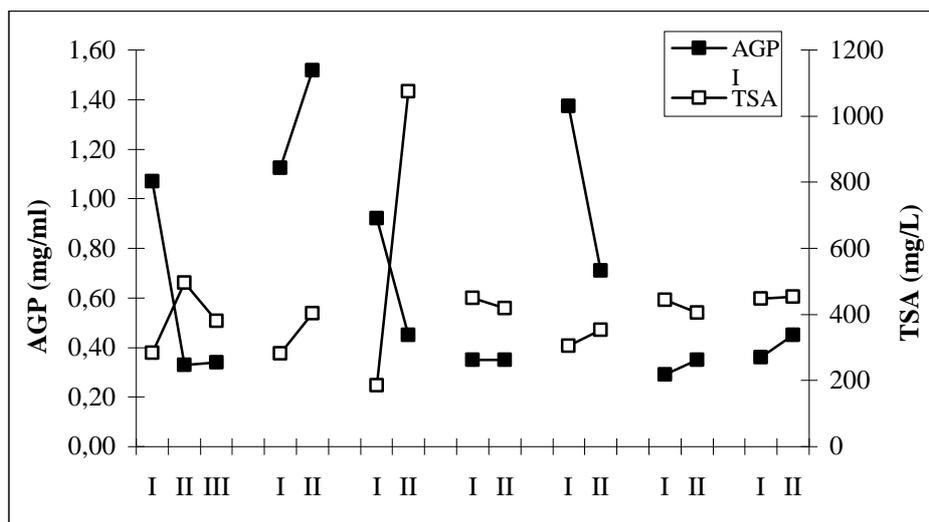


Figura 38 Rappresentazione grafica dei risultati inerenti alla TSA e alla concentrazione sierica di AGP ottenuti in due prelievi effettuati sugli stessi soggetti in tempi successivi

Discussione

I risultati delle prove di validazione hanno evidenziato un elevato livello di precisione a valori di TSA che nelle successive fasi dello studio si sono rivelati corrispondenti all'intervallo di decisione clinica (vedi oltre) ma non accettabile per TSA ridotta bassi, peraltro di molto inferiori al LLOQ, mentre la riproducibilità tra sessioni diverse ha dato risultati soddisfacenti, così come l'accuratezza e la sensibilità analitica (LLOD).

La semplice infezione da coronavirus, in assenza di alterazioni clinico patologiche, non è associata ad alterazioni della concentrazione sierica di TSA.

Al contrario, entrambi i gruppi patologici hanno mostrato elevati valori di TSA, a suggerire che il TSA funge da marker di patologia generico più che da indicatore di uno specifico processo patologico, come già rilevato sia nell'uomo (Sillanaukee, 1999b) che nel cane (Thougaard et al, 1998). Questo sospetto viene confermato dalla curva ROC, che pur in presenza di una significatività statistica, evidenzia una area sotto la curva non particolarmente elevata. Inoltre, questa limitata efficienza diagnostica si evince anche dai valori di sensibilità e specificità, entrambi vicini al 60%: in altri termini, nella sua massima performance diagnostica, il TSA riesce ad identificare correttamente solo il 60% dei veri negativi ed il 60% dei veri positivi e quindi il tasso di errore è pari al 40% in entrambi i casi. Ovviamente, a valori superiori, il tasso di falsi positivi diminuirebbe, ma aumenterebbe notevolmente quello dei falsi negativi. Anche la bassa likelihood ratio indica che la probabilità che un gatto con valori di TSA superiori al cut-off abbia la FIP sono molto simili a quelle di non avere la malattia. Utilizzando il LR è però possibile calcolare la probabilità di malattia in funzione della percezione che si aveva della possibilità di malattia pre-test. In altri termini, nel caso di un gatto con storia anamnestica e clinica e con sintomi compatibili con FIP certezza anche valori alti di TSA possono supportare la diagnosi.

L'andamento dei valori di AGP è invece diverso da quello del TSA in quanto aumenta soprattutto nei gatti con FIP, e questo fa sì che la resa diagnostica evidenziata dalle curve ROC sia migliore per AGP che non per

TSA. Ciò suggerisce che non esiste una stretta correlazione tra AGP e TSA e tale ipotesi è confermata dai bassi coefficienti di correlazione rilevati.

Seppure basati solo su pochi dati, i risultati relativi alla correlazione tra TSA e altri parametri associati a coronavirusi o a sialilazione dell'AGP sembrano indicare che in presenza di alti livelli di acido sialico la colonizzazione del virus e la risposta anticorpale contro di esso sono ridotte, a conferma delle ipotesi precedentemente emesse circa il possibile ruolo di tale molecola nel conferire resistenza alle coronavirusi (Paltrinieri et al., 2008). I dati relativi al rapporto tra TSA e sialilazione dell'AGP infine sembrano confermare quanto supposto in precedenza circa la relativa indipendenza dei due parametri, a conferma che sono probabilmente altre le proteine sialilate responsabili dei livelli di acido sialico totale nel siero. Tale supposizione è confermata anche dall'analisi dei prelievi ripetuti, che non ha evidenziato analogie tra le fluttuazioni di TSA e AGP.

In conclusione, in questa parte della tesi è stato possibile validare la metodica di determinazione dell'acido sialico totale nel siero felino, rilevando ottime caratteristiche di precisione o accuratezza a valori clinicamente rilevanti. Il TSA sembra essere legato alla presenza di patologie più che a quella di FIP o di semplici coronavirusi, tanto da non assumere valore diagnostico per FIP se non in presenza di un'elevata probabilità pre-test di malattia. A questo scopo è molto più utile fare riferimento ai valori di AGP, che invece mostrano performances diagnostiche migliori, e che, pur essendo riferiti ad una proteina altamente sialilata, seguono un andamento diverso da quello del TSA. Ciò porta a concludere che l'AGP contribuisca solo marginalmente al TSA nel gatto. L'analisi dei dati in funzione della quantità di escrezione virale e del grado di sialilazione dell'AGP hanno permesso di rilevare alti livelli di TSA nei soggetti in cui la carica virale e la risposta anticorpale sono ridotte, suggerendo che il TSA può essere in qualche modo coinvolto nella "protezione" nei confronti dei coronavirus.

VALIDAZIONE DI UN METODO IN FASE SOLIDA PER L'ANALISI DEL TIPO DI SIALILAZIONE DI PROTEINE PLASMATICHE E TISSUTALI E APPLICAZIONE NELLO STUDIO DEI TUMORI MAMMARI DEL CANE

La famiglia delle sialiltransferasi (EC 2.4.99.1) è una classe di glicosiltransferasi che trasferiscono l'acido sialico da un substrato donatore ad un substrato accettore polisaccaridico, secondo la seguente reazione:



CMP: citosina 5' monofosfato

SA: acido sialico

Tutte le sialiltransferasi sono caratterizzate da una tipologia di tipo II trans membrana e hanno una struttura comune composta da una breve coda citoplasmatica N-terminale, un dominio trans membrana, una regione chiamata 'peduncolare', ed un dominio catalitico.

Fino ad oggi sono stati identificati 20 membri della famiglia delle sialiltransferasi, raggruppati nelle seguenti quattro famiglie a seconda del legame carboidrato-acido sialico che esse catalizzano:

- 1) β -galactoside α 2,3 sialiltransferasi (ST3Gal I-VI): i membri di questa famiglia trasferiscono l'acido sialico dal donatore al galattosio mediante un legame α 2,3.
- 2) β -galattoside α 2,6 sialiltransferasi (ST6Gal I e II): i membri di questa famiglia trasferiscono l'acido sialico dal donatore al residuo terminale del galattosio attraverso un legame α 2,6.
- 3) GalNAc α 2,6 sialiltransferasi (STGalNAc I-VI): la sigla GalNAc significa 'galattosio N-acetilneuraminico'. I membri di questa famiglia trasferiscono l'acido sialico dal donatore ai residui N-acetylgalattosaminici delle glicocatene attraverso un legame α 2,6.
- 4) α 2,8-sialiltransferasi (ST8Sia I-VI): i membri di questa famiglia trasferiscono l'acido sialico dal donatore al residuo terminale delle glicocatene attraverso un legame α 2,8.

Questi enzimi regolano l'espressione di particolari molecole di adesione che, come accennato in precedenza, è un evento cruciale anche nel processo di trasformazione neoplastica e nella sua metastatizzazione. Durante lo sviluppo della malattia si hanno notevoli modificazioni delle glicoproteine presenti sulla superficie delle cellule tumorali associate ad una aberrante glicosilazione (Narayanan, 1994), cui conseguono modificazioni funzionali (Kim e Varki, 1997). Le modificazioni più caratteristiche delle sialilazioni associate a neoplasia sono:

- 1) variazione di struttura e legami dell'acido sialico (Kim e Varki, 1997). Tale variazione permette il riconoscimento da parte delle selectine, che facilitano così l'interazione tra cellule maligne e piastrine, leucociti ed endotelio, facilitando la comparsa di metastasi (Varki e Varki, 2002).

- 2) Incremento di contenuto di acido sialico nelle cellule tumorali. Ciò protegge queste cellule dall'attivazione del complemento mediata dal reclutamento del fattore plasmatico H e dal suo successivo alla membrana. D'altro canto, le stesse cellule tumorali sembrano secernere tale fattore, contribuendo quindi al fenomeno sopra descritto (Ajona et al, 2004).
- 3) Sialilazione delle mucine secrete dalle cellule tumorali o rilasciate nello spazio extracellulare in seguito a morte della cellula neoplastica (Rhodes, 1999).
- 4) Comparsa di acido sialico non normalmente rilevabile nel siero umano (Neu5Gc) e di anticorpi contro proteine contenenti Neu5Gc (Malykh et al., 2001). Si pensa che ciò avvenga perché la presenza di una debole risposta immunitaria è in realtà utile alle cellule tumorali (Tangvoranuntakul et al., 2003), perché induce angiogenesi e infiltrazione leucocitaria.

Le alterazioni di cui sopra sono spesso dipendenti da alterazioni nell'attività sialiltrasferasica. L'attività dell'enzima ST6Gal I aumenta nella maggior parte dei campioni di tessuto prelevati da tumori colon-rettali umani (Dall'Olio et al., 1989). Ulteriori studi hanno dimostrato un'espressione ancora più elevata nelle metastasi, rispetto ai tumori primari (Gessner et al., 1993). La presenza dell'acido sialico legato in posizione $\alpha 2,6$ può modulare le interazioni biologiche in due modi possibili: per prima cosa mascherando le sottostanti catene di zuccheri (ovvero le sequenze di lattosamina) ed ostacolando la loro interazione con specifiche lectine di galattosio (galectine); in secondo luogo mediante l'interazione diretta con specifiche lectine legate all'acido sialico (siglects: sialic acid binding Ig-like lectins) (Passaniti e Hart, 1988).

Tuttavia esistono diverse discrepanze negli studi condotti in medicina umana circa l'effettivo ruolo della sialiltrasferasi, soprattutto per quel che riguarda un suo possibile impiego in diagnostica come marker diagnostico e/o come marker di progressione o di prognosi in soggetti portatori di neoplasia. In particolare, i primi studi relativi a tale enzima sostengono che la sensibilità e la specificità della sialiltrasferasi come marker tumorale siano limitati (Bergè et al., 1984). Tale studio, infatti ha riscontrato un'elevata attività della ST in tessuti normali come la ghiandola salivare, la tiroide e il fegato, mentre livelli più bassi della sua attività si sono riscontrati a livello di diversi altri tessuti. Inoltre la quantità dell'attività enzimatica nei tessuti non era tanto diversa dai livelli di ST nel siero. La comparazione dei livelli di attività sialiltrasferasica (ST) di tessuti tumorali con quelli rilevabili nei corrispondenti tessuti normali dello stesso individuo, permette di rilevare solo aumenti di modica entità. Infatti solo una piccola percentuale di tumori (20%) è caratterizzata da un significativo aumento della quantità di ST. Inoltre, tale aumento invece che essere il risultato di una massiva produzione tumorale dell'enzima, potrebbe originare da una reazione infiammatoria o proliferativa da parte dei circostanti tessuti normali ed è in parte rilevabile anche in pazienti con artrite reumatoide o con altre patologie non neoplastiche. Altri studi rilevano che il controllo dell'attività delle sialiltrasferasi nelle cellule è multifattoriale e il tessuto d'origine gioca sicuramente un ruolo rilevante. In vivo nelle cellule del sistema nervoso embrionale nell'iniziale fase di adesione cellulare e di sinaptogenesi c'è una down-regolazione dell'attività delle sialiltrasferasi, con

conseguenti alterazioni nell'espressione dello sviluppo delle sialoglicoproteine che causano così alterazioni nel pattern neuronale e conseguenti deficit embrionali (Cookman et al., 1987; Edelman e Chuong., 1982).

Cellule tumorali colon-rettali contengono un alto livello di sialiltransferasi, in particolare del tipo $\alpha 2,6$, ma in alcune condizioni sono attivate anche le sialiltransferasi $\alpha 2,3$ (Weinstein et al, 1982).

Inoltre sono stati condotti diversi studi sull'acido sialico totale, sulle proteine sialilate in $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,3$, e sull'attività enzimatica di $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$ sialiltransferasi nei tessuti e nel siero durante al monitoraggio di tumori del cavo orale nell'uomo. Tali studi hanno permesso di valutare l'importanza sia dell'acido sialico che delle sialiltransferasi nella diagnosi, nella prognosi e nel monitoraggio del trattamento con farmaci antitumorali (Manisha et al., 2008). Un recente studio suggerisce che l'inibizione dell'acido sialico sulla superficie cellulare potrebbe fornire un target terapeutico anti-metastasi (Hsu et al., 2005). Mediante l'uso delle lectine SNAI e MAA per la discriminazione delle sialoproteine $\alpha 2,6$ e $\alpha 2,3$ in pazienti con tumori del cavo orale e in stadio precanceroso si sono potuti evidenziare diversi aspetti importanti: entrambi gli enzimi sono associati con il potere invasivo e metastatico dei tumori orali, e le variazioni di sialilazione di tipo $\alpha 2,6$ sono associate con l'invasività del tumore (Dall'Olio e Trere, 1993). Analisi ripetute hanno evidenziato una correlazione positiva tra le sialoproteine $\alpha 2,6$ e la bassa differenziazione dei tumori e lo stadio avanzato della patologia. In tale contesto si è evidenziato che $\alpha 2,3$ ST è maggiormente associata all'ipersialivazione durante le prime fasi dello sviluppo tumorale, mentre $\alpha 2,6$ ST è associata alla progressione della patologia e alle metastasi. Ciò suggerisce che le isoforme possano avere un ruolo diverso durante lo sviluppo della patologia e che l'aumentata sialilazione sulla superficie cellulare aiuti le cellule tumorali a "scappare" dal sito primitivo (Gessner et al., 1993).

L'aumento dell'attività enzimatica della ST nel siero è dovuto o a secrezione da parte delle cellule neoplastiche o ad un rilascio che avviene durante la degradazione cellulare. Una delle cause che regolano la comparsa di tali enzimi nel siero potrebbe essere legata al loro rilascio a partire dai costituenti delle membrane plasmatiche all'interno delle cellule circolanti appartenenti al sistema immunitario (Chatterjee et al., 1979).

L'analisi dell'attività sialiltrasferasica e del tipo di sialilazione è ostacolata dalla scarsità di metodi applicabili su larga scala. I metodi per determinare il tipo di sialilazione solitamente sfruttano l'affinità dell'acido sialico per le lectine. Tali metodi possono analizzare sia l'acido sialico circolante, dopo immobilizzazione su molecole asialilate, sia l'acido sialico espresso su proteine purificate e/o separate dal siero e fatte migrare elettroforeticamente, sia le molecole di acido sialico presenti in sezioni di tessuto (Drake et al., 2006; Shah et al., 2008). In particolare, per quanto riguarda la sialilazione in posizione $\alpha 2,3$ e $\alpha 2,6$, sul materiale preparato come sopra descritto, vengono applicate le lectine MAA o SNAI, rispettivamente (vedi materiale e metodi).

Dato che la sialiltransferasi è una proteina, sono stati messi a punto metodi tesi a valutare la sua espressione a livello di mRNA (Yamamoto et al., 1997) e metodi immunoenzimatici, applicabili sia su fluidi biologici o omogeneati cellulari che su tessuti, basati su immunofluorescenza (Berger e Hersford, 1985), ELISA (Futakawa et al., 2009), radioimmunologia e immunistochimica.

Tali metodi sono quindi quantitativi e permettono di rilevare la presenza/assenza dell'enzima o, per quanto riguarda i tessuti, la sua distribuzione e/o localizzazione ma non permettono di stabilire l'entità dell'attività dell'enzima. La semplice presenza di un enzima, né tantomeno la presenza dell'mRNA che lo codifica, però, non implicano che l'enzima stesso sia funzionante.

Per ottenere questa informazione devono invece essere utilizzati metodi in grado di identificare la attività sialiltransferasica: dato che l'effetto ultimo della sialiltransferasi è quello di "spostare" acido sialico da un donatore a una molecola che funge da accettore, sono stati messi a punto metodi in grado di rilevare quanto l'eventuale enzima presente in siero e/o tessuti è attivo, cioè quanto è in grado di catalizzare la reazione per cui è specifico. Generalmente gli accettori ideali sono molecole non sialilate che espongono residui affini all'acido sialico, quali ad esempio il galattosio, il quale presenta siti di sialilazione diversi. Se all'accettore viene donato acido sialico si può verificare un legame $\alpha 2,6$ o $\alpha 2,3$ a seconda che nel campione sia presente l'una o l'altra sialiltransferasi.

I metodi di valutazione dell'attività sialiltransferasica si basano sull'utilizzo di accettori asialilati a cui viene aggiunto acido sialico immettendo nella reazione un donatore di acido sialico (cioè una molecola sialilata che tende a "perdere" acido sialico con facilità), in presenza del campione in esame: a seconda della ST maggiormente attiva, avverrà l'uno o l'altro tipo di sialilazione e la posizione in cui l'acido sialico si è andato a fissare viene rilevata utilizzando le lectine citate in precedenza. Fermo restando il principio della metodica sopra esposto, nel tempo sono stati proposti numerosi approcci per rilevare l'avvenuto legame. In alcuni casi sono stati usati accettori specifici (diversi a seconda del tipo di sialilazione da evidenziare) seguiti dalla rilevazione della positività mediante utilizzo di acido sialico marcato radioattivamente (Kiljański et al., 2005) o complessi sistemi robotizzati in grado di fissare lectine su microchip (Halliday et al., 2001). Tali sistemi hanno lo svantaggio di essere particolarmente complessi, costosi, delicati da un punto di vista analitico e in alcuni casi pericolosi per gli operatori. Esistono però sistemi che utilizzano il principio analitico sopra descritto in piastre ELISA, con rilevazione colorimetrica della reazione (Mattox et al., 1992; Yeh and Cummings, 1996).

La disponibilità di metodi per la caratterizzazione del tipo di sialilazione e dell'attività sialiltrasferasica presenti in siero e tessuti permetterebbe di acquisire informazioni utili non solo da un punto di vista della sanità animale, ma anche dal punto di vista dell'oncologia comparata, soprattutto in presenza di tumori, come quello mammario della cagna, dal comportamento biologico simile a quello della loro controparte umana.

Scopo di questa parte della tesi è quello di testare questi metodi ELISA su campioni di siero e tessuti canini dopo omogeneizzazione e i paragonare i risultati, per quanto riguarda i tessuti, con quelli ottenibili mediante marcatura con lectine delle glicoproteine di membrana in sezioni istologiche.

Di seguito è descritto l'approccio sperimentale e sono riassunti i principali risultati e considerazioni, da cui è scaturito uno studio presentato al VI congresso nazionale AIPVet (N. 10 dell'elenco delle pubblicazioni) ed accettato per la pubblicazione dalla rivista *Veterinary Pathology* con "major revision" (N. 21 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e Metodi

PRINCIPIO DEL METODO

Il metodo utilizzato descritto da Mattox et al. (1992) e da Yen e Cummings (1996) si basa sull'utilizzo di asialofetaina, che funge da accettore di acido sialico, che viene adsorbita sui pozzetti di una piastra ELISA. Dopo aggiunta di un donatore di acido sialico (citosina 5'-monophospho-N-acido acetil neuraminico o CMP-NeuAc) e del campione in esame, l'acido sialico rilasciato dal CMP-NeuAc si legherà al galattosio dell'accettore in posizione $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ a seconda che nel campione in esame sia presente prevalentemente sialiltrasferasi $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ rispettivamente. Per rilevare in che posizione si è legato l'acido sialico vengono utilizzate le lectine MAA o SNAI, estratte da *Maackia Amurensis* e *Sambucus Nigra*, rispettivamente, ed in grado di legarsi l'una l'acido sialico in posizione $\alpha 2,3$, l'altra l'acido sialico in posizione $\alpha 2,6$. Tali lectine sono biotinilate e dopo aggiunta del complesso avidina-perossidasi e di un cromogeno (diaminobenzidina o DAB), emettono un segnale colorato che può essere poi rilevato spettrofotometricamente. Rispetto al protocollo originale, abbiamo effettuato alcune modifiche per potere valutare oltre alla attività sialiltrasferasica, anche il tipo di sialilazione "nativo": abbiamo quindi voluto verificare se la semplice aggiunta di siero o omogenati di tessuti, in assenza di donatori di acido sialico, fosse in grado di far rilevare una prevalente presenza di acido sialico $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$. Sono stati quindi allestiti, oltre ai pozzetti contenenti CMP-NeuAc e siero o omogeneati di tessuto, anche dei pozzetti contenenti solo siero o omogeneati di tessuto, procedendo poi alla rilevazione del segnale. I dettagli del metodo sono i seguenti:

- i pozzetti di una ELISA a fondo piatto sono stati riempiti con 100 μ l di tampone bicarbonato pH 9,6 (Na₂CO₃ 150 mM, NaHCO₃ 348mM, 0,02% NaN₃) contenenti 2 mg/mL di asialofetaina bovina (Asialofetuin from fetal calf serum, type I, Sigma Aldrich, Saint Louis, MO, USA);
- dopo incubazione a temperatura ambiente per una notte, la piastra è stata lavata tre volte con 300 μ l di PBS/NaN₃ con un sistema automatico per lavaggio di piastre ELISA (Biorad Microtech, California);
- dopo i lavaggi, ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 300 μ l di una soluzione bloccante (1% BSA in PBS con 0,05% di sodio azide NaN₃);
- dopo 2 ore di incubazione la piastra è stata lavata come sopra descritto, utilizzando la stessa soluzione di lavaggio addizionata di Tween 20 allo 0,05%;
- ogni campione è stato diluito in un volume finale di 100 μ l (in proporzioni diverse nelle varie prove sotto descritte) in tampone cacodilato 50mM, pH 6.5, contenente albumina bovina (bovine serum albumin o BSA, 10 mg/ml) sia in presenza che in assenza di CMPNeuAc (50 μ M) e MnCl₂ (10mM);

In particolare, per ogni campione è stato preparato un volume di reazione sufficiente a riempire otto pozzetti, in maniera da poter testare in doppio ognuna delle 4 condizioni sperimentali, rappresentate da:

- incubazione in assenza di CMPNeuAc e rilevazione con lectina MAA;
- incubazione in presenza di CMPNeuAc e rilevazione con lectina MAA;

- incubazione in assenza di CMPNeuAc e rilevazione con lectina SNAI;
- incubazione in presenza di CMPNeuAc e rilevazione con lectina SNAI;
- la piastra è stata incubata a temperatura ambiente per 2 ore;
- dopo tre lavaggi effettuati come sopra descritto, ai pozzetti destinati alla valutazione dell'attività della sialiltransferasi α 2,3 sono stati aggiunti 100 μ l di lectina MAA (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e a quelli destinati alla valutazione dell'attività della sialiltransferasi α 2,6 sono stati aggiunti 100 μ l di lectina SNAI (Vector Laboratories). Entrambe le lectine erano diluite in PBS alla concentrazione di 2 μ g/mL;
- la piastra è stata quindi incubata per 1 ora a temperatura ambiente;
- dopo tre lavaggi eseguiti come sopra descritto ad ogni pozzetto sono stati aggiunti 100 μ l di complesso avidina-perossidasi (soluzione ABC kit, Vector Laboratories);
- la piastra è stata incubata 1 ora a temperatura ambiente e lavata come sopra descritto e ai pozzetti sono stati aggiunti 100 μ l di substrato della perossidasi (perossidasi e tetrametilbenzidina) ricostituito al momento dell'uso come indicato dal produttore del reagente (R&D System, Minneapolis, MN, USA);
- la piastra è stata quindi lasciata incubare a temperatura ambiente verificando la comparsa di colore visivamente ed arrestando la reazione dopo tempi variabili nelle diverse prove di messa a punto, mediante aggiunta, ad ogni pozzetto, di 50 μ l di soluzione di stop, costituita da acido solforico 0,2N;
- la densità ottica dei pozzetti è stata letta con un lettore di piastre (Labsystems Multiskan MS, Dasit, Cornaredo, Italy) utilizzando la lunghezza d'onda di 450 nm utilizzando la lunghezza d'onda di 540 nm come riferimento, in grado di rilevare la positività "di fondo"

FAMILIARIZZAZIONE E VALIDAZIONE DEL TEST

Per la prima fase di validazione del metodo su fase solida sono stati utilizzati pool di sieri di cane, selezionati indipendentemente dalla presenza o meno di patologie.

Prima prova: per prendere confidenza con la metodica e verificare la reattività dei diversi componenti della reazione e di trarre informazioni preliminari relative ad accuratezza e precisione (ripetibilità) del metodo si è utilizzato come donatore di acido sialico un campione di ascite di gatto con peritonite infettiva felina nel quale, durante uno studio precedente (Rossi e Paltrinieri, 2009), era stata riscontrata un'elevata concentrazione di acido sialico. La piastra è stata caricata come in tabella 31

	Donatore di acido sialico (ascite felina): dil 25% in PBS						Donatore di acido sialico (ascite felina): dil 50% in PBS					
MAA	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
SNAI	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50
	C1	C5	C10	C25	C50	C0	C0	C1	C5	C10	C25	C50

Tabella 31 Schema di caricamento della piastra nella prova 1 (C = quantità di campione utilizzata, in μ l)

In tutti e i pozzetti è stato posto il pool di sieri (100 μ l) in maniera da avere, per ogni condizione di lavoro, 3 replicati con una certa concentrazione di campione (0, 1, 5, 10, 25 e 50 μ l) ed un pozzetto di controllo. Seconda prova: per definire la concentrazione ottimale di campione è stato utilizzato CMPNeuAc invece dell'ascite felina, e la piastra è stata caricata come in tabella 32.

	CMPNeuAc	50 μ l tampone + 50 μ l campione diluito in PBS						diluizione diretta del campione nel tampone					
MAA	Si	10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
		10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
	No	10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
		10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
SNA	Si	10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
		10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
	No	10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%
		10	20	30	40	50	0	0%	10%	20%	30%	40%	50%

Tabella 32 Schema di caricamento della piastra nella prova 2 (C = quantità di campione utilizzata, in μ l)

In particolare, dato che il metodo originale prevedeva la "diluizione del campione in un volume finale di 100 μ l senza specificare se la concentrazione di tampone andasse mantenuta costante o meno, la piastra è stata suddivisa idealmente in due metà, una delle quali è stata caricata con un volume costante di tampone, in modo da non fare variare le condizioni di pH in funzione della quantità di campione immessa nei diversi pozzetti, e successivamente è stato aggiunto un volume costante di campione diluito a diverse concentrazioni in PBS; nella seconda metà della piastra, invece, sono state preparate preliminarmente concentrazioni variabili di campione mediante diluizione diretta nel tampone: in altri termini in questa seconda metà della piastra sono state poste concentrazioni crescenti di campione nel tampone in modo da verificare l'effetto della diluizione ma variando anche la concentrazione dei costituenti del tampone stesso.

Gi altri passaggi della prova sono stati effettuati come previsto dal metodo originale.

Terza prova: si è svolta come la precedente, utilizzando solo le due concentrazioni di campione che nella prova precedente sembravano dare le migliori caratteristiche di positività. In particolare la piastra è stata caricata come in tabella 33.

	CMPNeuAc	50 μ l tampone + 50 μ l campione diluito in PBS			diluizione diretta del campione nel tampone		
MAA	Si	0	25	50	0%	25%	50%
		0	25	50	0%	25%	50%
	No	0	25	50	0%	25%	50%
		0	25	50	0%	25%	50%
SNAI	Si	0	25	50	0%	25%	50%
		0	25	50	0%	25%	50%
	No	0	25	50	0%	25%	50%
		0	25	50	0%	25%	50%

Tabella 33 Schema di caricamento della piastra nella prova 3 (C = quantità di campione utilizzata, in μ l)

VALUTAZIONE DELL'UTILITA' DEL TEST IN CANI SANI E CON NEOPLASIE

La parte di verifica dell'utilità del test in oggetto è stata invece eseguita su 7 campioni di sangue prelevati da 3 cani sani e privi di alterazioni ematologiche o biochimiche e da 4 cani affetti da neoplasia mammaria, campionati all'atto della chirurgia, di cui erano note informazioni circa la presenza di macrometastasi (ricercate radiologicamente). Sui sieri patologici sono state eseguite le prove ematologiche e biochimiche di routine per valutare l'eventuale presenza di patologie sistemiche associate alla neoplasia.

Dai 4 cani con tumori e da uno dei soggetti sani, campionato durante ovario isterectomia, sono stati prelevati anche campioni di tessuto mammario. Tali campioni sono stati posti in parte in formalina tamponata, inclusi in paraffina e destinati all'allestimento di sezioni microtomiche dello spessore di 5 μ m, da destinare all'esame istologico di routine teso a classificare i tumori secondo Misdorp et al. (1999) e a rilevare l'eventuale presenza di micro metastasi nei linfatici o nei linfonodi satelliti, e da destinare alla colorazione istochimica con lectine.

Parte del tessuto è stata invece congelata in azoto liquido e usata per preparare sezioni criostatiche (5 μ m di spessore) per la colorazione con lectine. Il resto del tessuto è stato immerso in 300 μ l di tampone fosfato (PBS, pH 7,6) e omogeneizzato manualmente. Dopo centrifugazione, il surnatante è stato trasferito in un'altra provetta e conservato a -20° fino al momento delle analisi tese a valutare la sialilazione su fase solida.

Sui campioni di siero e tessuto preparati come sopra descritto la sialilazione e l'attività sialitrasferasica sono stati valutati mediante il metodo messo a punto nella fase di validazione. In particolare, in ogni colonna della piastra sono stati posti i campioni riferibili ad un singolo campione di siero o omogenato di tessuto. Alla luce delle prove preliminari si è scelto di utilizzare la metodica diretta, diluendo direttamente il campione nel tampone alla concentrazione del 25%.

In ogni prova sono stati registrati valori di densità ottica (D.O.) rilevati in ognuno dei pozzetti. I valori relativi ai diversi pozzetti in cui lo stesso campione era stato posto in duplicato sono stati usati per calcolare la media

delle letture e ottenere quindi il valore relativo ad ogni pozzetto. I valori sono stati quindi espressi direttamente come D.O.. In ogni prova è stato poi sottratto al valore dei singoli campioni quello del "bianco reattivo", cioè del pozzetto contenente la miscela di reazione priva del campione, in modo da valutare eventuali variazioni in aumento rispetto al bianco reattivo mediante analisi della varianza non parametrica di Kruskal Wallis seguita da test di Bonferroni.

Inoltre è stata calcolata con un test t per dati appaiati di Wilcoxon la differenza percentuale tra il campione con e quello senza donatore di acido sialico in modo da verificare il tipo di sialilazione indotta dalla sialiltransferasi sierica. La differenza tra cani sani e patologici è stata calcolata con test di U Mann-Withney. In queste prove la significatività delle differenze tra campioni incubati con e senza CMPNeuAc è stata valutata sempre con test di Wilcoxon sia sull'intera popolazione che dopo suddivisione dei risultati nei due gruppi (sano e patologico).

Le sezioni di tessuto sono anche stati utilizzati per evidenziare l'acido sialico tissutale e della sua conformazione ($\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$) è mediante colorazione con lectine. A questo scopo i vetrini paraffinati sono stati de paraffinati in passaggio di alcoli. Sia nei vetrini congelati che in quelli paraffinati sono state inibite le perossidasi endogene mediante incubazione a temperatura ambiente con acqua ossigenata. E' stato quindi effettuato un blocking delle reazioni aspecifiche incubando i vetrini in tampone Tris, pH 7,6 addizionato di BSA all'1% (30 minuti a temperatura ambiente). Dopo lavaggi in Tris sono state applicate le lectine MAA e SNAI biotinilate, diluite rispettivamente 1:500 e 1:1000 in tampone Tris, pH 7,6 addizionato di BSA 1%. In ogni prova una delle sezioni di ogni campione è stata utilizzata come controllo negativo, sostituendo le lectine con tampone Tris a pH 7,6. Dopo un'ora di incubazione e lavaggi in Tris è stato applicato il complesso avidina-biotina-perossidasi (ABC) per 30 minuti a temperatura ambiente. Dopo lavaggi in Tris è stato applicato il cromogeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB, Peroxidase substrate kit, Vector Laboratories) e a reazione avvenuta (45 secondi circa) la colorazione è stata bloccata mediante immersione in acqua. I vetrini sono stati quindi controcolorati con Emallume di Mayer (2 minuti), passati in concentrazioni crescenti di alcoli e coprioggettati.

Risultati

PROVE DI VALIDAZIONE

I risultati della prima prova (tabella 34) indicano che la densità ottica rilevata mediante colorazione con lectina MAA è sempre stata inferiore a quella rilevata con lectina SNAI, a suggerire una maggiore presenza di ST $\alpha 2,6$. Inoltre si rileva un'alta variabilità individuale soprattutto per la sialilazione in posizione $\alpha 2,3$. Il confronto dei valori rilevati a concentrazioni diverse di campione evidenzia una segnale rilevabile chiaramente e non influenzato dal colore di fondo del bianco reattivo per volumi superiori a 25 μ l. I risultati della seconda prova (tabella 35) confermano l'elevata intensità di segnale dopo colorazione con lectina SNAI. L'aggiunta di CMP-NeuAc riduce l'intensità di segnale in tutti i pozzetti incubati con MAA ma la aumenta nei pozzetti incubati con SNAI. Il segnale è comunque soddisfacente a concentrazioni superiori al 20%.

DILUIZIONE ASCITE	µL CAMPIONE	D.O. MAA media ± DS (CV)	DIFF. vs 0 µl	D.O. SNAI media ± DS (CV)	DIFF. vs 0 µl
25%	0	0,83 ± 0,06 (6,9%)		0,99 ± 0,05 (5,2%)	
	1	0,81 ± 0,30 (37,5%)	-0,02	1,60 ± 0,55 (34,2%)	0,61
	5	0,67 ± 0,12 (17,7%)	-0,17	1,45 ± 0,56 (38,6%)	0,47
	10	0,76 ± 0,20 (26,2%)	-0,07	2,09 ± 0,02 (0,7%)	1,10
	25	0,89 ± 0,09 (9,9%)	0,06	1,92 ± 0,19 (10,1%)	0,93
	50	0,87 ± 0,25 (28,7%)	0,04	2,24 ± 0,09 (4,2%)	1,25
50%	0	0,76 ± 0,06 (8,2%)		1,58 ± 0,59 (37,2%)	
	1	0,70 ± 0,07 (9,9%)	-0,06	2,01 ± 0,42 (20,8%)	0,43
	5	0,67 ± 0,17 (25,2%)	-0,09	2,03 ± 0,15 (7,2%)	0,45
	10	0,67 ± 0,06 (8,7%)	-0,09	2,01 ± 0,13 (6,7%)	0,43
	25	0,87 ± 0,04 (5,1%)	0,11	2,28 ± 0,08 (3,3%)	0,70
	50	0,86 ± 0,04 (5,3%)	0,10	2,44 ± 0,18 (5,3%)	0,86

Tabella 34 Risultati della prima prova di validazione (D.O. = densità ottica; CV = coefficiente di variazione)

TIPO DI DILUIZIONE	QUANTITÀ O CONCENTRAZIONE DEL CAMPIONE	MAA				SNAI			
		BASALE		CMP-NEUAC		BASALE		CMP-NeuAC	
		D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0
DILUIZIONE DIRETTA DEL CAMPIONE NEL TAMPONE	0 %	0,57		0,43		1,21		0,75	
	10 %	0,61	0,04	0,49	0,07	0,99	-0,22	1,81	1,05
	20 %	0,60	0,03	0,50	0,08	1,23	0,02	1,77	1,02
	30 %	0,55	-0,02	0,50	0,08	1,35	0,14	1,72	0,97
	40 %	0,64	0,07	0,53	0,11	1,48	0,26	1,77	1,02
	50 %	0,64	0,07	0,53	0,11	1,54	0,33	1,60	0,85
50 µL TAMPONE + 50 µL CAMPIONE DILUITO IN PBS	0 µl	0,65		0,47		1,02		0,74	
	10 µl	0,66	0,01	0,51	0,03	1,62	0,60	1,83	1,08
	20 µl	0,66	0,01	0,52	0,05	1,70	0,68	1,89	1,14
	30 µl	0,71	0,05	0,55	0,07	1,73	0,71	1,88	1,14
	40 µl	0,62	-0,03	0,50	0,02	1,68	0,67	1,84	1,09
	50 µl	0,63	-0,03	0,50	0,03	1,69	0,68	1,82	1,08

Tabella 35 Risultati della prima prova di validazione (D.O. = densità ottica)

I risultati della terza prova (tabella 36) confermano i risultati precedenti per quanto riguarda la prevalenza del segnale SNAI e le variazioni dopo aggiunta di acido sialico e ha evidenziato una maggiore linearità di reazione (dose-dipendente) nei campioni con diluizione diretta del campione e alla concentrazione del 25% mentre con concentrazioni del 50% si osserva una diminuzione di segnale forse dovuta ad esaurimento del substrato.

TIPO DI DILUIZIONE	QUANTITÀ O CONCENTRAZIONE DEL CAMPIONE	MAA				SNAI			
		BASALE		CMP-NeuAC		BASALE		CMP-NeuAC	
		D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0
DILUIZIONE DIRETTA DEL CAMPIONE NEL TAMPONE	0 %	1,23		0,39		2,41		1,36	
	25 %	1,77	0,54	0,45	0,06	2,66	0,24	2,71	1,35
	50 %	1,92	0,68	0,31	-0,08	2,68	0,27	2,88	1,52
50 µL TAMPONE + 50 µL CAMPIONE DILUITO IN PBS	0 µl	0,68		0,40		1,94		1,71	
	25 µl	0,77	0,09	0,46	0,05	2,75	0,81	2,88	1,17
	50 µl	0,79	0,11	0,38	-0,02	2,87	0,93	2,89	1,19

Tabella 36 Risultati della seconda prova di validazione. D.O.: densità ottica

VALUTAZIONE DELLA SIALILAZIONE IN CANI SANI E CON NEOPLASIE

Sulla base dei dati clinici, radiologici, istologici e di laboratorio, i 4 soggetti patologici presentavano le condizioni riportate in tabella 37:

	1	2	3	4
Numero di neoplasie	Multiple	Multiple	Multiple	Singola
Condizione generale	Scadente	Buona	Buona	Buona
Macrometastasi	Si	No	No	No
Tipo di tumore	Maligno	Maligno + benigni	Maligno	Maligno
Micrometastasi	Non ricercate	No	No	Si
Follow up	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Tabella 37 Quadro riassuntivo delle lesioni rilevate nei soggetti patologici

Riassumendo, solo due soggetti presentavano metastasi, in un caso evidenziate microscopicamente e in un caso, peraltro caratterizzato anche da insufficienza epato-renale, macroscopicamente.

I risultati rilevati nei campioni di siero da soggetti sani e patologici (tabella 38) confermano la maggiore reattività della lectina SNAI (acido sialico $\alpha 2,6$) senza differenze significative tra controlli e campioni patologici: ciò nonostante, in due cani di controllo, i valori di MAA sono nettamente superiori a quelli del bianco e in un solo caso il valore è leggermente inferiore, mentre solo in due dei cani patologici i valori aumentano, peraltro meno che nei controlli. I valori basali rilevati con lectina SNAI sono risultati più omogenei tra i due gruppi.

A differenza della prova preliminare, l'aggiunta di donatori di acido sialico ha portato ad aumento di reattività alla lectina MAA e ad una diminuzione di reattività alla SNAI, quest'ultima statisticamente significativa. Tale differenza è giustificabile con una maggiore standardizzazione delle prove su singoli soggetti rispetto a quelle su pool di sieri.

GRUPPO	CANE N°	MAA				SNAI			
		BASALE		CMP-ACNeu		BASALE		CMP-ACNeu	
		D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0
	bianco	0,79		0,81		1,26		1,31	
CONTROLLI	1	0,86	0,07	1,56	0,75	3,82	2,55	3,57	2,26
	2	0,84	0,05	1,61	0,80	3,66	2,40	3,42	2,12
	3	0,77	-0,02	0,80	-0,01	3,98	2,71	3,81	2,51
PATOLOGICI	4	0,82	0,03	0,66	-0,15	3,65	2,39	3,50	2,19
	5	0,79	0,00	0,87	0,06	3,74	2,48	3,76	2,45
	6	0,73	-0,06	1,04	0,23	3,94	2,68	3,58	2,28
	7	0,83	0,04	0,96	0,15	3,85	2,59	3,78	2,48

Tabella 38 Attività sialiltransferasica osservata nei 7 campioni di siero oggetto della tesi

Tale approccio da un lato è raccomandato nelle prove di validazione (Lumsden, 2000) perché permette di minimizzare le differenze tra singoli soggetti, dall'altro ha il difetto che tra i campioni che costituiscono il pool ci potrebbero essere soggetti con comportamento diverso da quello della popolazione ottimale. Nel nostro caso, inoltre, il pool di sieri era stato raccolto senza informazioni preliminari sullo stato di salute dei soggetti ed è

possibile che alcuni sieri provenissero da cani patologici. Infine, il pool includeva sia campioni congelati che campioni freschi, mentre nelle prove sui soggetti sani e patologici, la raccolta e conservazione dei campioni, anche di quelli congelati, è avvenuta con maggiore standardizzazione. In ultima analisi, se l'utilizzo del pool ci ha permesso di validare il metodo, l'utilizzo di campioni singoli va sicuramente considerato più adatto alla definizione dei valori "normali". I risultati rilevati nei campioni di tessuto omogeneato (tabella 39) confermano una maggiore reattività a SNAI, sebbene in questi campioni anche la reattività a MAA è discretamente elevata.

CANE N°	MASSA	BASALE		CMP-NEUAC		BASALE		CMP-NEUAC	
		D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0	D.O.	Diff vs 0
Bianco		0,79		0,81		1,26		1,31	
1	NON PATOL	1,11	0,32	1,44	0,63	2,85	1,59	3,03	1,73
4	I-II-Sx	1,26	0,47	1,19	0,38	2,15	0,89	2,36	1,05
	II/III Sx	1,05	0,26	2,08	1,27	2,65	1,39	2,65	1,34
	ascell Dx	1,02	0,23	1,70	0,89	3,28	2,02	3,28	1,98
	I Sx - a	0,90	0,11	1,02	0,21	2,27	1,01	1,74	0,44
	I Sx - b	0,82	0,03	0,68	-0,13	1,95	0,68	2,13	0,82
	Sx cran - a	0,94	0,15	0,78	-0,03	2,04	0,78	1,94	0,63
	II Sx - a	0,83	0,04	0,76	-0,05	2,20	0,94	2,03	0,73
	II Sx - b	0,88	0,09	0,66	-0,15	1,35	0,09	1,70	0,40
5	Sx cran - b	0,73	-0,06	0,64	-0,17	1,75	0,49	1,83	0,53
	Camp 1	1,10	0,31	0,97	0,16	2,11	0,85	2,11	0,80
6	Camp 2	1,43	0,64	1,01	0,20	2,42	1,15	3,27	1,96
	I Sx	0,84	0,05	0,70	-0,11	1,58	0,32	1,72	0,41
	II Sx	0,76	-0,03	0,68	-0,13	1,23	-0,03	1,33	0,03
	V Dx	1,04	0,25	0,78	-0,03	1,25	-0,01	1,47	0,16

Tabella 39 Attività sialiltransferasica osservata nei campioni di tessuto oggetto della tesi

Il campione non patologico ha evidenziato livelli elevati di entrambi i segnali di positività, i quali sono entrambi aumentati dopo aggiunta di donatore di acido sialico. L'aumento della reattività a MAA è comunque risultato molto maggiore di quello relativo alla SNAI, a suggerire che a livello tissutale l'attività sialiltransferasica più rappresentata sia quella $\alpha 2,3$.

L'analisi dei campioni patologici ha evidenziato un comportamento variabile non solo tra soggetti ma anche tra diversi campioni dello stesso soggetto, forse in rapporto alle caratteristiche istologiche dei diversi campioni, che includevano aree di tessuto maligno, aree benigne, quantità di stroma variabile, nonché aree necrotiche. Ciò nonostante, in molti campioni neoplastici dopo aggiunta di acido sialico l'attività di ST $\alpha 2,3$ (lectina MAA) tende a diminuire, e spesso tale diminuzione è associata ad un aumento di attività di ST $\alpha 2,6$ sialiltransferasica. Per verificare questi dati si è cercato di identificare la distribuzione dell'acido sialico in campioni di tessuto, con i seguenti risultati:

La colorazione con MAA ha sempre evidenziato caratteristiche di colorazione ottimali. Il segnale di positività infatti è sempre risultato chiaro, in assenza di fondo e caratterizzato da una colorazione perinucleare diffusa a

livello di cellule positive, verosimilmente espressione della presenza di molecole sialilate di membrana (figura 39 a sinistra). Occasionalmente anche il secreto all'interno dei dotti è risultato positivo (figura 39 a destra).

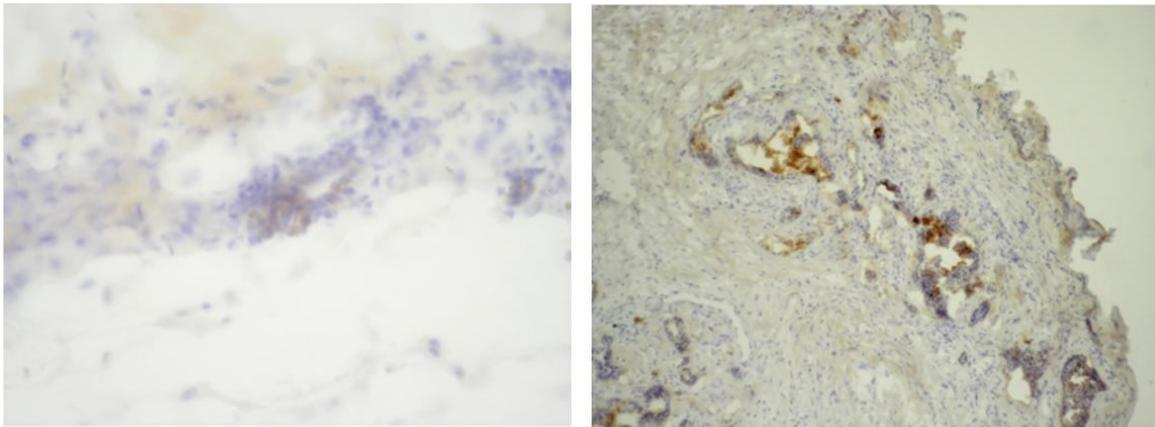


Figura 39 Caratteristiche dell'immunocoloreazione con lectina MAA di un epitelio mammario non neoplastico. Ingrandimento: 1000x. A destra: caratteristiche dell'immunocoloreazione con lectina MAA di un epitelio mammario ottenuto da tessuto neoplastico con dilatazioni cistiche a contenuto positivo. Ingrandimento: 250x

La positività a SNAI è risultata presente sia sulla membrana delle cellule epiteliali, che, peraltro, venivano colorate molto più intensamente da questa lectina che non da MAA, sia nel tessuto interstiziale e stromale (figura 40 sinistra). Anche in questo caso non tutte le strutture tubulari o ghiandolari sono risultate positive e, soprattutto nelle strutture cistiche, era spesso presente positività all'interno della cavità (figura 40 destra), a volte a formare una sottile banda di positività adagiata sull'epitelio, a volte sotto forma di zolle di materiale positivo.

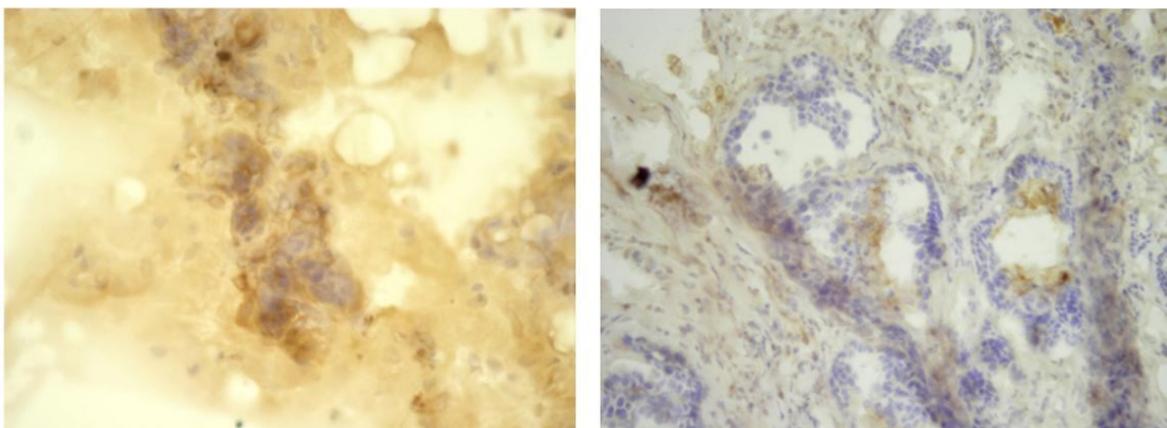


Figura 40 A sinistra: caratteristiche dell'immunocoloreazione con lectina SNAI di un epitelio mammario non neoplastico. Ingrandimento: 1000x. A destra: caratteristiche dell'immunocoloreazione con lectina SNAI di un epitelio mammario ottenuto da tessuto neoplastico con dilatazioni cistiche a contenuto positivo. Ingrandimento: 250x

L'analisi delle sezioni fissate in formalina ed incluse in paraffina ha fornito risultati contrastanti: alcune sezioni hanno mostrato, caratteristiche morfologiche eccellenti, anche caratteristiche ottimali di immunocolorazione, evidenziando un segnale di positività citoplasmatico, sia con MAA che con SNAI, più intenso e facilmente riconoscibile di quello rilevato nelle sezioni criostatiche (figura 41). In altri casi i campioni, pur ricchi di tessuto mammario (neoplastico e non) sono risultati praticamente negativi e/o positivi solo in cellule che delimitavano dotti e/o strutture cistiche (figura 42), nonché nel contenuto delle strutture cistiche stesse (figura 43).

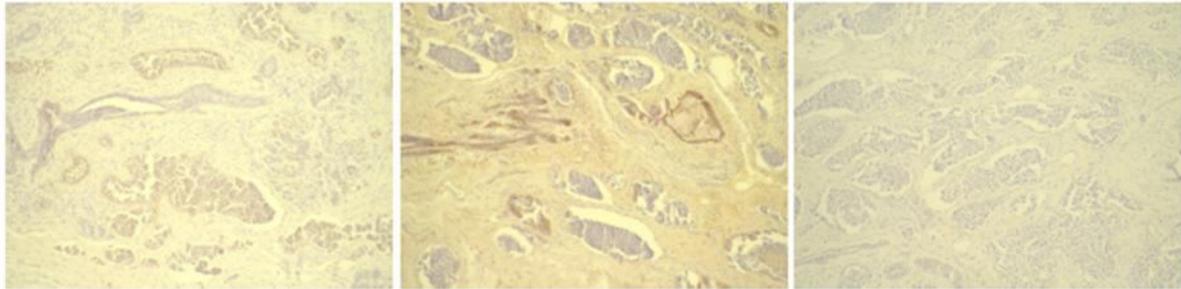


Figura 41 Caratteristiche dell'immunocolorazione con lectine su tessuti paraffinati: a sinistra sono rilevabili strutture epiteliali positive alla lectina MAA, al centro epiteli tubulari positivi alla lectina SNAI, a destra campione di controllo negativo. Ingrandimento: 250x

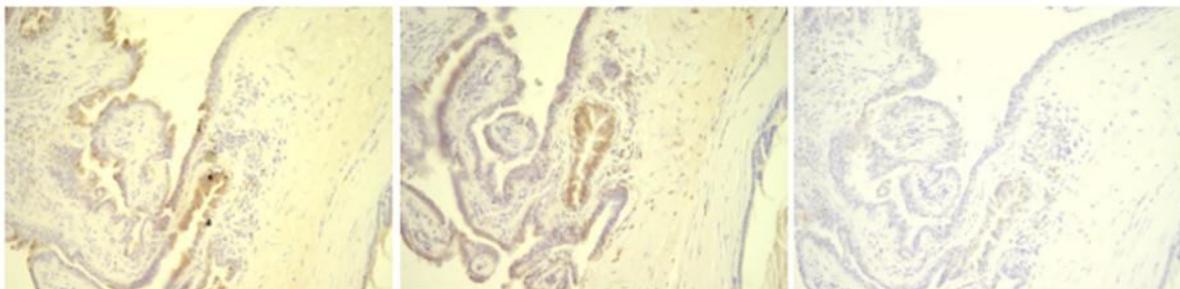


Figura 42 Caratteristiche dell'immunocolorazione con lectine su cellule tubulari e/o papillari dopo colorazione con lectina MAA (a sinistra), SNAI (al centro), controllo negativo senza lectine (a destra). Ingrandimento: 250x

Nei tessuti patologici, la colorazione con lectina MAA ha evidenziato positività di intensità variabile e interessanti un numero variabile di elementi cellulari, soprattutto per quanto riguarda le cellule rilevabili nelle strutture papillari o tubulari dilatate, nelle quali era spesso rilevabile positività anche a livello di secreto. Lo stesso tipo di positività intratubulare e, raramente, cellulare, era rilevabile anche nelle sezioni colorate con lectina SNAI, nelle quali, come precedentemente accennato, era presente anche positività di fondo.

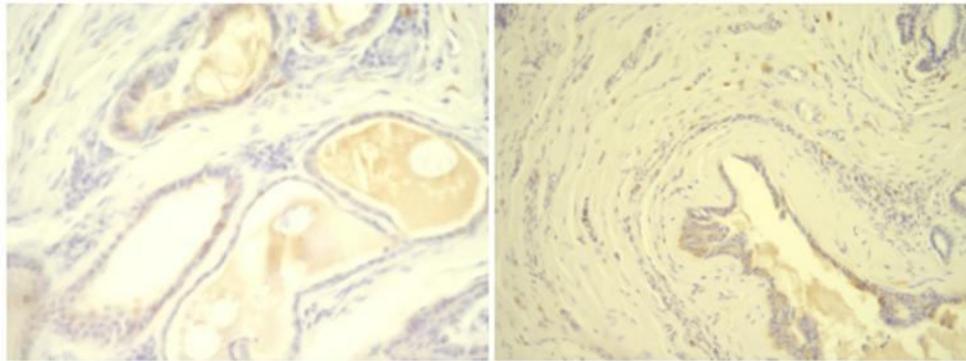


Figura 43 Campioni sostanzialmente negativi all'immunocolorazione con MAA (a sinistra) o SNAI (a destra): solo rare cellule risultano debolmente positive, a fronte di una decisa colorazione del secreto contenuto nelle strutture tubulari dilatate. Ingrandimento: 250x

Per quanto riguarda il confronto tra tessuti patologici di diversi animali o tra diverse aree di tumore nello stesso soggetto, sono state rilevate le difficoltà interpretative precedentemente accennate in sede di commento dei risultati ottenuti su tessuti omogeneati ed è risultato quindi problematico interpretare il segnale rilevato. Si è comunque cercato di definire le caratteristiche di positività nelle diverse sezioni (tabella 40).

CANE N°	MASSA	MAA	SNAI
4	I-II-Sx	Campione costituito solo da tessuto connettivo	
	II/III Sx	Rare cellule, Debole positività	Debole positività (50% delle cellule)
	ascell Dx	Debole positività in cellule tubulari	Debole positività in cellule tubulari
	I Sx - a	Non interpretabile	Non interpretabile
	I Sx - b	Negativo	Negativo
	Sx cran - a	Rare cellule debolmente positive	Negativo
	II Sx - a	Cellule negative	Rare positività sul bordo dei tubuli
	II Sx -b	Cellule negative	Rare positività in cellule tubulari
	Sx cran - b	Cellule negative	Alcune cellule debolmente positive
5	Camp 1	Rare cellule tubulari	positive il 50% delle cellule
	Camp 2	Non interpretabile	Non interpretabile
6	I Sx	Rare e deboli positività in cell. tubulari	Rare positività molto evidenti
	II Sx	Rare e deboli positività in cell. tubulari	Rare positività molto evidenti
	V Dx	Rare cell positive sparse	Cellule basali dei dotti positive

Tabella 40 Caratteristiche di positività nei campioni patologici

Come rilevabile dalla tabella, sembra sempre prevalere, in termini di intensità della positività e di numero di cellule positive, la positività a SNAI, suggerendo l'acido sialico sia per lo più in posizione $\alpha 2,6$ che $\alpha 2,3$.

Discussione

In questo studio è stato possibile mettere a punto, attraverso prove preliminari di validazione, un metodo in fase solida di rilevazione del tipo di sialilazione preferenziale e dell'attività sialiltransferasica in siero ed in omogeneati di tessuto canino, nonché della distribuzione di acido sialico in posizione $\alpha 2,3$ o $\alpha 2,6$ nel tessuto

mammario. In particolare, le prove preliminari in fase solida hanno permesso di rilevare alcuni punti critici dei metodi segnalati in letteratura (Mattox et al., 2002; Yen e Cummings, 2006), rappresentati principalmente dalla necessità di riservare alcuni pozzetti all'analisi del tipo di sialilazione in assenza di donatori di acido sialico, e di standardizzare la "donazione di acido sialico" alla miscela di reazione utilizzando CMPNeuAc; è stato inoltre evidenziato come i risultati migliori si ottengono mantenendo costante (100 μ l) il volume finale di reazione, ma diluendo direttamente il campione nel tampone alla concentrazione finale del 25%, concentrazione sopra la quale possono essere presenti fenomeni di esaurimento del substrato che riducono il segnale di positività.

L'utilizzo degli accorgimenti sopra citati ha permesso di ottenere, su pool di sieri di cane utilizzati in fase di validazione, informazioni preliminari sul tipo di sialilazione e sull'attività sialiltransferasica: in particolare è emerso come in assenza di donatori di acido sialico tenda a prevalere la sialilazione in posizione α 2,6 rispetto a quella in posizione α 2,3. Nei soggetti sani, l'aggiunta alla reazione di donatori di acido sialico ha determinato un aumento della sialilazione in posizione α 2,3 a fronte di una modica diminuzione in posizione α 2,6, fenomeno che tende ad indicare che nel cane in campioni di siero di controllo, tende a prevalere la attività della ST α 2,3 su quella della ST α 2,6. Sebbene influenzata dal basso numero di soggetti e da un'elevata variabilità individuale, l'analisi dei cani patologici ha rilevato un comportamento leggermente diverso: l'aumento della positività a MAA nei cani con neoplasie è risultato meno marcato o, nel soggetto con neoplasia "più maligna", addirittura sostituito da una diminuzione di attività a suggerire che l'attività sialiltransferasica α 2,3 in tali soggetti sia più debole di quella dei soggetti sani. La presenza di insufficienza epatica potrebbe aver però influenzato i risultati nel soggetto con macrometastasi. Ad ogni modo, sebbene negli stessi due cani con metastasi e con diminuzione della reattività a MAA non si sia rilevato un aumento di attività ST α 2,6, l'equilibrio tra queste due attività enzimatiche (α 2,3 e α 2,6) tenderebbe comunque a spostarsi verso la seconda, supportando l'ipotesi già avanzata in medicina umana di una potenziale associazione tra malignità della neoplasia ed attività della sialiltransferasi α 2,6. Tale impressione è supportata dai risultati ottenuti applicando la stessa metodica a omogeneati di tessuto patologico, nei quali, pur in presenza di difficoltà tecniche o interpretative, legate sia alla bassa numerosità che all'elevata variabilità di risultati anche tra tessuti diversi dello stesso soggetto, quest'ultima a sua volta imputabile alla relativa eterogeneità di isotipi rilevabili in sezioni diverse di una stessa neoplasia. L'attività sialiltransferasica α 2,3 tende a diminuire, e spesso tale diminuzione è associata ad un aumento dell'attività α 2,6 sialiltransferasica.

Non è stato però possibile trarre conferma di questa diverso grado di attività attraverso l'analisi del tipo di sialilazione effettivamente presente nel tessuto. Se da un lato la messa a punto del metodo su sezioni criostatate ha fornito ottimi risultati in termini di rilevazione della positività, suggerendo che l'acido sialico in posizione α 2,3 tende ad essere espresso prevalentemente su glicoproteine di membrana mentre quello in posizione α 2,6 è presente anche nel connettivo, non altrettanto è avvenuto nelle sezioni paraffinate e, dato che la morfologia delle sezioni criostatate non è sempre risultata ottimale e che l'eterogeneità delle lesioni presenti in sezioni diverse era elevata, non è stato possibile trarre informazioni definitive sul tipo di sialilazione

tissutale. Ciò nonostante sembra di poter rilevare nella gran parte dei tessuti patologici un certo grado di prevalenza di acido sialico $\alpha 2,6$, a sostegno dell'ipotesi precedentemente avanzata circa la prevalenza dell'attività sialiltransferasica $\alpha 2,6$ e la sua possibile associazione con la trasformazione neoplastica.

In conclusione, in questo studio è stato messo a punto un metodo di valutazione in fase solida dell'attività sialiltransferasica in siero e tessuti omogeneati di cane. Seppure su un campionamento ridotto e poco standardizzato, l'applicazione di tale metodo ha permesso di evidenziare alcune differenze nell'attività sialiltransferasica sierica di soggetti sani e con neoplasie, con uno squilibrio a favore della attività dell'enzima che catalizza il legame $\alpha 2,6$ sia nel siero che nei tessuti nei quali i pochi dati interpretabili dopo marcatura con lectine sembra effettivamente prevalere l'acido sialico in posizione $\alpha 2,6$. Questi risultati sono estremamente incoraggianti circa la necessità di approfondire tali dati preliminari. In particolare, la risoluzione dei problemi metodologici su tessuto incontrati in questa tesi e soprattutto l'applicazione su più larga scala del metodo da noi messo a punto, includendo in studi futuri un numero maggiore di soggetti ed applicando una più rigorosa standardizzazione dei criteri di selezione dei casi e di preparazione dei campioni potrà consentire di trarre informazioni più conclusivi circa l'effettivo ruolo dell'acido sialico e dell'attività sialiltransferasica in cani con neoplasie mammarie.

OBIETTIVO 5 - VALUTAZIONE DELLE PERFORMANCES ANALITICHE DEI METODI DI DETERMINAZIONE DELLA PROTEINURIA

La filtrazione delle proteine plasmatiche, a livello di glomerulo renale, è altamente selettiva: la barriera glomerulare costituisce un vero e proprio filtro le cui fenestrature hanno un diametro di 68 kDa e quindi impediscono il passaggio di molecole più grandi. Inoltre un'ulteriore filtrazione è effettuata da dalle cariche presenti sulla membrana basale del glomerulo. Le albumine rappresentano le proteine plasmatiche con minor peso molecolare (69 kDa), al limite della soglia di filtrazione. Tuttavia, grazie alle cariche elettriche vengono respinte e quindi solo una minima parte riesce a passare la membrana. Le frazioni proteiche più piccole che passano quindi liberamente attraverso la barriera glomerulare vengono riassorbite a livello tubulare. Il sistema di riassorbimento va però incontro a saturazione: a fronte di un'aumentata concentrazione proteica nell'ultrafiltrato, ad esempio per un'alterata permeabilità della membrana glomerulare, si instaura proteinuria per incompleto riassorbimento tubulare. La proteinuria deve essere considerata il primo indicatore di danno glomerulare e può essere riscontrata molto prima delle alterazioni ematochimiche correlabili a ridotta funzionalità renale (es: ipercreatininemia) che sono evidenziabili in corso di glomerulopatie particolarmente gravi e/o in fasi evolutive avanzate che coinvolgono il comparto tubulointerstiziale.

La patogenesi della glomerulonefrite è rappresentata dalla deposizione di immunocomplessi a livello di capillare glomerulare e, sebbene gli immunocomplessi si possano formare *in situ*, nella maggior parte dei casi questi si formano in circolo in seguito ad una serie di patologie (per esempio: leishmaniosi, e solo successivamente si depositano e si accumulano a livello di capillare glomerulare. A prescindere dall'origine degli immunocomplessi, una volta che si sono accumulati nel glomerulo scatenano un processo infiammatorio per liberazioni dei mediatori dell'infiammazione che generano quindi la glomerulonefrite con proliferazione delle cellule mesangiali e ispessimento della parete glomerulare. Con il persistere del processo infiammatorio il glomerulo va incontro a processi di ialinizzazione e sclerosi che arrivano a coinvolgere tutto il neurone fino a comprometterne la funzionalità. Con la cronicizzazione dell'infiammazione si sviluppa anche un processo fibrotico che arriva a coinvolgere anche l'interstizio perdendo così sempre maggiore funzionalità fino ad arrivare all'insufficienza renale cronica (Grauer, 2005).

La perdita delle proteine plasmatiche attraverso le urine è quindi uno dei primi segni di diminuita funzionalità renale in corso di glomerulonefrite (GN) (Grauer et al., 2000).

Per questo motivo la quantificazione della proteinuria mediante il rapporto tra proteinuria e creatininuria è un marker ampiamente utilizzato per l'identificazione delle patologie renali nel cane (Lees et al., 2005).

Inoltre la proteinuria è anche un fattore di rischio nel cane con insufficienza renale cronica (CKD) e il grado di proteinuria è correlato al rischio di sviluppare una crisi uremica e la conseguente morte per insufficienza renale (Jacob et al., 2005). La perdita di proteine nelle urine è inoltre associata con la progressione della patologia e con l'esito (Grauer et al., 2000). Considerando l'estrema importanza di questo marker in corso di

patologie renali, la società internazionale di studio delle patologie renali (International Renal Interest Society - IRIS) nel delineare le linee guida per l'approccio diagnostico, lo staging della patologia e il monitoraggio della terapia ha incluso la quantificazione della proteinuria come punto fondamentale (Elliott e Watson, 2009).

Come è stato recentemente dimostrato (Zatelli et al., 2010), la proteinuria può essere valutata mediante test semi-quantitativi come gli stick urinari. Tuttavia anche se i risultati di questi sono affidabili quando interpretati tenendo conto del peso specifico delle urine (USG), l'esatta quantificazione vera e propria della proteinuria rimane un punto fondamentale nella procedura diagnostica e nel monitoraggio della terapia, come specificato dalle linee guide della IRIS.

Il metodo di riferimento per la quantificazione della proteinuria è rappresentato dalla raccolta delle urine nelle 24 ore, ma questo sistema in medicina veterinaria è tecnicamente difficile da applicare. Una valida alternativa è rappresentata dalla misurazione del rapporto tra proteine e creatinina urinaria (PU/CU), che consente di ottenere le stesse informazioni, data l'elevata correlazione con la quantità di proteine escrete giornalmente, ma con una sola raccolta delle urine in qualsiasi momento della giornata (DiBartola et al., 1980; Center et al., 1985; Moore et al., 1991; Lees et al., 2005). L'affidabilità della valutazione del rapporto PU/CU si basa sull'assunzione che il test sia preciso e che non venga influenzato da variabili analitiche o pre-analitiche. Nello specifico: le misurazioni sia della proteinuria che della creatinuria devono essere ripetibili, inoltre per la misurazione della creatinina urinaria è necessaria una prediluizione del campione per ottenere una concentrazione all'interno del range di linearità del metodo e questa diluizione può influenzare i risultati.

Inoltre, mentre la misurazione semi-quantitativa della proteinuria mediante gli sticks urinari viene effettuata direttamente dal veterinario subito dopo il prelievo di urina, la quantificazione vera e propria della proteinuria viene spesso effettuata presso laboratori di riferimento a cui vengono spediti i campioni. La stabilità di proteine e creatinina nei campioni di urina e la temperatura di conservazione durante il trasporto e fino al momento delle analisi può diventare un punto critico. Attualmente in letteratura non sono presenti studi che abbiano valutato la variabilità pre-analitica ed analitica del metodo per la misurazione del rapporto PU/CU urinaria.

Pertanto lo scopo di questo lavoro è stato quello di valutare la ripetibilità intra-assay e l'effetto della conservabilità a differenti temperature e per periodi differenti per stimare l'effetto dell'eventuale variabilità sulle conseguenze cliniche. Inoltre considerando che le procedure di routine dei laboratori prevedono la prediluizione con un rapporto 1:20 dei campioni di urine per la determinazione della creatinuria, abbiamo anche valutato l'influenza di questa diluizione che potrebbe essere non sufficiente nelle urine molto concentrate ad abbassare la concentrazione di creatinina urinaria sufficientemente da rientrare nei range di linearità del metodo, esitando quindi in risultati inaccurati.

Di seguito è descritto nel dettaglio l'approccio sperimentale seguito ed i principali risultati e considerazioni. Questa parte della tesi è stata oggetto di una presentazione ad un congresso internazionale (n° 19 dell'elenco pubblicazioni).

Materiali e metodi

La ricerca è stata condotta su 30 campioni di urine provenienti da cani di diversa razza, sesso, età, sottoposti ad indagini medico chirurgiche presso il Dipartimento di Chirurgia Veterinaria dell'Università di Milano e presso ambulatori privati di Milano. La raccolta del materiale, è stato effettuata, in genere, per cistocentesi ecoguidata, per evitare eventuali contaminazioni indesiderate del campione, anche se in alcuni casi i campioni sono stati raccolti per caterizzazione uretrale o per minzione spontanea

I campioni sono stati sottoposti ad analisi del sedimento urinario seguendo le tecniche raccomandate dall'IRIS (Elliott e Watson, 2008) in modo da poter classificare i campioni come "sedimento attivo" in presenza di segni di infiammazione o come "sedimento inattivo" in assenza di segni di infiammazione. I campioni sono stati sottoposti a determinazione del rapporto PU/CU previa determinazione delle proteine urinarie e della creatina urinaria come descritto nell'obiettivo 2. Subito dopo la prima determinazione, i campioni di cui era disponibile un volume sufficiente sono stati divisi in tre aliquote, una conservata a temperatura ambiente, una a 4°C, mentre l'ultima è stata ulteriormente suddivisa in 12 aliquote (0,5 ml) e congelate a -20°C. I campioni sono stati sottoposti subito dopo il prelievo a 20 letture consecutive per la determinazione della variabilità intra-assay. I campioni a temperatura ambiente sono stati analizzati dopo 12, 24, 48, 72, ore e quelli refrigerati a 12, 24, 48, 72, ore e a 7 giorni, quelli congelati a 12, 24, 48, 72 ore e a 7, 14, 21, giorni a 1, 3, 6, mesi.

Le diverse aliquote sono poi state analizzate 5 volte consecutive, diluendo 1:20 il campione destinato alla determinazione della creatinina prima dell'uso, Ad eccezione delle prove destinate alla valutazione dell'effetto della pre-diluizione, nelle quali sono state preparate anche aliquote diluite 1:20 ed aliquote diluite 1:100.

I dati raccolti nei diversi replicati sono stati utilizzati per calcolare il CV intra-assay. I risultati ottenuti in tempi successivi post-prelievo e quelli ottenuti a diverse diluizioni di creatinina sono stati confrontati tra loro mediante test di Friedman. Ulteriori confronti statistici sono stati effettuati sulla base del peso specifico e/o della presenza di sedimento attivo/inattivo come specificato nella sezione risultati.

Risultati

I campioni oggetto di questa tesi presentavano le caratteristiche descritte in tabella 41. Il peso specifico, non riportato in tabella, è risultato molto variabile, comprendendo sia campioni con PS <1,030 sia campioni a PS più elevato.

	N°. di campioni	Sedimento attivo	Sedimento inattivo
Minzione spontanea	2	0	2
Cistocentesi	22	12	10
Cateterismo	6	4	2
TOTALE	30	16	14

Tabella 41 Valutazione del sedimento attivo presente nei campioni di urina raccolti tramite cistocentesi, cateterismo e minzione spontanea

Variabilità intra-assay:

L'analisi della variabilità intra-assay è stata valutata su 25 campioni ed è riassunta in tabella 42.

	Urine creatinine	Urine protein	UPC ratio
Mean CV % (\pm SD)	3.2 (\pm 3.0)	9.3 (\pm 6.5)	10.0 (\pm 6.5)
Median CV % (min-max range)	2.0 (0.8 – 14.2)	8.3 (1.9 – 29.7)	8.6 (2.5 – 29.9)
# of samples with CV < 5%	22	5	6
# of samples with 5% \leq CV \leq 10%	2	14	9
# of samples with 10% \leq CV \leq 20%	1	4	8
# of samples with CV > 20%	-	2	2

Tabella 42 Risultati della variabilità intra-assay

L'entità della variabilità non è risultata correlata con il valore di creatininuria ma è risultata correlata negativamente con PU ($r^2 = -0,62$; $P < 0,001$) e PU/CU ($r^2 = -0,59$; $P = 0,002$) (figura 44).

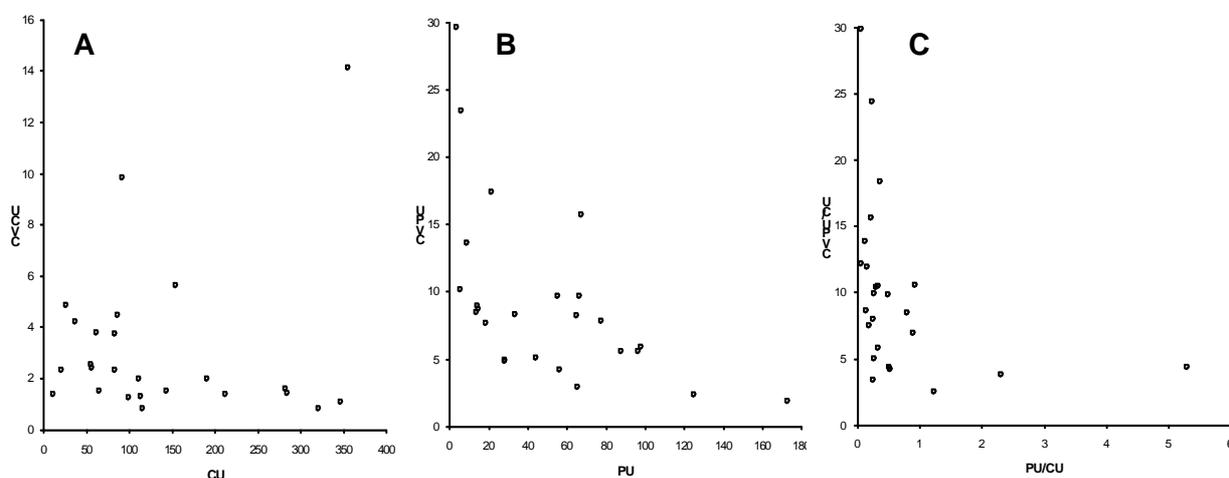


Figura 44 Correlazione tra il valore medio rilevato nei singoli soggetti e la rispettiva variabilità espressa in termini di CV della creatininuria (A), della proteinuria (B) e del rapporto PU/CU (C)

Dato che un fattore che incide sulla concentrazione di PU e CU è rappresentato dalla diluizione delle urine, abbiamo verificato l'eventuale relazione tra quest'ultima e livelli e variabilità analitica di PU e CU. Nei 24 casi in cui si disponeva del peso specifico delle urine (PS) abbiamo rilevato una correlazione diretta tra CU e PS ($P = 0,005$, $r^2 = 0,56$) ma non tra PU e PS ($P = 0,055$, $r^2 = 0,13$) o tra PU/CU e PS ($P = 0,128$, $r^2 = -0,32$) (figura 45).

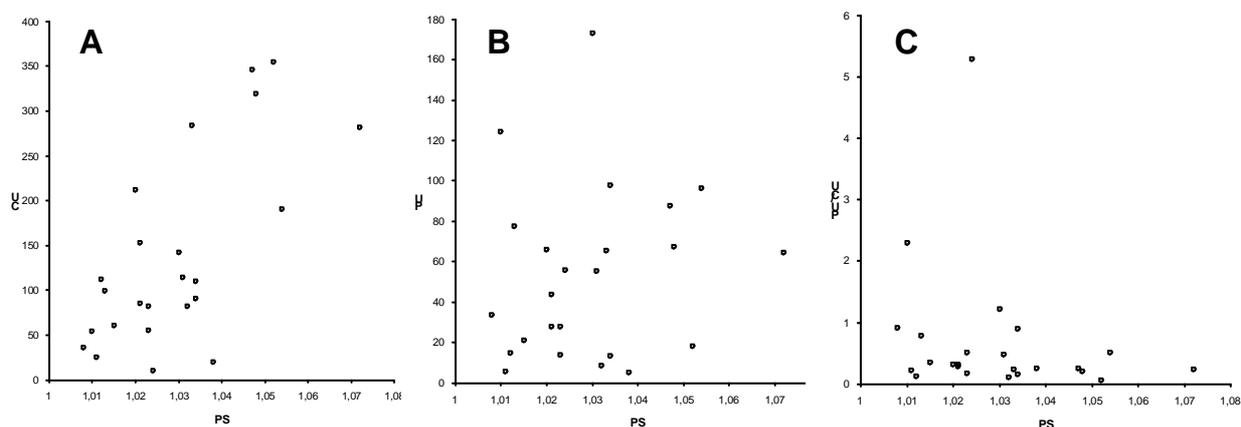


Figura 45 Correlazione nei singoli campioni tra valore medio di creatininuria (A), proteinuria (B) e rapporto PU/CU (C) e il corrispondente peso specifico

Un altro fattore potenzialmente in grado di influenzare la proteinuria e quindi, indirettamente la sua variabilità, è rappresentato dal tipo di proteine presenti, a loro volta potenzialmente influenzate dal tipo di proteinuria (es: pre-renale, renale o post-renale) e dal tipo di prelievo (cistocentesi, cateterismo o minzione spontanea). Abbiamo quindi voluto verificare se queste variabili influenzassero la ripetibilità intra-assay: come prevedibile i campioni con sedimento attivo presentavano valori significativamente più elevati di PU e di conseguenza anche di PU/CU (tabella 43), mentre non si riscontrano valori significativamente differenti relativi al CU, né è risultata influenzata la variabilità in termini di CV.

	Sedimento attivo (n=11)	Sedimento inattivo (n=13)	U Mann Withney
CU	159,39 ± 118,62	120,82 ± 96,24	0,569
PU	70,04 ± 41,70	38,01 ± 38,02	0,026
PU/CU	0,96 ± 1,47	0,43 ± 0,60	0,041
CV CU	1,97 ± 1,10	4,28 ± 3,82	0,064
CV PU	8,13 ± 4,74	8,64 ± 5,43	0,649
CV PU/CU	8,40 ± 5,08	9,91 ± 5,38	0,531

Tabella 43 Valutazione di differenze significative tra campioni con sedimento attivo e inattivo per quanto riguarda, proteinuria e rapporto PU/CU sia in termini di valori medi che di coefficiente di variazione

La variabilità sopra citata, per quanto non elevatissima, potrebbe influenzare la classificazione dei campioni con PU/CU prossimo alle soglie di classificazione dei soggetti proteinurici definite dall'IRIS. Abbiamo quindi verificato, nei soggetti i cui valori medi di PU/CU sono "a cavallo" delle soglie di 0,2 e 0,5 in un intervallo compreso nel CV delineato dalle prove sopra citate.

I risultati ottenuti nei 5 campioni "vicini a 0,2" e "vicini a 0,5" sono riportati nelle tabelle 44 e 45. Come rilevabile dalla tabella nei campioni più vicini ai valori soglia alcune determinazioni classificano il campione in una classe, altre in un'altra. In prossimità di tali valori soglia è quindi importante.

	Camp 1	Camp 2	Camp 3	Camp 4	Camp 5
PU/CU medio	0,17 (NP)	0,21 (BP)	0,22 (BP)	0,23 (BP)	0,23 (BP)
Determinazioni <0,20(NP)	20	8	11	19	20
Determinazioni >0,20 (BP)	0	12	9	1	0

Tabella 44 Valutazione del rischio di errori di classificazione in 5 campioni con valore medio di PU/CU vicino al valore soglia di 0,20

	Camp 1	Camp 2	Camp 3
PU/CU medio	0,48 (BP)	0,50 (BP)	0,51 (P)
Determinazioni <0,50 (BP)	5	10	11
Determinazioni >0,50 (P)	15	10	9

Tabella 45 Valutazione del rischio di errori di classificazione in 3 campioni con valore medio di PU/CU vicino al valore soglia di 0,50

Influenza del livello di diluizione delle urine nella determinazione del PU/CU

I risultati delle diverse pre-diluizioni della creatinina (tabella 46) evidenziano che aumentando la diluizione la concentrazione di creatinina aumenta, tranne rare eccezioni, portando ad una diminuzione del PU/CU.

	1:10 Media \pm DS (mediana)	1:20 Media \pm DS (mediana)	1:100 Media \pm DS (mediana)	Friedmann	Wilcoxon
CU	147,2 \pm 95,5 (131,4)	169,6 \pm 109,8 (133,0)	185,5 \pm 116,8 (168,7)	***	10 vs 20 (**); 10 vs 100 (***)
PU/CU	0,67 \pm 1,28 (0,32)	0,45 \pm 0,51 (0,30)	0,35 \pm 0,27 (0,29)	***	10 vs 20 (*); 10 vs 100 (**)

Tabella 46 Valutazione della significatività in base alla diversa diluizione

L'analisi dei dati rileva una differenza significativa per CU e per PU/CU, tra la diluizione 1:10 e quelle 1:20 e 1:100, ma non tra le diluizioni 1:20 e 1:100. il test di Bland Altman evidenzia una modica sovrastima dei valori di CU a 1:100, non statisticamente significativa (P=0,233) ed il test di Passing Bablok non ha rilevato errori costanti o proporzionali (intercetta: -1,51, 95% CI -36,82-21,95; pendenza: 1,08; 95% CI 0,88-1,37) (figura 46). Similmente, per quanto riguarda il PU/CU (figura 47) la leggera sottostima dei valori rilevata a 1:100 non è statisticamente significativa secondo il test di Bland Altman (P=0,230), e non si rilevano errori costanti o proporzionali (intercetta: 0,02, 95% CI -0,04-0,06; pendenza: 0,88; 95% CI 0,66-1,10).

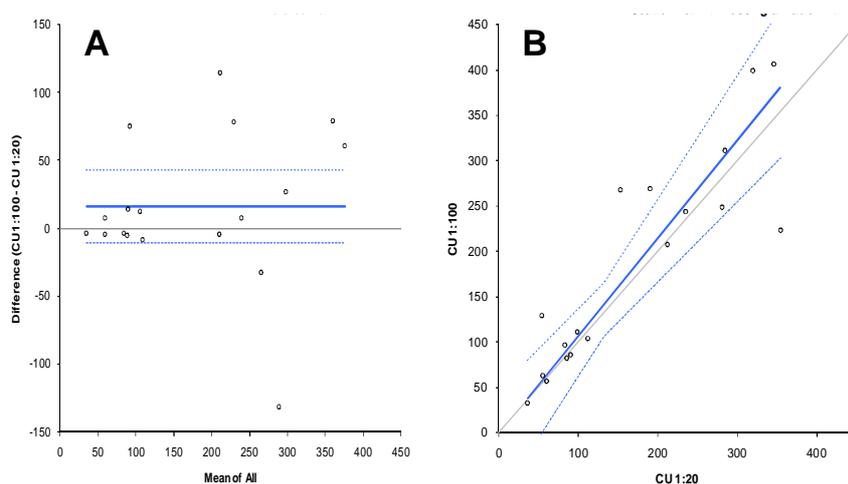


Figura 46 Confronto con Bland Altman (A) e Passing Bablock (B) tra i valori di creatinuria ottenuti diluendo lo stesso campione con un rapporto 1:20 e 1:100

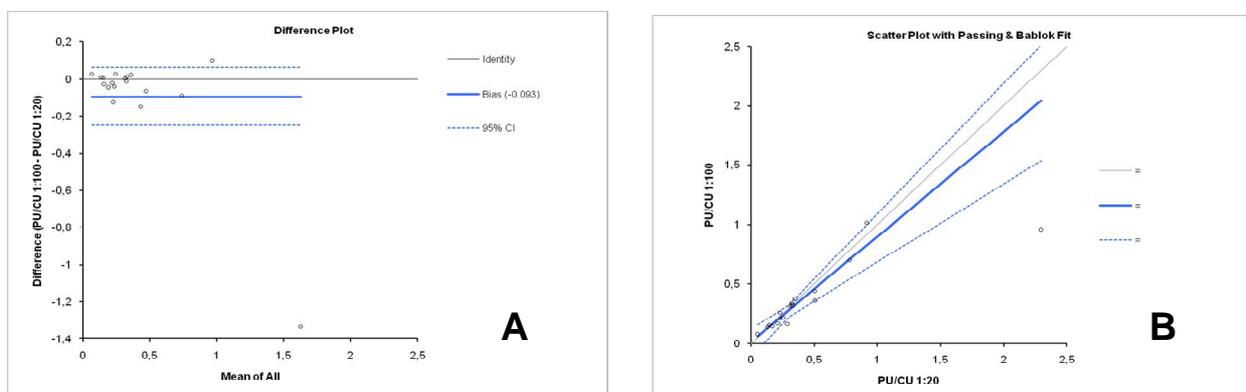


Figura 47 Confronto con Bland Altman (A) e Passing Bablock (B) tra i valori di PU/CU ottenuti diluendo lo stesso campione con rapporto 1:20 e 1:100

Conservabilità

L'effetto della conservabilità è stato valutato a tre diverse condizioni di conservazione:

- A temperatura ambiente per 3 giorni, su 25 campioni, per simulare quanto avviene nelle strutture veterinarie, dove le urine vengono analizzate in giornata o inviate, non in catena del freddo, a laboratori esterni, dove vengono subito processate. Il periodo di tre giorni può simulare l'invio al laboratorio del campione in prossimità del fine settimana.
- A -4°C: per simulare l'invio in catena del freddo, sono stati analizzati giornalmente per una settimana 24 campioni, 11 dei quali analizzati anche a 2 settimane, e 9 a 3 settimane, anche se raramente nella pratica si analizzano campioni refrigerati per così tanto tempo.
- A -20°C: questo tipo di analisi è stato effettuato negli stessi tempi in cui sono stati esaminati i campioni mantenuti nelle condizioni precedenti, ad eccezione che per l'analisi a 12 ore, dato che è improbabile che nella pratica il campione venga congelato ed immediatamente scongelato per essere analizzato. L'osservazione è poi ripetuta mensilmente, su 18 campioni, fino al terzo mese, in modo da

verificare la stabilità del PU/CU su campioni conservati in congelatore, situazione che spesso si verifica in studi retrospettivi più che nella diagnostica di routine. In 11 dei 18 campioni è stato effettuato un ulteriore controllo a 6 mesi dal momento del prelievo.

Conservabilità a temperatura ambiente

I risultati a temperatura ambiente (tabella 47) evidenziano che in termini di valori medi il CU è relativamente costante nel tempo, mentre aumentano i valori di PU e, di conseguenza, del PU/CU.

	PU Media±SD (mediana)	CU Media±SD (mediana)	PU/CU Media±SD (mediana)
T0	48,8 ± 40,5 (45,4)	150,4 ± 101,2 (114,5)	0,47 ± 0,76 (0,27)
T12	52,0 ± 41,0 (48,2)	138,0 ± 99,7 (99,4)	0,57 ± 0,82 (0,35)*
T24	54,2 ± 38,2 (47,8)	137,7 ± 96,1 (105,9)	0,61 ± 0,81 (0,46)**
T48	67,8 ± 44,5 (61,0)***	138,7 ± 97,6 (114,5)	0,74 ± 0,99 (0,56)***
T72	78,6 ± 51,1 (70,0)***	150,5 ± 98,3 (119,7)	0,99 ± 1,40 (0,44)***

Tabella 47 Risultati della conservabilità a temperatura ambiente

Conservabilità a temperatura di refrigerazione (+4°C)

L'analisi dei risultati (tabella 48) evidenzia, anche nei campioni sottoposti a refrigerazione, un trend simile a quello rilevato nei campioni conservati a temperatura ambiente, seppur con alcune differenze, in termini generali, il PU/CU tende ad aumentare nel tempo soprattutto a causa di un progressivo aumento del PU.

	PU Media±SD (mediana)	CU Media±SD (mediana)	PU/CU Media±SD (mediana)
T0	45,2 ± 39,0 (37,1)	140,9 ± 93,0 (113,2)	0,34 ± 0,26 (0,27)
T12	49,5 ± 41,8 (45,2)	131,2 ± 91,2 (113,0)	0,42 ± 0,38 (0,33)*
T24	46,0 ± 38,8 (39,5)	130,5 ± 98,0 (101,7)	0,42 ± 0,30 (0,36)
T48	49,4 ± 43,2 (39,8)	127,2 ± 87,5 (111,9)	0,43 ± 0,35 (0,31)
T72	47,8 ± 43,9 (37,0)	138,8 ± 84,4 (116,7)	0,39 ± 0,43 (0,29)
T 1 sett	54,2 ± 40,6 (46,4)*	140,6 ± 95, (119,3)	0,47 ± 0,36 (0,37)*
	P=0,008	P=0,289	P=0,294

Tabella 48 Valori medi rilevati dall'analisi dei dati individuali fino a una settimana e la rispettiva analisi statistica

Conservabilità a temperatura di congelamento (-20°C)

I risultati relativi al congelamento hanno evidenziato una maggiore stabilità nonostante in diversi casi i abbiano mostrato variazioni del PU/CU tali da determinare un cambio di classe IRIS ed occasionali significatività statistiche rispetto a T0 (tabella 49). L'analisi dei valori medi rilevati nei primi tre mesi non evidenzia differenze di gruppo significative, ma anche in questo caso si rileva una tendenza all'aumento di PU e PU/CU.

	PU Media ± DS (mediana)	CU Media ± DS (mediana)	PU/CU Media ± DS (mediana)
T0	46,3 ± 33,2 (37,1)	163,7 ± 111,8 (134,4)	0,49 ± 0,86 (0,27)
T24	50,9 ± 35,1 (43,3)	163,9 ± 121,0 (137,2)	0,60 ± 0,95 (0,32)
T48	52,3 ± 38,2 (48,2)	166,8 ± 108,7 (139,7)	0,55 ± 0,91 (0,24)
T72	49,9 ± 38,5 (39,4)	164,0 ± 113,4 (138,9)	0,66 ± 1,25 (0,26)
T1sett	55,1 ± 39,5 (44,1)*	150,6 ± 101,1 (126,9)	0,66 ± 1,15 (0,37)**
T2sett	63,0 ± 59,7 (40,2)	153,7 ± 101,4 (144,2)	0,64 ± 0,98 (0,30)
T3sett	54,5 ± 47,2 (38,4)	166,3 ± 121,1 (146,7)	0,59 ± 0,94 (0,25)
T1mese	53,3 ± 41,9 (41,9)	168,9 ± 113,3 (150,4)	0,57 ± 0,95 (0,25)
T2 mesi	53,5 ± 42,5 (38,6)*	162,4 ± 90,0 (155,7)	0,55 ± 1,01 (0,26)
T3 mesi	53,8 ± 45,6 (36,8)	164,3 ± 107,6 (147,8)	0,55 ± 0,93 (0,25)
ANOVA	P=0,059	P=0,645	P=0,172

Tabella 49 Valori medi rilevati dall'analisi dei dati individuali fino a tre mesi e la rispettiva analisi statistica

Discussione

I risultati di questa tesi hanno evidenziato una variabilità analitica riferita soprattutto alla determinazione delle proteine urinarie, che può essere pari anche al 25% per campioni contenenti poca creatinina (solitamente caratterizzati da un basso peso specifico) e quindi caratterizzati anche da un basso PU/CU, mentre è leggermente inferiore (circa il 10% o anche meno) per campioni con PU/CU più elevato. Questo tipo di imprecisione non sembra dipendere dal tipo di proteine presenti in quanto è quantitativamente sovrapponibile in campioni con sedimento attivo e inattivo o raccolti con metodi di prelievo diversi e quindi caratterizzati dalla presenza di proteine diverse tra loro (es: proteine delle basse vie urinarie o di origine cellulare nel caso di campioni con sedimento attivo, proteine di origine ematica eliminate in eccesso o non riassorbite nel caso di campioni con sedimento inattivo). Indipendentemente dal motivo di tale variabilità la sua presenza va tenuta in debita considerazione soprattutto quando si valutino campioni con PU/CU vicino alle soglie di discriminazione tra classi IRIS diverse, che potrebbero quindi essere classificati erroneamente, e quando si voglia valutare la progressione della proteinuria durante il follow up di malattie caratterizzate da proteinuria o dopo monitoraggio di terapie per la proteinuria.

Un altro aspetto da tenere presente è quello della pre-diluizione del campione, che solitamente viene standardizzato a 1:20 dagli strumenti automatici. Come dimostrato in questa tesi, l'uso di un fattore di diluizione costante può portare, dopo diluizione, a concentrazioni di creatinina comunque superiori ai limiti di linearità degli strumenti e dei metodi più comunemente utilizzati. Questo può portare a un certo livello di in accuratezza nella determinazione della creatinuria. Questa possibile inaccuratezza sembra non influire eccessivamente sul PU/CU, ma esiste la possibilità che vengano classificati erroneamente alcuni campioni, ancora una volta caratterizzati da PU/CU vicini ai valori soglia che discriminano tra le diverse classi IRIS di proteinuria. Per evitare questo possibile errore si può usare, come accorgimento, un fattore di diluizione maggiore, che abbassi ulteriormente la concentrazione di creatinina nel campione rispetto a quella rilevabile alla diluizione di 1:20. In questa tesi si è provato a testare l'effetto della diluizione 1:100 dimostrando che fornisce tutto sommato risultati molto simili a quelli ottenuti con la diluizione 1:20 ma che, portando in tutti i

casi la concentrazione di creatinina a rientrare nei limiti di linearità degli strumenti, fornisce risultati più accurati permettendo di evitare gli errori di classificazione sopra citati. Il rischio legato all'aumento del fattore di diluizione è quello di ridurre la concentrazione di creatinina a valori per cui si scende sotto il limite di rilevabilità dello strumento, cadendo quindi nell'errore opposto a quello che ci ha portato a testare anche la diluizione 1:100. Dato però che la concentrazione iniziale di creatinina nel campione dipende dalla concentrazione del campione stesso, e quindi dal suo peso specifico, un accorgimento utile a capire che diluizione utilizzare può essere quello di valutare il peso specifico delle urine e di utilizzare la diluizione 1:100 nei campioni più concentrati (a più alto peso specifico), nei quali la diluizione 1:20 potrebbe portare a concentrazioni di creatinina superiori ai limiti di linearità e quindi inaccurati, e quella di 1:20 in quelli più diluiti (con peso specifico più basso), nei quali l'uso della diluizione 1:100 potrebbe portare a concentrazioni di creatinina inferiori ai limiti di linearità dello strumento e quindi inaccurati.

Infine, l'analisi dei campioni conservati ha evidenziato che indipendentemente dalle condizioni di conservazione la concentrazione di proteine nel campione tende nel tempo ad aumentare, aumentando di conseguenza il PU/CU. Questo aumento è molto rapido nei campioni conservati a temperatura ambiente, che già a 12 ore presentano valori di PU/CU diversi da quelli basali. L'analisi quantitativa della proteinuria va quindi eseguita immediatamente dopo il prelievo in quanto già in poche ore di conservazione a temperatura ambiente i risultati dell'analisi sarebbero inaccurati con possibilità di errata classificazione dei campioni in classi IRIS inferiori o, più frequentemente superiori, rispetto alla classe di origine. La conservazione a temperatura di refrigerazione a 12 ore presenta lo stesso inconveniente sopra descritto (sovrastima del PU/CU) ma permette di mantenere valori di PU/CU leggermente superiori ma comunque sovrapponibili a quelli originali anche se a partire da una settimana di conservazione i risultati tendono ad essere eccessivamente elevati. Il congelamento, invece, pur non evitando un modico aumento del PU e quindi del PU/CU, mantiene più a lungo il PU/CU entro valori simili a quelli di partenza o comunque non superiori a quella che può essere la normale imprecisione analitica del metodo citata in precedenza. Di conseguenza solo i campioni il cui PU/CU di partenza è vicino ai valori soglia che differenziano le diverse classi IRIS, possono subire alterazioni artefattuali della classe di appartenenza.

In conclusione, quindi, l'analisi quantitativa della proteinuria, pur rimanendo uno strumento indispensabile nell'inquadramento di patologie renali deve considerare variabili pre-analitiche quali un possibile aumento dei valori in condizioni di temperatura ambiente e, più tardivamente, in condizioni di refrigerazione o di congelamento, o di variabili analitiche intrinseche (imprecisione del metodo, soprattutto a valori bassi di PU/CU) o gestibili dall'operatore (es: influenza del fattore di diluizione sulla determinazione della creatininuria).

CONCLUSIONI

In conclusione, nell'ambito di questa tesi è stato possibile utilizzare i tradizionali protocolli di validazione analitica e diagnostica per mettere a punto una serie di test utili sia ai fini della ricerca che in ambito clinico, con particolare riguardo a marker che possano svolgere un ruolo diagnostico, prognostico o possano costituire un fattore di rischio utile per stabilire la prognosi dei pazienti. A seconda dello studio sperimentale, per alcuni marker è stata effettuata solo una validazione analitica, in altri casi solo diagnostica e in altri ancora uno studio completo comprendente tutte e quattro le fasi riportate nella parte introduttiva di questa tesi.

In particolare l'Hcy è stata sottoposta a tutte e quattro le fasi della validazione dalla I (validazione analitica che ha dimostrato un'ottima precisione e accuratezza), alla II fase (confronto tra cani sani e affetti da patologie evidenti, risultando più elevata nei gruppi con patologie renali e cardiache), alla III fase (nella quale sono state indagate patologie specifiche per le quali era atteso un incremento della concentrazione di Hcy, quali IBD, patologie cardiache e renali) ed infine la IV fase (per definire l'utilità e l'applicabilità clinica in particolare il follow up delle patologie cardiache). In concomitanza è stato valutato anche un altro marker d'ipertensione: l'ET-1 che ha subito la I fase della validazione e poi per quanto riguarda le patologie renali è stato confrontato, sugli stessi campioni, con l'Hcy per determinare il comportamento in corso di patologia (fase III). Sebbene l'Hcy aumenti con il progredire dell'insufficienza renale, l'ET-1 ha dimostrato lo stesso comportamento anche in relazione allo sviluppo del processo infiammatorio concomitante e con l'ipertensione, consentendo così un migliore monitoraggio della terapia. Rimane da chiarire se l'ET-1 sia un marker per la diagnosi dell'ipertensione in corso di insufficienza renale oppure se sia un marker da utilizzare nel follow up per valutare l'andamento clinico in pazienti nefropatici.

Per quanto riguarda le performances analitiche della determinazione del rapporto tra proteine e creatinina urinaria è stata sviluppata solo la I fase dal momento che l'utilità clinica di questo tipo di test è nota da molto tempo. La variabilità rilevata può influenzare l'interpretazione dei risultati e questo sottolinea l'importanza di rispettare la sequenza dei quattro steps previsti dalla validazione.

Per altri marker è stata effettuata la validazione analitica, che ha sempre dato risultati soddisfacenti, per poi essere applicati in determinate condizioni patologiche e sperimentali. In particolare per i markers infiammatori quali:

- dROMs applicati nei cani affetti da leishmaniosi, nei quali i dROMs dimostrano un ottimo potenziale diagnostico come marker precoce di infezione con *Leishmania*, dato che la loro concentrazione aumenta nei cani con leishmaniosi clinicamente non evidente. Sembra inoltre che consenta di evidenziare il rapporto tra l'agente patogeno e il tipo di risposta immunitaria in atto che caratterizza appunto il passaggio tra la forma non sintomatica a quella sintomatica.
- dROMs applicati *in vitro* su leucociti felini incubati con peptidi potenzialmente immunogeni. In questo caso l'applicabilità diagnostica del test è risultata piuttosto scarsa, nonostante sia stato dimostrato che questi peptidi siano in grado di generare uno stato ossidativo

- attività paraoxonasica: la determinazione della PON1 è precisa, accurata, ed economica. Inoltre gli studi preliminari hanno evidenziato un comportamento analogo a quello dell'uomo come proteina di fase acuta negativa sia nel cane che nel bovino, con potere antiossidante. Queste due caratteristiche biologiche hanno un grande potenziale diagnostico, da approfondire con le fasi III e IV della validazione.
- Acido sialico: la validazione di questo test ha dato risultati eccellenti sia in termini di precisione che di accuratezza e per questo è stato possibile impiegarlo in uno studio sulla patogenesi della FIP confermando l'ipotesi che lo sviluppo della FIP non dipende esclusivamente dal ceppo virale o dalla risposta immunitaria dell'ospite, ma piuttosto dall'interazione tra queste due.

Una parte degli studi sperimentali ha riguardato la messa a punto di nuovi test: a differenza degli altri lavori in questo caso non erano disponibili kit commerciali da validare nella specie di interesse, ed è quindi stato necessario mettere a punto tutto il procedimento analitico.

In particolare:

- È stato messo a punto di un metodo per la determinazione del tipo di sialilazione e di sialiltrasferasi sia nel sangue che nell'omogeneato di tessuto mammario neoplastico. Grazie a questo approccio è stato possibile determinare che il tipo di sialilazione con conformazione $\alpha 2,6$ è in grado di influenzare la metastatizzazione delle cellule neoplastiche.
- La prima parte dello studio *in vitro* eseguito stimolando con i peptidi i leucociti felini è stata la messa a punto del metodo per la determinazione dell'IFN- γ nel plasma dopo l'incubazione.

Inoltre, per quanto riguarda gli strumenti di ematologia, sono stati definiti due nuovi parametri da utilizzare entrambi per lo strumento Sysmex XT-2000iV:

- un gate per l'identificazione di un segnale di allarme per identificare cellule circolanti potenzialmente neoplastiche, in modo da annullare i falsi negativi e minimizzare i falsi positivi in corso di leucemia. Questo consente di sottoporre all'osservazione dello striscio ematico al microscopio ottico solo un numero ridotto di campioni.
- un gate per l'identificazione delle piastrine con frazione ad alta fluorescenza nei cani di razza Norfolk terrier che analogamente ai Cavalier King Charles spaniels, possono essere affetti da macrotrombocitopenia ereditaria. Questo gate consente di identificare i soggetti colpiti da questa patologia che, considerando l'assenza di sintomi correlati, non necessita di indagini più approfondite da parte del clinico.

BIBLIOGRAFIA

- Abe M., Bright A., Carraway K. L., Hayes D.F., Hull S.R., Kufe D.W., Oligosaccharide differences in the DF3 sialomucin antigen from normal human milk and the BT-20 human breast carcinoma cell line, *Cancer Commun.*, 1, 261-7 (1989).
- Acestor N, Masina S, Ives A, Walker J, Saravia NG, Fasel N: Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous leishmaniasis, *J Infect Dis.*, 194(8):1160-7, 2006
- Addie DD, Jarrett O: Use of reverse-transcriptase polymerase chain reaction for monitoring the shedding of feline coronavirus by healthy cats. *Vet Rec*, 2001, 148(21): 649-653.
- Addie DD, Paltrinieri S, Pedersen N Recommendations from workshops of the second international feline coronavirus/feline infectious peritonitis symposium. *J Fel Med & Surg*, 2004, 6: 125-130.
- Addie DD, Schaap IA, Nicolson L, Jarrett O: Persistence and transmission of natural type I FCoV infection. *J Gen Virol*, 2003, 84: 2735-2744.
- Aizawa S., Fukumoto S., Furukawa K., Haraguchi M., Inoue M., Itoh M., Iwamoto T., Kawano T., Matsuda Y., Miyazaki H., Oishi H., Okada M., Okajima T., b-Series ganglioside deficiency exhibits no definite changes in the neurogenesis and the sensitivity to Fas-mediated apoptosis but impairs regeneration of the lesioned hypoglossal nerve, *J. Biol. Chem.*, 277, 1633-1636 (2002).
- Ajona D., Cestana Z., Cuttita F., Garayoa M., Martínez A., Montrenga L., Pajares M., Pio R., Expression of complement factor H by lung cancer cells: effects on the activation of the alternative pathway of complement, *Cancer Res.*, 64, 6310-6318 (2004).
- Alcami A., Koszinowski U. H.: "Viral mechanisms of immune evasion". *Trends in Microbiology* 8; 410-418, 2000
- Altamari A., Chiricolo M., Dall'Olio F., D'Errico A., Fiorentino M., Grigioni W., Gruppioni E., Expression of β-galactoside α-2,6 sialyltransferase and of α-2,6-sialylated glycoconjugates in normal human liver, hepatocarcinoma, and cirrhosis, *Glycobiology*, 14, 39-49 (2004).
- Alvar J, Canavate C, Molina R, Moreno J, et al.: Canine leishmaniasis, *Adv Parasitol* 57:1-88, 2004
- Ambroziak M., Bartoszewicz Z., Bogdańska M., Górnicka B., Jazdzewski K., Kiljanowski J., Nauman J., Pachucki J., Stachlewska E., Wiechno W., Thyroid Sialyltransferase mRNA Level and Activity are Increased in Graves' Disease, *THYROID*, 15, Number 7, (2005).
- Amusatgui I. Sainz A. Rodriguez F. Tesouro MA.: Distribution and relationships between clinical and biopathological parameters in canine leishmaniasis, [Journal Article] *European Journal of Epidemiology*. 18(2):147-56, 2003
- and behavioural deficits in single- and double-null mice, *Exp. Neurol.*, 195, 208-217 (2005).
- Antón IM, Suñé C, Meloen RH, Borrás-Cuesta F, Enjuanes L. A transmissible gastroenteritis coronavirus nucleoprotein epitope elicits T helper cells that collaborate in the in vitro antibody synthesis to the three major structural viral proteins. *Virology*. 1995 Oct 1;212(2):746-51.
- Augè C., Breton C., Chazalet V., Delannoy P., Haurdin-Lepers A., Jeanneau C., Soumpasis D., Structure-function analysis of the human sialyltransferase ST3Gal I, *J.Biol. Chem.*, 279, 13461-13468 (2004).
- Augustus L., Chi R., Fan D., Hostetter R., Jessup J., Mankarious R., Thomas P., Toth C., Carcinoembryonic antigen as a selective enhancer of colorectal cancer metastases, *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 380-385, (1990).
- Avery PR, Avery AC. Molecular methods to distinguish reactive and neoplastic lymphocyte expansions and their importance in transitional neoplastic states. *Vet Clin Pathol*. 2004;33:196-207.

- Aviram M., Rosenblat M. Paraoxonases 1,2, and 3, oxidative stress, and macrophage cell formation during atherosclerosis development. *Free Rad Biol Med* 37:1304-1316; 2004
- Azawedo E., Barrios C., Eliasson I., Engstrom W., Kingstrom L. E., Larsson O., Mollermark G., Expression of c-myc in canine mammary tumors, *Anticancer Res.*, 7, 1235-1238, (1981).
- Barbis D P, Chang S-F, Parrish C R: Mutations adjacent to the dimple of the canine parvovirus capsid structure affect sialic acid binding. *Virology*, 1992, 19: 301-308.
- Bardon M., Diaz S., Gagneux P., Muchmore E., Tangvoranuntakul P., Varki A., Varki N., Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhumandietary sialic acid, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 100, 12045-12050 (2003).
- Barlough JE, Stoddart CA: Feline Infectious Peritonitis. *Vet Rep*, 1990, 1: 13-17.
- Barton M. Kiowski W. The therapeutic potential of endothelin receptor antagonists in cardiovascular disease. *Curr. Hypertens. Rep.* - 2001. - 3. - p. 322-330.
- Barton M. Lusher T.F. Endothelin antagonists for hypertension and renal disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* - 1999. - 8. - p. 549-556.
- Barton M. Yanagisawa M. Endothelin: 20 years from discovery to therapy. *Can. Journal Physiol. Pharmacology.* - 2008. - 86. - p. 485-498.
- Baumann H., Gauldie J.: The acute phase response, *Immunology Today*, 15: 74-80, 1994
- BEARMAN R.M., KJELDSBERG C.R., PANGALIS G.A. & RAPPAPORT H. (1981) Chronic Monocytic Leukemia in Adults. *Cancer* 48, 2239-2255
- Beatrice L., Nizi F., Callegari D., Paltrinieri S., Zini E. D'Ippolito P., and Zatelli A. Comparison of urine protein-to-creatinine ratio in urine samples collected by cystocentesis versus free catch in dogs. *Journal of American Veterinary Medical Association* 236(11): 1221-1224; 2010
- Bell A, Ranford-Cartwright L: Real-time quantitative PCR in parasitology, *Trends Parasitol.*, 18(8):338, 2002
- Benbrook O., Cummings R., Gautam T., Hanigan M., Ju T., Laszik Z., Lenneau G., Stowell S., Wang Y., Wang W., Willard M., Xia B., Xia Y., Zuna R., Human tumor antigens Tn and sialyl Tn arise from mutations in Cosmc, *Cancer Res.*, 68, 1636-1646 (2008).
- Bender S.B., Klabunde R.E. Altered role of smooth muscle endothelin receptors in coronary endothelin-1 and alpha1-adrenoceptor-mediated vasoconstriction in Type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Oct;293(4):H2281-8
- Berge P., Schriewer H., Wilhelm A., Sialyltransferase Activity in tumor tissues, *Klin Wochenschr*, 62, 331-336, (1984)
- Berge P., Schriewer H., Wilhelm A., Wust G. Serum-Sialyltransferase activity in cancer patients. *Klin Wochenschr*, 60: 445-449; 1982
- Berger E., Hesford F., Localization of galactosyl- and sialyltransferase by immunofluorescence: Evidence for different sites, *Proc. Nati. Acad. Sci. USA*, 82, 4736-4739, (1985).
- Bertazzolo W., Comazzi S., Sesso L., Scarpa P., Ru G., Paltrinieri S. Comparison of methods for determinino platelet numbers and volume in cavalier King Charles spaniels. *Journal of Small Animal Practice* 48(12): 556-561; 2007
- Bevilacqua M, Butcher E, Furie B, Furie B, Gallatin M, Gimbrone M, Harlan J, Kishimoto K, Lasky L, McEver R: Selectin: a family of adhesion receptor. *Cell*, 1991, 67: 233.

- Bevilacqua M., Butcher E., Furie B., Furie B., Gallatin M., Gimbrone M., Harlan J., Kishimoto K., McEver R., Selectin: a family of adhesion receptor, *Cell*, 67, 233 (2007).
- Bianchini V, D'Amico S: Utilizzo dell'associazione di enrofloxacin (Baytril®) e metronidazolo nella cura della leishmaniosi del cane, National Sanitary Gathering of Studies, www.nsgs.it, 2003
- Bibbins-Domingo K., Lin F., Vittinghoff E., Barrett-Connor E., Grady D. and Shlipak M.G. Renal insufficiency as an independent predictor of mortality among women with heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 19(44): 1593-1600, 2004
- Bieberich E., Kapitonov D., Yu R.K., Combinatorial PCR approach to homology-based cloning: cloning and expression of mouse and human GM3-synthase, *Glyconj. J.*, 16, 337-350 (1999).
- Bikker A., Collard J., Schijven J., Cell surface sialic acid and the invasive and metastatic potential of T-cell hybridomas, *Cancer Res.*, 46, 3521–3527 (1986).
- Billecke S., Draganov D., Counsell R., Stetson P., Watson C., Hsu C., La Du B.N. Human serum paraoxonase (PON1) isoenzymes Q and R hydrolyze lactones and cyclic carbonate esters. *Drug Metab Dispos* 28:1335-1342; 2000
- Bionaz M., Trevisi E., Librandi F., Ferrari A., Bertoni G. Plasma paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transilvano dairy cows. *Journal of Dairy Science* 90: 1740-1750; 2007
- Biondo A. W. Wiedmeyer C., Sisson D. D., Solter P. F. Comparative sequences of canine and feline Endothelin-1. *Veterinary Clinical Pathology*. - 2003. - 4: Vol. 32. - p. 188-193.
- Birjmohun RS, Van Leuven SI, Levels JHM, Van't Veer C, Kuivenhoven JA, meijers JCM, Levi M, Kastelein JJP, Van der Poll T, Stroes ESG. High-density lipoprotein attenuates inflammation and coagulation on endotoxin challenge in humans. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 1153–1158.
- Bisti S, Konidou G, Boelaert J, Lebastard M, Soteriadou K: The prevention of the growth of *Leishmania major* progeny in BALB/c iron-loaded mice: a process coupled to increased oxidative burst, the amplitude and duration of which depend on initial parasite developmental stage and dose, *Microbes Infect.*, 8(6):1464-72, 2006
- Bisti S, Soteriadou K: Is the reactive oxygen species-dependent-NF-kappaB activation observed in iron-loaded BALB/c mice a key process preventing growth of *Leishmania major* progeny and tissue-damage?, *Microbes Infect.*, (6):1473-82, 2006
- Bizzeti M: La sierolettroforesi per il controllo nel cane della leishmaniosi, *Obiett. Doc. Vet.*, 6:11-5, 1998
- Blacher J., Demuth K., Guerin A.P. et al. Association between plasma homocysteine concentrations and cardiac hypertrophy in end-stage renal disease. *Journal of Nephrology* 12: 248-255, 1999
- Black M., Gilbertson S., Hurvitz A., Kurzman I., Canine mammary epithelial neoplasm:biological implications of morphologic characteristics assessed in 232 dogs, *Vet. Pathol.*, 20, 127-142 (1983).
- Blaser C., Kaufmann M., Pircher H., Schwaertz-Albiez R., Takashima S., Tsuji S., Identification of an α 2,6-sialyltransferase induced early after lymphocyte activation, *Int. Immunol.*, 11, 731-738 (1999).
- Bloom E., Hakomori S., Itzkowitz S., Kim Y., Kokal W., Modin G., Sialosyl-Tn. A novel mucin antigen associated with prognosis in colorectal cancer patients, *Cancer*, 66, 1960–6 (1990).
- BLUE J.T. (2000) Myelodysplastic Syndromes and Myelofibrosis. In: Schalm's veterinary hematology. 5th edn. Eds. Feldman B.V., Zinkl J.G. and Jain N.C. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. pp. 682-688

- Bochsler, P.N., Slauson D.O., 2002: Inflammation and Repair of Tissue, In: Slauson D.O., Cooper B.J. (Eds) Mechanism of Disease. A textbook of comparative general pathology. 3rd Ed, Mosby, St. Louis, pp.140-245.
- Bodgan C, Rollinghoff M: The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion, *Int J Parasitol.*, 28(1):121-34, 1998
- Borsig L., Stevenson J.L., Varki A., Heparin attenuates metastasis mainly due to inhibition of P- and L-selectin, but non-anticoagulant heparins can have additional effects, *Thromb. Res.*, 120 (Suppl. 2), S107-S111
- Borsiq L., Le D., Varki A., Varki N., Warhenbrock , Selectin-mucin interaction as a probable molecular explanation for the association of Trousseau syndrome with mucinous adenocarcinomas, *J. Clin. Invest.*, 112, 853-862 (2003).
- Bossolasco S, Gaiera G, Olchini D, Gulletta M, Martello L, Bestetti A, Bossi L, Germagnoli L, Lazzarin A, Uberti-Foppa C, Cinque P.: Real-time PCR assay for clinical management of human immunodeficiency virus-infected patients with visceral leishmaniasis, *J Clin Microbiol.*, 42(4):1858, 2003
- Bossuyt P.M., Reitsma J.B., Bruns D.E., Gatsonis C.A., Glasziou P.P., Irwig L.M., Lijmer J.G., Moher D. Rennie D., De Vet H.C. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Standard for Reporting of Diagnostic Accuracy. *Clinical Chemistry* 49(1):1-6; 2003a
- Bossuyt P.M., Reitsma J.B., Bruns D.E., Gatsonis C.A., Glasziou P.P., Irwig L.M., Moher D. Rennie D., De Vet H.C. The STARD statement for reporting studies of diagnostic accuracy: explanation and elaboration. *Clinical Chemistry* 49(1):7-18; 2003b
- Brachelente C, Muller N, Doherr MG, Sattler U, et al.: Cutaneous leishmaniasis in naturally infected dogs is associated with a T helper-2-biased immune response, *Vet Pathol* 42:166-175, 2005
- Branten AJ, Wetzels JF: Immunosuppressive treatment of patients with a nephrotic syndrome due to minimal change glomerulopathy, *Ned Tijdschr Geneeskd.*, 26;142(52):2832-8, 1998
- Breen K.,Coughlan C., The control of sialyltransferase activity in tumor-cell lines derived from different tissues in multifactorial, *FEBS Lett.*, 369(2-3), 260-2 (1995).
- Bremer E., Cerullo L., Kaneko Y., Kersey D., Leestma J., Mkrdichian E., Moskal J., Saito T., Yamamoto H., Yong V., Alpha2,3-sialyltransferase mRNA and alpha2,3-linked glycoprotein sialylation are increased in malignant gliomas, *Brain Res.* , 25, 755, 175-9, (1997).
- Bretagne S, Durand R, Olivi M, Garin JF, Sulahian A, Rivollet D, Vidaud M, Deniau M.: Real-time PCR as a new tool for quantifying *Leishmania infantum* in liver in infected mice, *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(4):828-31,
- Brian E., Steele D., Thomas P., Toth A., Wagner E., Sialyltransferase activity and hepatic tumor growth in a nude mouse model of colorectal cancer metastases, *Cancer Research*, 52, 1775-1779, (1992).
- Brockhausen I, In *Glycoproteins*, edited by Montreuil J,
- Brockhausen I, Pathways of O-glycan biosynthesis in cancer cells, *Biochim Biophys Acta*, 1473, 67-95 (1999).
- Brockhausen I., Burchell J., Clausen H., Dalziel M., Gschmeissner S., McFarlane I., Papadimitriou J., Schwientek T., Whitehouse C., The relative activities of the C2GnT1 and ST3Gal-I glycosyltransferases determine O-glycan structure and expression of a tumor-associated epitope on MUC1, *J. Bio.l Chem.*, 276, 11007-15 (2001).
- Brockhausen I., Burchell J., Papadimitriou J., Whitehouse C., Yang J., Mechanisms underlying aberrant glycosylation of MUC1 mucin in breast cancer cells, *Eur. J. Biochem.*, 233, 607-17 (1995).

- Brockhausen I., Byrd J., Chung Y., Kim Y., Matta K., Okuno M., Siddiki B., Sowa M., Yang J., Alterations of O-glycan biosynthesis in human colon cancer tissues, *Glycobiology*, 4, 873–84 (1994).
- Brockhausen I., Corfield A., Dole K., Matta K., Myerscough N., Paraskeva C., Vavasseur F., Yang J., O-glycan biosynthesis in human colorectal adenoma cells during progression to cancer, *Eur. J. Biochem.*, 222, 415–24 (1994).
- Brodey R. S., Fidler I. J., The biological behaviour of canine mammary neoplasm, *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 151, 1311-1318 (1967).
- Brodey R., Fidler I., A necropsy study of canine malignant mammary neoplasms, *J. Am Vet. Med. Assoc.*, 151, 710–715 (1967).
- Bruckner H., Itzkowitz S., Rivera-MacMurray S., Tatematsu M., Werther J., Mucin-associated sialosyl-Tn antigen expression in gastric cancer correlates with an adverse outcome, *B.r J. Cancer*, 69, 613–6 (1994).
- Burchell J., Kudryashov V., Lloyd K., Papadimitriou J., Yin B., Comparison of O-linked carbohydrate chains in MUC-1 mucin from normal breast epithelial cell lines and breast carcinoma cell lines. Demonstration of simpler and fewer glycan chains in tumor cells, *J. Biol. Chem.*, 271, 33325–34 (1996).
- Capelli G, Baldelli R, Ferroglio E, Genchi C, et al.: Monitoring of canine leishmaniasis in northern Italy: an update from a scientific network, *Parassitologia* 46:193–197, 2004
- Castagnaro M., Crotti A., Fondati A., Gradoni L., Lubas G., Maroli M., Oliva G., Paltrinieri S., Solano-Gallego L., Roura X., Zatelli A., Zini E. (2007) Leishmaniosi canina: linee guida su diagnosi, stadiazione, terapia, monitoraggio e prevenzione. Parte I: Approccio diagnostico e classificazione del paziente leishmaniotico e gestione del paziente proteinurico, *Veterinaria*, in corso di stampa
- Ceccanti M., Balducci G., Albano E.: I radicali liberi in medicina, in *Radicali liberi in medicina*, I:3-9, 1993
- Cecilian F, Giordano A, Spagnolo V: The systemic reaction during inflammation: the acute phase proteins. *Prot Pept Lett*, 2002, 3: 211-223.
- Cecilian F, Grossi C, Giordano A, Pocacqua V, Paltrinieri S: Decreased sialylation of the acute phase protein α 1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 2004, 99:229-236.
- Cecilian F., Giordano A., Spagnolo V.: The systemic reaction during inflammation: the acute-phase proteins, *Protein and Peptide Letters*, 9: 211-223, 2002
- Cecilian F., Grossi C., Giordano A., Pocacqua V., Paltrinieri S.: Decreased sialylation on the acute phase protein α 1-acid glycoprotein in feline infectious peritonitis (FIP), *Veterinary Immunology and Immunopathology*, in corso di stampa, 2004
- cell and atypical lymphocyte morphological differentials. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42:371-377.
- Center S.A., Wilkinson E, Smith C.A., Erb H, and Lewis R.M. 24-hour urine protein/creatinine ratio in dogs with protein-losing nephropaties. *Journal of American Veterinary Medical Association* 187: 820-824; 1985
- Ceretto H, Lopez GV: Antioxidants derived from vitamin E: an overview, *Mini Rev Med Chem.*, 7(3):315-38, 2007
- Ceron J., Eckersall P., Martinez-Subiela S., Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives, *Vet Clin Path*, 34, 85-99 (2005).
- Ceron JJ, Eckersall PD, Martinez-Subiela S: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Vet Clin Path*, 2005, 34: 85-99.
- Ceron, J.J., Eckersall, P.D., Martinez-Subiela, S.: Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspective., *Veterinary Clinical Pathology* 34, 85-99, 2005
- Cerundolo R: Terapia della leishmaniosi canina, *Atti Incontro SIDEV* 25 febbraio 2001

Chait A., Han C.Y., Oram J.F., Heinecke J.W. Lipoprotein-associated inflammatory proteins: markers or mediators of cardiovascular disease? *Journal of Lipid Research* 46: 389-403; 2005

Chamizo C, Moreno J, Alvar J: Semi-quantitative analysis of cytokine expression in asymptomatic canine leishmaniasis, *Vet Immunol Immunopathol* 103:67-75, 2005

Chang W., Hsu C., Lin T., Lo W., Tsai Y., Wang, P., Wu C., Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids, *Gynecol. Oncol.*, 96, 415–422 (2005).

changes of lipoproteins. *J Infect Dis* 2000; 181(Suppl. 3): S462–S472.

Chatterjee SK, Bhattacharya M, Barlow JJ. Glycosyltransferase and glycosidase activities in ovarian cancer patients. *Cancer Res.* 1979 Jun;39(6 Pt 1):1943-51.

Chen S., Fukuda M., Cell type-specific roles of carbohydrates in tumor metastasis, *Methods Enzymol.*, 416, 371-380 (2006).

Cheresh D., Reisfeld R., Varki A., O-Acetylation of disialoganglioside GD3 by human melanoma cells creates a unique antigenic determinant, *Science*, 225, 844-846 (1984).

Chrostek L, Cywik B, Krawiec A, Korcz W: Relationship between serum sialic acid and sialylated glycoproteins in alcoholics. *Alcohol & Alcoholism*, 2007, 42:588-592.

Chui D., Fukuda M., Hiraoka N., Marth J.D., Varki N.M., Page D., Priatel J., Richardson K.B., Simmons C., The ST3Gal-I sialyltransferase controls CD8+ T lymphocyte homeostasis by modulating O-glycan biosynthesis, *Immunity*, 12, 273-283 (2000).

Chui D., Hennet T., Marth J.D., Paulson J.C., Immune regulation by the ST6Gal sialyltransferase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 4504-4509 (1998).

Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, et al.: A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*, *Vet Rec* 141(21):539-543, 1997

Ciaramella P., De Luna R: Leishmaniosi del cane: aspetti clinico diagnostici, *Obiett. Doc. Vet.*, 4 suppl.:13-25, 1999

Clemens M. J.: "Interferons and apoptosis". *Journal of Interferon and Cytokine Research* 23 ; 277-292, 2003

Clin Microbiol. 41(4):1529-35, 2003

Cockerill G.W., Rye K.A., Gamble J.R. Vadas M.A., Barter P.J. High density lipoproteins inhibit cytokine induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 656-661; 1995

Colella G.: *Argomenti di patologia tropicale e sub-tropicale degli animali domestici*, Edagricole™, 1979

Colin-Hughes R, Galectins as modulators of cell adhesion, *Biochimie* 83, 667–76 (2001).

Comazzi S, Gelain ME, Spagnolo V, Riondato F, Guglielmino R, Sartorelli P. Flow cytometric patterns in blood from dogs with non-neoplastic and neoplastic hematologic diseases using double labeling for CD18 and CD45. *Vet Clin Pathol.* 2006;35:47-54.

Conzelmann S., Gerardy-Schahn R., Hildebrandt H., Marth J., Muhlenhoff M., Rockle I., Schertzinger F., Seidenfaden R., Weinhold B., Seidenfaden R., Genetic ablation of polysialic acid causes severe neurodevelopmental defects rescued by deletion of the neural cell adhesion molecule, *J. Biol. Chem.*, 280, 42971-42977 (2005).

Cooke G.E., Eaton G.M., Whitby G. et al. Plasma atherogenic markers in congestive heart failure and posttransplant (heart) patients. *Journal of the American College of Cardiology* 36: 509-516, 2000

Cookman G., King W., Regan C., Chronic low-level lead exposure impairs embryonic to adult conversion of the neural cell adhesion molecule, *J. Neurochem.*, 49, 399-403 (1987).

Correa SS, Mauldin GN, Mauldin GE, Mooney SC: Serum alpha 1-acid glycoprotein concentration in cats with lymphoma. *J Am An Hosp Assoc*, 2001, 37:153-158.

Costello M., Fiedel B., Gewurz H.: Inhibition of platelet aggregation by native and desialised alpha-1-acid glycoprotein, *Nature*, 281: 677-678, 1979

Cotchin E., Mammary neoplasm of the bitch, *J.Comp. Pathol.*, 68, 1-20 (1958).

Crawford T., Fromholt S., Griffin J., Hess E., Pan B., Schnaar R., Sheikh K., Myelin- associated glycoprotein and complementary axonal ligands, gangliosides, mediate axon stability in the CNS and PNS: neuropathology

Crocker PR, Varki A, Siglecs, sialic acids and innate immunity, *Trends Immunol.* 22, 337-42 (2001).

Crook M, Haq M, Haq S, Tutt P: Plasma sialic acid and acute phase proteins in patients with myocardial infarction. *Angiology*, 1994, 45:709-715.

Crook M., Tutt P., Simpson H., Pickup J., Serum sialic acid and acute phase proteins in type 1 and type 2 diabetes mellitus, *Clin. Chim. Acta*, 219, 131-138 (1993).

Crook MA, Couchman S, Tutt P: Plasma fibrinogen and its relationship to plasma sialic acid in non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Blood Coagul Fibrinolysis*, 1996, 7:586-589. Non citato nel testo: o lo citi nel testo o lo togli da qui

Cummings R. D., Ju T., Protein glycosylation: chaperone mutation in Tn Syndrome, *Nature*, 437, 1252 (2005).

Cunningham AC, Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania, *Exp Mol Pathol.*, 72(2):132-41, 2002

Cylwik., 2005 Citato nel testo ma non presente nella lista. Aggiungere

Dall'Olio F., Trere D., Expression of α 2,6-sialylated sugar chains in normal and neoplastic colon tissues. Detection by digoxigenin-conjugated Sambucus nigra agglutinin, *Eur J Histochem.*, 37, 257-265 (1993).

Dall'olio F., Trere D., Expression of alpha 2,6 sialylated sugar chain in normal and neoplastic colon tissues. Detection by digoxigenin conjugated sambucus nigra agglutinin, *Eur. J. Histochem.* 37, 257-265 (1993).

Dall'Olio F., Di Stefano G., Malagolini N., Marrano D., Minni F., Serafini-Cessi F., Increased CMP-NeuAc:Gal beta 1,4GlcNAc-R alpha 2,6 sialyltransferase activity in human colorectal cancer tissues, *Int J. Cancer*, 44, 434-9 (1989).

Danese S., Sgambato A., Papa A., Scaldaferri F., Pola R., Sans M., Lovecchio M., Gasbarrini G., Cittadini A., Gasbarrini A. Homocysteine triggers mucosal microvascular activation in inflammatory bowel disease. *American Journal of Gastroenterology* 100: 886-895; 2005

Das M. R., Jain N., Sudhakar C., Regulation of expression of β - galactoside α 2,6-sialyltransferase in a rat tumor, Zajdela ascetic hepatoma, *FEBS*, 1,2, 147-151, (1993).

Datta A., Paulson J.C., Tsuji S., Systematic nomenclature for sialyltransferase, *Glycobiology*, 6, 5-9 (1996).

Datta A.K., Paulson J.C., The sialyltransferase 'sialomotif' participates in binding the donor substrate CMP-NeuAc, *J.Biol.Chem.*, 270, 1497-1500 (1995)

Davenport A.P. Update on endothelin receptor nomenclature. *Pharmacol.* - 2002. - 54. - p. 219-226.

- Davis B., Toivia-Kinnucan M., Schuller S., Boudreaux M.K. Mutation in α 1-tubulin correlates with macrothrombocytopenia in Cavalier King Charles Spaniels. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 22(3): 540-545; 2008
- De Graaf T., Van Der Stelt M., Amberger M., Van Dijk W.: Inflammation-induced expression of sialyl Lewis X-containing glycan structures on alpha-1-acid glycoprotein (orosomucoid) in human sera, *Journal of Experimental Medicine*, 177: 657-666, 1993
- De Souza A.I., Juliano R.S., Gomes T.S., de Araujo Diniz S., Borges A.M., Tafuri W.L., de Lima Santos R: Osteolytic osteomyelitis associated with visceral leishmaniasis in a dog - *Vet. Parasitol.*, 129(1-2):51-4, 2005
- De Souza-Silva U., Paulson J., Weinstein J., Purification of a Gal β 1-4GlcNAc α 2,6 sialyltransferase and a Gal β 1-3(4) GlcNAc α 3 sialyltransferase to homogeneity from rat liver, *J. Biol. Chem.*, 257, 13835-13844, (1982).
- Delannoy P., Harduin-Lepers A., Marer Y., Recchi M., Verbert A., Multiplex RT-PCR method for the analysis of the expression of human sialyltransferases: application to breast cancer cells, *Glycoconj J.*, 15, 19-27 (1998).
- Delgado-Rodriguez M, Almaraz A, Farinas-Alvarez C. Should the Definition for the Negative Likelihood Ratio Be Changed? *J Clin Epidemiol.* 1997;50:639-640.
- Delmas B, Gelfi J, L'Haridon R, Vogel LK, Sjostrom H, Noren O, Laude H: Aminopeptidase N is a major receptor for the enteropathogenic coronavirus TGEV. *Nature*, 1992, 357:417-420.
- Denkers EY, Butcher BA: Sabotage and exploitation in macrophages parasitized by intracellular protozoans, *Trends Parasitol.*, 21(1):35-41, 2005
- Deutdch E., Ganzinger U., Serum sialyltransferase levels as a parameter in the diagnosis and follow-up of gastro-intestinal tumors, *Cancer Research*, 40, 1300-1304, (1980).
- Dianzani M. U.: "L'inflammation", in *Istituzioni di Patologia Generale*, I ed., Utet, Torino, Cap. 15, pp. 459-501, 1995
- DiBartola S.P., Chew D.J., and Jacobs G. Quantitative urinalysis including 24-hour protein excretion in the dog. *Journal of the American Animal Hospital Association* 16: 537-546; 1980
- Ditto, Ellies L.G., Ginsburg D., Le D.T., Levy G.G., Marth J.D., Varki A., Wahrenbrock M., Sialyltransferase ST3Gal-IV operates as a dominant modifier of homeostasis by concealing asialoglycoprotein receptor ligands, *Proc.Natl. Acad. Sci. USA*, 99, 10042-10047 (2002).
- Dixit M., Dwivedi C., Hardy R., Plasma sialyltransferase as a tumor marker, *Cancer detection and prevention*, 11, 191-196 (1988).
- Dou C, Xia D, Zhang L, et al.: 2005, Development of a novel enzymatic cycling assay for total homocysteine. *Clin Chem* 51:1987-1989.
- Draganov D. I., Stetson PL, Watson CE, Billecke SS, and La Du BN. Rabbit serum paraoxonase 3 (PON3) is a high density lipoprotein-associated lactonase and protects low density lipoprotein against oxidation. *J Biol Chem* 2000;275: 33435-42.
- Drake RR, Schwegler EE, Malik G, Diaz J, Block T, Mehta A, Semmes OJ. Lectin capture strategies combined with mass spectrometry for the discovery of serum glycoprotein biomarkers. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct;5(10):1957-67
- Dries D.L., Exner D.V., Domanski M.J., Greenberg B. and Stevenson L.W. The prognostic implications of renal insufficiency in asymptomatic and symptomatic patients with left ventricular systolic dysfunction. *Journal of the American College of Cardiology* 35: 681-689, 2000
- Durrington PN, Mackness B, Mackness MI. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:473-80.

- Duthie S, Eckersall PD, Addie DD, Lawrence CE, Jarret O: Value of α 1-acid glycoprotein in the diagnosis of feline infectious peritonitis. *Vet Rec*, 1997, 141:299-303.
- Eap C., Van der Stelt E., Van Dijk W., Pos O., Inflammation induced changes in expression and glycosylation of genetic variant of alpha-1-acid glycoprotein studies with human sera in transgenic mice, *Bio Chem. J.*, 276, 343–347 (1991).
- Edelman G.M., Chuong C., Embryonic to adult conversion of neural cell adhesion molecules in normal and staggerer mice, *Proc Natl. Acad. Sci., USA*, 79, 7036-7040 (1982).
- Ellies L.G., Kansas G.S., Ley K., Marth J.D., Priatel J., Smith M., Sperandio M., Underhill G.H., Yousif J.,
- Elliott J., and Watson A.D.J. Chronic kidney disease: staging and management. In: Bonagura J.D., Twedt D.C., eds. *Kirk's current veterinary therapy XIV*. St. Louis: Saunders, 2008. pp: 883-892.
- Else R., Hellmen E., Lipscomb T., Misdorp W., Histological classification of mammary tumors of the dog and the cat, *World Health organization international histological classification of tumors of domestic animals*, VII
- Feingold KR, Memon RA, Mosser AH, Grunfeld C. Paraoxonase activity in the serum and hepatic mRNA levels decrease during the acute phase response. *Atherosclerosis* 1998; 139: 307–315.
- Feizi T, Carbohydrate-mediated recognition systems in innate immunity, *Immunol. Rev.* 173, 79–88 (2000).
- Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, Schalm Stein C, Schalm's: *Veterinary Hematology*, 5th edition. Lippincot Williams e Wilkins, Philadelphia, 2004
- Ferrè N., Camps J., Prats E., Vilella E., Paul A., Figuera L., Joven J. Serum paraoxonase activity : a new additional test for the improved evaluation of chronic liver damage. *Clinical Chemistry* 48(2): 261-268; 2002
- Ferroglio E., Maroli M., Gastaldo S., Mignone W., Rossi L: Canine leishmaniasis, Italy, *Emerg. Infect. Dis.*, 11(10):1618-20, 2005
- Fisa R, Gallego M, Castillejo S, Aisa MJ, et al.: Epidemiology of canine leishmaniasis in Catalonia (Spain) the example of the Priorat focus, *Vet Parasitol* 83(2):87-97, 1999
- Fisa R, Riera C, Gallego M, Manubens J, et al.: Nested PCR for diagnosis of canine leishmaniasis in peripheral blood, lymph node and bone marrow aspirates, *Vet Paras* 99(2):105-111, 2001
- Fletcher AE. Free radicals, antioxidants and eye diseases: evidence from epidemiological studies on cataract and age-related macular degeneration. *Ophthalmic Res.* 2010;44(3):191-8
- Foley JE, Pedersen NC: The inheritance of susceptibility to FIP in pure breed catteries. *Fel Pract*, 1996, 24:14-
- Font A, Mascort J, Altimira J, Closa JM, Vilafranca M: Acute paraplegia associated with vasculitis in a dog with leishmaniasis, *J Small Anim Pract.*, 45(4):199-201, 2004
- Fournel-Fleury, C., Magnol, J.P., Bricaire, P., Marchal, T., Chabanne, L., Delverdier, A., Bryon, P.A., Felman, P., 1997. Cytohistological and immunological classification of canine malignant lymphomas: comparison with human non hodgkin's lymphomas. *J. Comp. Pathol.* 117, 55–59.
- Fowler E. H., Koestner A., Wilson G.P., Biological behaviour of canine mammary neoplasm based on a histogenetic classification, *Vet. Pathol.*, 11, 212-229 (1974).
- Fowler E., Koestner A., Wilson G., Biologic behaviour of canine mammary neoplasms based on a histogenetic classification, *Vet. Pathol.*, 11, 212–229 (1974).

- Francino O, Altet L, Sanchez-Robert E, Rodriguez A, et al.: Advantages of real-time PCR assay for diagnosis and monitoring of canine leishmaniosis, *Vet Parasitol* 137:214-221, 2006
- Franke G., Gretschel S., Haensch W., Karsten U., Kemmner W., Schlag P., Schneider F., Overexpression of sialyltransferase CMP-sialic acid:Galbeta1,3GalNAc-R alpha6-Sialyltransferase is related to poor patient survival in human colorectal carcinoma, *Cancer Res.*, 61, 4605–11 (2001).
- Franks A., Halliday J., Martin R., Palant E., Ramsdale T., A rapid semi-automated method for detection of Galβ1-4GlcNAc α2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.1) activity using the lectin *Sambucus nigra* agglutinin, *Glycobiology*, 7, 557-564, (2001).
- Freeman K.P., Bauer N., Jensen A.L., Thoresen S. Introduction to ISO 15189: a blueprint for quality systems in veterinary laboratories. *Veterinary Clinical Pathology* 35:157-171; 2006
- Friedman A.N., Bostom A.G., Selhub J., Levey A.S., Rosenberg I.H.: The kidney and homocysteine metabolism. *J am Soc Nephrol* (2001) 12: 2181-2189
- Fukumoto S., Furukawa K., Hirabayashi Y., Ito H., Kiso M., Okajima T., Urano T., Molecular cloning of brain-specific GD1α synthase (ST6GalNAc V) containing CAG/Glutamine repeats, *J.Biol.Chem.*, 274, 30557-30562 (1999).
- Futakawa S., Hagiwara Y., Hashimoto Y., Kinoshita A., Kitazume S., Miyashita K., Ogawa K., Oka R., Development of sandwich enzyme-linked immunosorbent assay systems for plasma beta-galactoside alpha2,6-sialyltransferase, a possible hepatic disease biomarker, *Anal Chim Acta*, 631(1), 116-202 (2009).
- Gale M. J., Tan S-L, Katze M. G.: "Translational control of viral gene expression in eukaryotes". *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 239-280, 2000
- Galeotti, 1996 Citato nel testo ma non presente nella lista. Aggiungere
- Gamet Y: La Peritonite Infettiva Felina. *Eziologia, epidemiologia e patogenesi. Summa*, 2000, 4: 7-10.
- Gangneux J.P., Chau F., Sulhian A., Derouin F., Garin Y.J: Effects of immunosuppressive therapy on murine *Leishmania infantum* visceral leishmaniosis, *Eur. Cytokine Netw.*, 10(4):557-9, 1999
- Gatchev O, Rastam L, Lindberg G, Gullberg B, Eklund GA, Tornberg S: Tumours of the central nervous system and serum sialic acid concentration in men and women. *Br J Cancer*, 1993, 68:425-427.
- Gelain M.E., Rossi G., Paltrinieri S.: Use of SYSMEX XT-2000iV HEMATOLOGY ANALYSER to identify haematopoietic neoplasms in dogs, *Atti 17° ECVIM-ESVCP congress*, 2007, in corso di stampa
- Gelain M.E., Turtino G. Bertazzolo W. Macrothrombocytopenia in a group of selected Norfolk terrier. *Veterinary Record - Accepted for publication*; 2010
- Gelain ME, Mazzilli M, Riondato F, Marconato L, Comazzi S. Aberrant phenotypes and quantitative antigen expression in different subtypes of canine lymphoma by flow cytometry. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008 15;121:179-88
- Gelain ME, Rossi G, Paltrinieri S .Use of Sysmex XT-2000iV hematology analyser to identify hematopoietic neoplasms in dogs [abstract]. *Vet Clin Pathol.* 2007;36:385–386. ma dai! Quello che è finito in copertina????
- Gessner P., Kemmner W., Quentmaier A., Riedl S., Enhanced activity of CMP-neuAc:Gal beta 1-4GlcNAc:alpha 2,6-sialyltransferase in metastasizing human colorectal tumor tissue and serum of tumor patients, *Cancer Lett.*, 75, 143-9 (1993).
- Gilbertson S. R., Kurzman L.D., Prognostic factors in canine mammary tumors, *Seminars in Vet. Med. And surgery (small animal)*, 1, 25-32 (1986).

- Giordano A, Bonafè K, Capitelli R, Grieco V, Paltrinieri S: Risultati preliminari sulla risposta di fase acuta in gatti con sarcoma iniezione-indotto. Meeting AIPVET, 2004b. pagina, volume, ecc...
- Giordano A, Spagnolo V, Colombo A, Paltrinieri S: Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by FIP or exposed to FCoV infection. *Vet J*, 2004a, 167:38-44.
- Giordano A., Rossi G., Pieralisi C., Paltrinieri S.: Evaluation of equine hemograms using ADVIA 120 *Veterinary Clinical Pathology*, 2007, in corso di stampa
- Giordano A., Spagnolo V., Colombo A., Paltrinieri S. : Changes in some acute phase protein and immunoglobulin concentrations in cats affected by feline infectious peritonitis or exposed to feline coronavirus infection, *The Veterinary Journal*, 167: 38-44, 2004
- Giordano, A., Paltrinieri, S., 2009. Interferon- γ in the serum and effusions of cats with feline coronavirus infection. *Veterinary Journal* 180, 396-398.
- Goto H: Feline panleukopenia in Japan. II. Hemagglutinability of the isolated virus. *Nippon Juigaku Zasshi*, 1974, 37:239-245.
- Gowans JL, Marchesi VT: The migration of lymphocytes through the endothelium of venules in lymph nodes: an electron microscope study. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*, 1964, 159:283-290.
- Gradoni L, Gramiccia M: Leishmaniasis, In OIE manual of standards for diagnostic tests and vaccines, 4th ed. Office International des Epizooties, p. 803-812, Paris, France, 2000
- Gradoni L., Maroli M., Gramiccia M., Mancianti F: Leishmania infantum infection rates in Phlebotomus perniciosus fed on naturally infected dogs under antimonial treatment, *Med. Vet. Entomol.*, 1(4):339-42, 1987
- Gradoni L: The diagnosis of canine leishmaniasis, in Second International Canine Leishmaniasis Forum, Final programme - p.4, Seville, Spain, 6-9 feb. 2002
- Gradoni: The diagnosis of canine leishmaniasis, in: Canine leishmaniasis: moving towards a solution. Ed. R Killick-Kendrick Intervet International, Boxmeer, NL, 2002
- Grauer G.F. Canine glomerulonephritis: new thoughts on proteinuria and treatment. *Journal of Small Animal Practice* 46: 469-478; 2005
- Grauer G.F., Greco D.S., Getzy D.M., Cowgill L.D., Vaden S.L., Chew D.J., Polzin D.J., and Barsanti J.A. Effects of enalapril versus placebo as a treatment for canine idiopathic glomerulonephritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 14: 526-533; 2000
- Green M.J., Hill H.A. Chemistry of dioxygen. *Methods in Enzymology* 105: 3-22; 1984
- Griffiths J., Reynold S., Plasma sialyltransferase total and isoenzyme activity in the diagnosis of cancer of colon, *Clin. Biochem.*, 15, 46-48 (1982).
- Grundmann V., Nerlich C., Rein T., Zettlmeissl G., Complete cDNA sequence encoding human β -galactosidase
- Gruys E., Toussaint M.J.M.: Monitoring animal hygiene, welfare and health by analytics of the acute phase reaction. Non-specific assessment of infection, inflammation, bruising, stress and starvation, *Proceedings 19^o Meeting ESVP*: 113-131, 25-28 September 2001

Gruys, E, Toussaint, MJM: Monitoring Animal Hygiene, Welfare and Health by Analytes of the Acute Phase Reaction. In: Non-specific Assessment of Infection, Inflammation, Bruising, Stress and Starvation. Proceedings 19th ESVP Meeting. Thessaloniki, 2001, Greece: 113-131.

Guarga JL, Lucientes J, Peribanez MA, Molina R, et al.: Experimental infection of *Phlebotomus perniciosus* and determination of the natural infection rates of *Leishmania infantum* in dogs, *Acta Trop* 77(2):203-207, 2000

Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, et al.: Canine leishmaniasis transmission: higher infectivity amongst naturally infected dogs to sand flies is associated with lower proportions of T helper cells, *Res Vet Sci* 69(3):249-253, 2000

Guttormsen A.B., Ueland P.M., Svarstad E., Refsum H.: Kinetic basis of hyperhomocysteinemia in patients with chronic renal failure. *Kidney Int* (1997) 52: 495-502

Halliday JA, Franks AH, Ramsdale TE, Martin R, Palant E. A rapid, semi-automated method for detection of Galbeta1-4GlcNAc alpha2,6-sialyltransferase (EC 2.4.99.1) activity using the lectin *Sambucus nigra* agglutinin. *Glycobiology*. 2001 Jul;11(7):557-64

Hampe J., Misdorp W., Tumours and dysplasias of the mammary gland, *Bull WHO*, 50, 111–133, (1974).

Hart A. A. M., Misdorp W., Prognostic factors in canine mammary cancer, *J. Natl. Cancer. Inst.*, 56, 779-786, (1986).

Hart A., Misdorp W., Canine mammary cancer. II. Therapy and causes of death. *J. Small Anim. Pract.*, 20, 395–404 (1979).

Hart A., Misdorp W., Prognostic factors in canine mammary cancer, *J. Natl. Cancer Inst.*, 56, 779–785 (1976).

Hart G., Passaniti A., Cell surface sialylation and tumour cell metastatic potential of B16 melanoma variants correlates with their relative number of specific penultimate with oligosaccharide structure, *J. Biol. Chem.*, 263, 7591–7603 (1988).

HARVEY J.W. (2001) Hematopoietic neoplasms. In: Atlas of veterinary hematology. Blood and Bone Marrow of Domestic Animals. 1st edn. Philadelphia, W.B. Saunders. pp. 163-184

heart failure. *Clinical Chemistry* 51: 1512-1515. 2005

Hellme'n E., The pathogenesis of canine mammary tumors, *Cancer J.*, 9,282–286 (1996).

Henderson M., Kessel D., Alteration in plasma sialyltransferase levels in patients with neoplastic disease, *Cancer*, 39, 1129-1134, (1997).

HENNESS A.M., CROW S.E. & ANDERSON B.C. (1977) Monocytic Leukaemia in Three Cats. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 170(11), 1325-1328

Herrewegh AAPM, Meenk I, Horzinek MC, Rottier JM, De Groot RJ: Feline coronavirus type II strains FECV 79-1683 and FIPV 79-1146 originate from a double recombination between feline coronavirus type I and canine coronavirus. *J Virol*, 1998, 72:4508-4514.

Herrler G, Rott R, Klenk HD, Muller HP, Shukla AK, Schauer R: The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J*, 1985, 4:1503-1506.

Herrmann M., Kindermann I., Muller S. et al. Relationship of plasma homocysteine with the severity of chronic

Hickman MA, Morris JG, Rogers QR, Pedersen NC: Elimination of feline coronavirus infection from a large experimental specific pathogen-free cat breeding colony by serologic testing and isolation. *Fel Pract*, 1995, 23:96-102.

Hillege H.L., Girbes A.R., de Kam P.J. et al. Renal function, neurohormonal activation and survival in patients with chronic heart failure. *Circulation* 102: 203-210, 2000

- HIRAOKA H., HISASUE M., NAGASHIMA N., MIYAMA T., TANIMOTO T., WATANABE M., ITAMOTO K., MIZUNO T., INOKUMA H & OKUDA M. (2007) A dog with myelodysplastic syndrome: chronic myelomonocytic leukaemia. *The Journal of Veterinary Medical Science* 69(6), 665-668
- Hoher B, Thone-Reineke C., Rohmeiss P., Schmagar F., Slowinski T., Burst V., Siegmund F., Quertermous T., Bauer C., Neumayer H.H., Schleuning W.D., Theuring F. Endothelin-1 transgenic mice develop glomerulosclerosis, interstitial fibrosis, and renal cysts but not hypertension. *Journal Clin Invest.* - 1997. - 99. - p. 1380-1389.
- Hohdatsu T, Tokunaga J, Koyama H: The role of IgG subclass of mouse monoclonal antibodies in antibody-dependent enhancement of feline infectious peritonitis virus infection of feline macrophages. *Arch Virol*, 1994, 139:273-285.
- Hohdatsu T: Difference in virus receptor for type I and type II FIP virus. *Arch Virol*, 1998, 143: 839-----.
- Horke S, Witte I, Wilgenbus P, Krüger M, Strand D, Förstermann U. Paraoxonase-2 reduces oxidative stress in vascular cells and decreases endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation. *Circulation*. 2007 Apr 17;115(15):2055-64
- Horzinek M, Lutz H, Pedersen NC: Antigenic relationships among homologous structural polypeptides of porcine, feline and canine coronaviruses. *Infect immun*, 1982, 37:148-154.
- Hrcir Z, Pidman V, Tichy M, Hamet A: Serum sialic acid in acute myocardial infarction in a dynamic follow up. *Vnitřní Lekarství*, 1975, 21:436-439.
- Hrcir Z., Pidman V., Tichy M., Hamet A., Serum sialic acid in acute myocardial infarction in a dynamic follow up, *Vnitřní Lekarství*, 21, 436-439 (1975).
- Hsu CC, Lin TW, Chang WW, Wu CY, Lo WH, Wang PH, Tsai YC. Soyasaponin-I-modified invasive behavior of cancer by changing cell surface sialic acids. *Gynecol Oncol*. 2005 Feb;96(2):415-22.
- Hyun-Joo N et al - nomi: Identification of the Sialic Acid Structures Recognized by Minute Virus of Mice and the Role of Binding Affinity in Virulence Adaptation. *J Biol Chem*, 2006, 281:25670-25677.
- Iamele L, Amboni P, Felletti S, Pasinetti G, Auriema A, Vernocchi A.: Valori di riferimento di idroperossido nel sierodi neonati e adulti, *Biochimica Clinica*, 21: 7-8, 1997
- Ignarro L.J., Kadowitz P.J. The pharmacological and physiological role of cyclic GMP in vascular smooth muscle relaxation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*.25:171-911985
- Ikehara Y., Kitamura T., Kono M., Nakanishi H., Narimatsu H., Nishihara S., Shimizu N., Tatematsu M., Tsuji S., A novel glycosyltransferase with a polyglutamine repeat; a new candidate for GD1 α synthase (ST6GalNAc V), *Febs lett.*, 463, 92-96 (1999).
- Ippolito S, Ambroso G, Mani AR, Novembrino C, Lonati S, Ponticelli C, Bamonti F: Oxidative and nitrative status in preeclampsia and normal pregnancy, *Clin Chem Lab Med*. 41 (Special Supplement): S 301, 2003
- Jacob F., Polzin J., Osborne C.A., Neaton J.D., Kirk C.A., Allen T.A., and Swanson L.L. Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in dogs with naturally occurring chronic renal failure. *Journal of American Veterinary Medicine Association* 226(3): 393-400; 2005
- Jacobse-Geels HE, Daha MR, Horzinek MC: Antibody, immune complex, and complement activity fluctuations in Kittens with experimentally induced feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*, 1982, 43:666-670.
- Jain A, Berthwal M, Tiwari V, Maitra SC: Immune complex mediated lesions in experimental Kala azar: an ultrastructural study, *Indian J Pathol Microbiol.*, 43(1):13-6, 2000

Jain A, Tiwari V, Agarwal M.: Effect of *Leishmania donovani* antigens on superoxide anion generation by mice polymorph in vitro, *Indian J Med Res.*, 104:250-3, 1996

Jensen A.L., Kjelgaard-Hansen M. Diagnostic test validation. In: *Shalm's Veterinary Hematology*

Jensen A.L., Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. *Veterinary Clinical Pathology* 35(3):276-286; 2006

Jensen e.... *Vet clin path*).

Jessup J., Steele G., Thomas P., Wagner H., Wolf B., Zamcheck N., Characterization of the tumorigenic and metastatic potential of a poorly differentiated human colon cancer cell line, *Invasion Metastasis*, 10, 235-266, (1990).

Jessup J., Thomas P., Cacinoembryonic antigen: function in metastasis by human colorectal carcinoma, *Cancer Metastases Rev.*, 8, 263-280, (1989).

Jones DP: Extracellular redox state: refining the definition of oxidative stress in aging, *Rejuvenation Res.*, 9(2):169-81, 2006

Jörns J., Neumann U., Peumans W., Pfüller U., Pohlmeier I., Schumacher U., Van Damme E., Lectin Histochemical Investigations of the Distal Gut of Chicks with Special Emphasis on the Follicle-associated Epithelium, *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 3, 138-146 (2005).

Juttner C, Rodriguez Sanchez M, Rollan Landeras E, Slappendel RJ, Fragio Arnold C: Evaluation of the potential causes of epistaxis in dogs with natural visceral leishmaniasis, *Vet Rec.*, 149(6):176-9, 2001

Kaneko Y., Vandermulan D., Yamamoto H., The expression of CMP-NeUAc: Gal beta 1,4 GlcNac, alpha 2,6 sialyltransferase (E.C2.4.99.1) the glycoprotein bearing alpha 2,6-linked sialic acids in human brain tumours, *Glycoconjugate J.*, 12, 848-856 (1995).

Kang SH., Kim HK., Ham CK., Lee DS., Cho HI. Comparison of four haematology analyser, Cell-Dyn sapphire, ADVIA 120, Coulter LH750, and Sysmex XE-2100, in terms of clinical usefulness. *Int J Lab Hematol*, 2008;30:480-486.

Kannagi R., Miyagi T., Moriya S., Satomi S., Sawada M., Saito S., Shineha R., Tsuruo T., Yamori T., Reduced sialidase expression in highly metastatic variants of mouse colon adenocarcinoma 26 and retardation of their metastatic ability by sialidase overexpression, *Int. J. Cancer* 97, 180-5 (2002).

Kavoosi G, Ardestani SK, Kariminia A, Abolhassani M, Turco SJ: *Leishmania major*: Reactive oxygen species and interferon gamma induction by soluble lipophosphoglycan of stationary phase promastigotes, *Exp Parasitol.*, 4(4):323-8, 2006

Kedzierski R. Yanagisawa M. Endothelin system: the double-edged sword in health and disease. *Annual Rev. Pharmacol. Toxicol.* - 2001. - 41. - p. 851-876.

Keller RL, Avery AC, Burnett RC, Walton JA, Olver CS. Detection of neoplastic lymphocytes in peripheral blood of dogs with lymphoma by polymerase chain reaction for antigen receptor gene rearrangement. *Vet Clin Pathol.* 2004;33:145-149.

Kenny D., Fraser C.G., Petersen P.H., Kallner A. Consensus agreement. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* 59(7):585; 1999

Kiljański J, Ambroziak M, Pachucki J, Jazdzewski K, Wiechno W, Stachlewska E, Górnicka B, Bogdańska M, Nauman J, Bartoszewicz Z. Thyroid sialyltransferase mRNA level and activity are increased in Graves' disease. *Thyroid.* 2005 Jul;15(7):645-52.

Khovidhunkit W, Memon RA, Feingold KR, Grunfeld C. Infection and inflammation-induced proatherogenic

Kickler T.S., Ognuni S., Borowitz M.J. A clinical evaluation of high fluorescent platelet fraction percentage in thrombocytopenia. *American Journal of Clinical Pathology* 125: 282-287; 2006

- Kim Y.J., Varki A., Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer, *Glyconj.J.*, 14, 569-576 (1997).
- Kim YJ, Varki A: Perspectives on the significance of altered glycosylation of glycoproteins in cancer. *Glicocon J*, 1997, 14:569-576.
- Kipar A, Bellmann S, Gunn-Moore DA, Leukert W, Köhler K, Menger S, Reinacher M: Histopathological alterations of lymphatic tissue in cats without FIP after long term exposure to FIP virus. *Vet Microbiol*, 1999, 69:131-137.
- Kjelgaard-Hansen M., Jensen A.L. Subjectivity in defining quality specifications for quality control and test
- Klapan - controllare nome I, Katic V, Culo F: Lipid-bound sialic acid, prostaglandin E and histamine in head and neck cancer. *Eur J Cancer*, 1993, 29a:839-845.
- Kline KL, Joseph RJ, Averdill DR: Feline infectious peritonitis with neurologic involvement: clinical and pathological findings in 24 cats. *J Am An Hosp Assoc*, 1994, 30:111-118.
- Kobayashi T., Sugiyama M., Takahashi K., Yamagami T., Prognosis for canine malignant mammary tumors based on TNM and histologic classification, *J. Vet. Med. Sci.*, 58 (11), 1079-1083, (1996).
- Koch D.D., Peters T. Selection and evaluation of methods. In: Tietz textbook of clinical chemistry 3rd ed. C.A. Burtis and E.R. Ashwood (eds.) W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999, 320-335
- Kocyyigit A, Keles H, Selek S, Guzel S, Celik H, Erel O: Increased DNA damage and oxidative stress in patients with cutaneous leishmaniasis, *Mutat Res.*, 585(1-2):71-8, 2005
- Kohla G., Schauer R., Stockfleth E., Gangliosides with O-acetylated sialic acids in tumors of neuroectodermal origin, *Neurochem. Res.* 27, 583-592 (2002).
- Kojima N., Kono M., Tsuji S., Yoshida Y., Molecular cloning and expression of a sixth type of α 2,8- sialyltransferase (ST8Sia VI) that sialylates O-glycans, *J. Biol. Chem.*, 277, 24030-24038 (2002).
- Kotwal GJ: Microorganisms and their interaction with the immune system, *J Leukoc Biol.*, 62(4):415-29, 1997
- Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG: Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996), *J Am Anim Hosp Assoc.*, 35(5):376-83, 1999
- Kumar R, Pai K, Sundar S: Reactive oxygen intermediates, nitrite and IFN-gamma in Indian visceral leishmaniasis, *Clin Exp Immunol.*, 124(2):262-5, 2001
- Kumar V, Fausto N, Abbas A.: Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, Seventh Edition; WB Saunders, Philadelphia, 2004
- La Du BN, Aviram M, Billecke S, Navab M, Primo-Parmo S, Sorenson RC, et al. On the physiological role(s) of the paraoxonases. *Chem Biol Interact* 1999;119-120: 379-88.
- Lambeth J.D., Krause K-H., Clark R.A. NOX enzyme as novel targets for drug development. *Seminars in Immunopathology* 30: 339-363; 2008
- Lamothe J : La leishmaniose canine: limites diagnostiques de la sérologie à partir de deux cas cliniques, *Prat.*
- Lamothe J: Activity of amphotericin B in lipid emulsion in the initial treatment of canine leishmaniasis, *Journal of Small Animal Practice*, 42:170-5, 2001
- LATIMER K.S. (1995) Leukocytes in health and disease. In: Textbook of veterinary internal medicine. 4th edn. Eds. Ettinger S.J. and Feldman E.C. Philadelphia, W.B. Saunders. pp 1892-1946

Lau J., Lau K., O'Hanlon T., Wang X., Tissue-specific expression of beta-galactoside alpha-2,6- sialyltransferase. Transcript heterogeneity predicts a divergent polypeptide, *J. Biol. Chem.*, 29, 17389-17394, (1989).

Lawrence MB, Sprinter TA: Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 1991, 65:859-873.

Lee Y.J. Shin S.J., Tsai J.H. Increased urinary endothelin-1-like immunoreactivity excretion in NIDDM patients with albuminuria. *Diabetes Care*. - 1994. - 17. - p. 263-266.

Lees G.E., Brown S.A., Elliott J., Grauer G.F., and Vaden S.L. Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM forum consensus statement (small animal). *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19: 377-385; 2005

Lees GE. Brown SA. Elliott J. Grauer GE. Vaden SL.: Assessment and management of proteinuria in dogs and cats, American College of Veterinary Internal Medicine, ACVIM Forum Consensus Statement (small animal), 2004, *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 19(3):377-85, May-Jun 2005

Lehrke I. Rudiger W., Eberhard R., Wagner J. Renal endothelin-1 and endothelin receptor type B expression in glomerular disease with proteinuria. *Journal of the American society of nephrology*. - 2001. - 12. - p. 2321-2329.

Levin E.R. Endothelins as a cardiovascular peptides. *American Journal of Nephrology*. - 1996. - 16. - p. 246-251.

Levin E.R. Endothelins. *N. England J. Medicine*. - 1995. - 333. - p. 356-363.

LeVine D.N., Zhang D., Harris T., Vaden S.L. The use of pooled vs serial urine samples to measure urine protein:creatinine ratios. *Veterinary Clinical Pathology* 39(1): 53-56; 2010

Ley K: The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol*

Lileng R., Nesland J., Tved K., CDW75 antigen expression in breast cancer, *Pathol. Res. Pract* ., 189, 394–398 (1993).

Lillehook I., Tvedten H. Evaluation of the sysmex XT200iV hematology system for use with canine, feline and equine hematology testing, atti 8th scientific meeting of the ESVCP/ECVCP, , pag 118, Cambridge, 2006

Lilliehöök I, Tvedten H.: Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. I. Erythrocytes, platelets, and total leukocyte counts. *Vet Clin Pathol*. 2009a Jun;38(2):163-74

Lilliehöök I, Tvedten H.: Validation of the Sysmex XT-2000iV hematology system for dogs, cats, and horses. II. Differential leukocyte counts. *Vet Clin Pathol*. 2009b Jun;38(2):175-82

Lindberg G, Eklund G, Gullberg B, Rastam L: Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality. *BMJ*, 1991, 302:143-146.

Lindberg G., Eklund G., Gullberg B., Rastam L., Serum sialic acid concentration and cardiovascular mortality, *BMJ*, 302, 143-146 (1991).

Linnert K. Necessary sample size for method comparison studies based on regression analysis. *Clinical Chemistry* 45:882-894; 1999

Livak KJ. Schmittgen TD.: Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method, *Methods (Duluth)*. 25(4):402-8, 2001

Lloyd K. O., Yin B. W. T., Molecular cloning of the CA125 ovarian cancer antigen-identification as a new mucin, MUC16, *J. Biol. Chem.*, 276, 27371-27375 (2001).

Locksley R.M., Pingel S., Lacy D., Wakil A.E., Bix M., Fowell D.J: Susceptibility to infectious diseases: Leishmania as a paradigm, *J. Infect. Dis*. 179(Suppl. 2):305-8, 1999

- Lumsden J., Laboratory test method validation, *Rev. Méd Vét*, 151, 623–630 (2000).
- Lumsden L.H. Laboratory test method validation. *Revue de Médecine Veterinaire* 151(7):623-630; 2000
- Lusher T.F. Barton M. Endothelins and endothelin receptor antagonists: therapeutic considerations for a novel class of cardiovascular drugs. *Circulation*. - 2000. - 102. - p. 2434-2440.
- Lutz H et al. - nomi.: Aggiornamenti sulla FIP. 38° Congresso Nazionale SCIVAC, 1999. volume - pagina
- Lutz H, Hauser B, Horzinek MC: Feline infectious peritonitis (FIP) – The present state of Knowledge. *J Small An Pract*, 1986, 27:108-116.
- MACKEY L.J., JARRETT W.F.H. & LAUDER I.M. (1975) Monocytic leukaemia in the dog. *The Veterinary Record* 11, 27-30
- MACKEY L.J., JARRETT W.F.H. & WISEMAN A. (1972) Monocytic Leukaemia in a Cow. *Research in Veterinary Science* 13, 287-289
- Mackness B, Hine D, Liu Y, Mastorikou M, Mackness M. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; 318: 680–683.
- Mackness B., Hine D., McElduff P., Mackness M. High C-reactive protein and low paraoxonase1 in diabetes as risk factors for coronary heart disease. *Atherosclerosis* 186: 396-401; 2006
- MacVean D., Monlux A., Palmer T., Roszel J., , Classification of epithelial canine mammary tumors in a defined population, *Vet Pathol.*, 14, 194–217, (1977).
- Mahon N.G., Blackstone E.H., Francis G.S. Starling III R.C., Young M.S. and Lauer M.S. The prognostic value of estimated creatinine clearance alongside functional capacity in ambulatory patients with chronic congestive heart failure. *Journal of the American College of Cardiology* 40: 1106-1113, 2002
- Malykh Y.N., Schauer R., Schaw L., N-glycolyneuramic acid in human tumors, *Biochimie*, 83, 623-634 (2001).
- Malmgaard L.: "Induction and regulation of IFNs during viral infections". *Journal of Interferon and Cytokine research* 24: 439-454, 2004
- Mancianti F., Bizzeti M: Terapia della leishmaniosi canina, *Obiett. Doc. Vet.* 5:7-17, 2000
- Mancianti F., Pedonese F., Fiorentini A., Melosi M., Giannini S: Valutazione dell'efficacia dell'associazione amminosidina (Amminofarma®) - antimonio (Glucantim®) rispetto al solo antimonio nella terapia della leishmaniosi canina, *Riv. Zoot. Vet.* 26(2):57-63, 1998
- Manisha H., Shah & Shaila D., Shah & Prabhudas S., Telang & Pankaj M., Patel Tissue and serum α 2-3- and α 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis, *Glycoconj J.*, 25, 279–290 (2008).
- Marsillach J., Aragonès G., Mackness B., Mackness M. Rull A. Beltrán-Debón P., Pedro-Botet J, Alonso-Villaverde C., Joven J., Camps J. Decreased paraoxonase-1 activity is associated with alterations of high-density lipoprotein particles in chronic liver impairment. *Lipids in Health and Disease* 9:46-; 2010
- Martinez Subiela S, Cerón J: 2005, Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *Can Vet J* 46:625–629.
- Martinez-Subiela S. Bernal LJ. Ceron JJ.: Serum concentrations of acute-phase proteins in dogs with leishmaniosis during short-term treatment, [Clinical Trial. Journal Article] *American Journal of Veterinary Research*. 64(8):1021-6, Aug. 2003

Martinez-Subiela S, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ.: Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis, [Journal Article] *Veterinary Record*. 150(8):241-4, Feb 23 2002

Mary C, Ange G, Dunan S, Lamouroux D, Quilici M: Characterization of a circulating antigen involved in immune complexes in visceral leishmaniasis patients, *Am J Trop Med Hyg.*, 49(4):492-501, 1993

Mary, C.; Faraut, F.; Lascombe, L.; Dumon, H.: Quantification of *Leishmania infantum* DNA by a real-time PCR assay with high sensitivity, *Journal of Clinical Microbiology* 42 (11): 5249-5255, 2004

Mathers RA., Evans GO., Bleby J., Tornow T. Evaluation of the Sysmex XT-2000iV haematology analyser for rat, dog and mouse whole blood samples. *Comp Clin Path.* 2008;17:137-144.

Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD: Neuroaminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol*, 2004, 78:12665-12667.

McReynolds, C. and Macy, D., 1997. Feline infectious peritonitis. Part II. Treatment and prevention. *The Compendium on continuing education for the practicing veterinarian* 19(10): 1111–1117.

McEver R., Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow, *Curr. Opin. Cell Biol.*, 14, 581-586, (2002).

McEver RP: Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr Opin Cell Biol*, 2002, 14:581-586.

McManus P.M. Classification of myeloid neoplasms. A comparative review. *Veterinary Clinical Pathology* 34(3): 189-212; 2005 *Med*, 2003, 9:263-268.

Méd. Chir. Anim. Comp. 42, 2002

MESSICK J.B. (2000) Chronic Myeloid Leukaemias. In: Schalm's veterinary haematology. 5th edn. Eds. Feldman B.V., Zinkl J.G. and Jain N.C. Philadelphia, Lippincott Williams & Wilkins. pp. 733-739

Metabolism. - 1998. - 47. - p. 1408-1412.

microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study, *Nephron.*, 57(4):444-52, 1991

Miyauchi T. Masaki T. Pathophysiology of endothelin in the cardiovascular system. *Annu. Rev. Physiol.* - 1999. - 61. - p. 391-415.

MONTEITH C.N. & COLE D. (1995) Monocytic leukaemia in a horse. *The Canadian veterinary journal* 36, 765-766

Montserrat G, Cristina R: las leishmaniosis humanas: leishmaniosis autóctona por *Leishmania infantum*, in http://www.seimc.org/control/revi_Para/leish.htm, Barcelona, 2002

Mookerjee Basu J, Mookerjee A, Sen P, Bhaumik S, Sen P, Banerjee S, Naskar K, Choudhuri SK, Saha B, Raha S, Roy S: Sodium antimony gluconate induces generation of reactive oxygen species and nitric oxide via phosphoinositide 3-kinase and mitogen-activated protein kinase activation in *Leishmania donovani*-infected macrophages, *Antimicrob Agents Chemother.*, (5):1788-97, 2006

Moore F.M., Brum S.L., Brown L. Urine protein determination in dogs and cats: comparison of dipstick and sulfosalicylic acid procedures. *Veterinary Clinical Pathology* 20: 95-97; 1991

Moreno J, Alvar J: Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model, *Trends Parasitol* 18(9):399-405, 2002

Moreno J., Alvar J: Canine leishmaniasis: epidemiological risk and the experimental model, *Trends Parasitol.*, 18(9):399-405, 2002

Morillas-Marquez F, Aransay AM, Testa JM, Lucientes J, Ready PD: Distribution of sandfly species in relation to canine leishmaniasis from the Ebro Valley to Valencia, northeastern Spain, *Parasitol Res.*, 94(6):416-20, 2004

Moulton J., Tumors of the mammary gland, *Tumors in Domestic Animals*, 518–552, (1990).

- Myauchi T, Yanagisawa M., Tomizawa T., Sugishita Y., Suzuki N., Fujino M. Increased plasma concentrations of endothelin-1 and big endothelin-1 in acute myocardial infarction. *Lancet*. - 1989. - 2. - p. 53-54.
- Mylonakis ME, Papaioannou N, Saridomichelakis MN, Koutinas AF, et al.: Cytologic patterns of lymphadenopathy in dogs infected with *Leishmania infantum*, *Vet Clin Pathol* 34(3):243-247, 2005
- Nabity M.B., Boggess M.M., Kashtan C.E., Lees G.E. Day-to-day variation of the urine protein:creatinine ratio in female dogs with stable glomerular proteinuria caused by X-linked hereditary nephropathy. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 21: 425-430; 2007
- Naranjo C, Fondevila D, Leiva M, Roura X, Pena T: Characterization of lacrimal gland lesions and possible pathogenic mechanisms of keratoconjunctivitis sicca in dogs with leishmaniosis, *Vet Parasitol.*, 133(1):37-47, 2005
- Narayanan S., Sialic acid as a tumor marker, *Ann. Clin. Lab. Sci.*, 24, 376–384 (1994).
- Narayanan S: Sialic acid as a tumor marker. *Ann Clin Lab Sci*, 1994, 24:376-84.
- Natale A: La leishmaniosi in Italia, *Obiett. Doc. Vet.* 12:23-8, 2004
- Ng C.J., Wadleigh D.J., Gangopadhyay A., Hama S., Grijalva V.R., Navab M., Fogelman A.M., Reddy S.T. Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density lipoprotein. *The Journal of Biological Chemistry* 276: 44444-44449; 2001
- Nicolas L, Prina E, Lang T, Milon G.: Real-time PCR for detection and quantitation of leishmania in mouse tissues, *J Clin Microbiol.* 40(5):1666-9, 2002
- Noli C: La leishmaniosi del cane, *Waltham Focus* 9(2):16-24, 1999
- Norris M, Kissel C, Roy L: Minimal change glomerulonephritis in a 90-year-old patient: what is the ideal approach?, *Nephron.*, 73(4):670-3, 1996
- Novak F., Vavrova L., Kodykova J., Novak F. Sr., Hynkova M., Zak A., Novakova O. Decreased paraoxonase activity in critically ill patients with sepsis. *Clinical Experimental Medicine* 10: 21-25; 2010
- O'Kennedy R, Berns G, Moran E: A critical analysis of the use of sialic acid determination in the diagnosis of malignancy. *Cancer Lett* 1991, 58:91-100.
- Obeid R., Kuhlmann M., Kirsch C.M. and Herrmann W. Cellular uptake of vitamin B12 in patients with chronic renal failure. *Nephron. Clinical Practice* 99: c42-48, 2005
- Ohta K, Hirata Y., Shichiri M., Kanno K., Emori T., Tomita K., Marumo F. Urinary excretion of endothelin-1 in normal subjects and patients with renal disease. *Kidney International*. - 1991. - 39. - p. 307-311.
- Oliva G, Foglia Manzillo V, Pagano A.: Canine leishmaniasis: evolution of the chemotherapeutic protocols, *Parassitologia* 46:231-234, 2004
- Oliva G, Scalone A, Foglia Manzillo V, Gramiccia M, Pagano A, Di Muccio T, Gradoni L: Incidence and time course of *Leishmania infantum* infections examined by parasitological, serologic, and nested-PCR techniques in a cohort of naive dogs exposed to three consecutive transmission seasons, *J Clin Microbiol.*, 44(4):1318-22,
- Oliva G., Cortese I., Ciaramella P., De Luna R: Trattamento terapeutico della leishmaniosi del cane, 278.
- Bellomo G, Mirabelli F, Salis A, Vairetti M, Richelmi P, Finardi G, Thor H, Orrenius S. Oxidative stress-induced plasma membrane blebbing and cytoskeletal alterations in normal and cancer cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;551:128-30

- Owen L. N., Prognosis and treatment of mammary tumors in the bitch, *J. Small Anim. Pract.*, 7, 703-710 (1966).
- Ozben T., Elevated serum and urine sialic acid levels in renal diseases, *Ann. Clin. Biochem.*, 28, 44-48 (1991).
- Ozben T: Elevated serum and urine sialic acid levels in renal diseases. *Ann Clin Biochem*, 1991, 28:44-48.
- Paltrinieri S, Cammarata Parodi M, Cammarata G, Comazzi S: Some aspects of humoral and cellular immunity in naturally occurring feline infectious peritonitis. *Vet Immunol Immunopathol*, 1998b, 65:205-220.
- Paltrinieri S, Cammarata Parodi M, Cammarata G, Mambretti M: Type IV Hypersensitivity in the pathogenesis of FIPV induced lesions. *J Vet Med B*, 1998a, 45:151-159.
- Paltrinieri S, Gelain ME, Ceciliani F, Ribera AM, Battilani M: Association between fecal shedding of feline coronavirus (FCoV) and serum α 1-acid glycoprotein (AGP) sialylation. *J Fel Med & Surg*, 2008 – in corso di stampa,.
- Paltrinieri S, Giordano A, Ceciliani F, Sironi G: Tissue distribution of a feline AGP related protein (fAGPrP) in cats with feline infectious peritonitis (FIP). *J Fel Med & Surg*, 2004, 6:99-105.
- Paltrinieri S, Giordano A, Tranquillo V, Guazzetti S: Critical assessment of the diagnostic value of feline α 1-acid glycoprotein for feline infectious peritonitis using likelihood ratios approach *J Vet Diagn Invest*, 2007b 19:266-272
- Paltrinieri S, Metzger C, Battilani M, Pocacqua V, Gelain ME, Giordano A: Serum α 1-acid glycoprotein (AGP) concentration in non-symptomatic cats with feline coronavirus (FCoV) infection. *J Fel Med & Surg*, 2007a, 9:271-277
- Paltrinieri S, Ponti W, Comazzi S, Giordano A, Poli G: Shifts in circulating lymphocyte subsets in cats with FIP: pathogenic role and diagnostic relevance. *Vet Immunol Immunopathol*, 2003, 96:141-148.
- Panaro MA, Lisi S, Mitolo V, Acquafredda A, Fasanella A, Carelli MG, Brandonisio O: Evaluation of killing, superoxide anion and nitric oxide production by *Leishmania infantum*-infected dog monocytes, *Cytobios.*, 95(380):151-60, 1998
- Pankraz A., Bauer N., Moritz A. Comparison of flow cytometry with the Sysmex XT2000iV automated analyzer for the detection of reticulated platelets in dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 38(1): 30-38; 2009
- Parekh L.J., Patel D.D., Patel J.B., Patel P.S., Raval G.N., Shah M.H., Evaluation of serum sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in oral cavity cancer, *Oral disease*, 9, 119-128 (2003).
- Passaniti A, Hart GW. Cell surface sialylation and tumor metastasis. Metastatic potential of B16 melanoma variants correlates with their relative numbers of specific penultimate oligosaccharide structures. *J Biol Chem*. 1988 Jun 5;263(16):7591-603.
- Pasquini A.; Simonetti P.; Luchetti E.; Gardana C., Cardini G: Il Ginkgo biloba nella dieta del cane anziano, *Praxis Veterinaria (Milano)* 26 (2): 18-24, 2005
- Patel P., Raval G., Rawal R., Importance of glycoproteins in human cancer, *Indian J. Biochem. Biophys*, 34, 226–233 (1997).
- Patel PS, Adhvaryu SG, Balar DB, Parikh BJ, Shah PM: Clinical application of serum levels of sialic acid, fucose and seromucoid fraction as tumour markers in human leukemias. *Anticancer Res*, 1994; 14:747-752.
- Pawloski T, Mackiewicz SH, Mackiewicz A: Microheterogeneity of α 1-acid glycoprotein in the detection of intercurrent infection in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 1989, 32(3):347-351.
- Pedersen NC, Boyle JF, Floyd K, Fudge A, Barker J: An enteric coronavirus infection of cats and its relationship to feline infectious peritonitis. *Am J Vet Res*, 1981 42:368-377.
- Pedersen NC: An overview of feline enteric coronavirus and infectious peritonitis virus infections. *Fel Pract*, 1995, 23:7-20.

- Pedersen NC: Feline infectious peritonitis: something old, something new. *Fel Pract*, 1976, 6:42-51.
- Pedersen NC: Virologic and immunologic aspect of feline infectious peritonitis virus infection. *Adv Exp Med Biol*, 1987, 218:529-550.
- Peña MT, Roura X, Davidson MG: Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998), *Vet Ophthalmol.*, 3(1):35-41, 2000
- Peppas-Patrikiou M, Dracopoulou M., Dacou-Voutetakis C. Urinary endothelin in adolescents and young adults with insulin-dependent diabetes mellitus: Relation to urinary albumin, blood pressure and other factors.
- Perego R., Proverbio D., Spada E., Ferro E.: Leishmaniosi canina: indagine sierologica mediante immunofluorescenza indiretta (IFAT) in 313 cani ricoverati presso il canile sanitario del comune di Milano, 59° convegno nazionale sisvet, Milano, pag 273-274
- Peyrin-Biroulet L., Rodriguez-Guèant R.M., Chamailard M., Desreumaux P., Xia B., Bronowicki J.P., Bigard M.A., Guèant J.L. Vascular and cellular stress in inflammatory bowel disease : revisiting the role of homocysteine. *American Journal of Gastroenterology* 102: 1108-1115; 2007
- Pham NK, Mouriz J, Kima PE: *Leishmania pifanoi* amastigotes avoid macrophage production of superoxide by inducing heme degradation, *Infect Immun.*, 73(12):8322-33, 2005
- Pinelli E, Killick-Kendrick R, Wagenaar J, Bernadina W, et al.: Cellular and humoral immune responses in dogs experimentally and naturally infected with *Leishmania infantum*, *Infect Immun* 62:229-235, 1994
- Pinto da Cunha N, Giordano A, Caniatti M, Paltrinieri S. Analytical validation of the Sysmex XT-2000iV for cell counts in canine and feline effusions and concordance with cytologic diagnosis. *Vet Clin Pathol.* 2009 Jun;38(2):230-41
- Pizzirani S: Terapia delle leishmaniosi canine, in *Prontuario Terapeutico veterinario SCIVAC 2001*
- Pocacqua V, Provasi E, Comunian C, Paltrinieri S, Gelain E, Cecilian F: Glycan moiety modifications of feline α 1-acid glycoprotein in retrovirus (FIV, FeLV) affected cats. *Vet Immunol Immunopathol*, 2005, 107:17-26.
- Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, et al.: Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-microscopic, immunohistochemical and electron-microscopic study, *Nephron* 57:444-452, 1991
- Poli A, Abramo F, Mancianti F, Nigro M, Pieri S, Bionda A: Renal involvement in canine leishmaniasis. A light-
- Poli G., Bonizzi L. : Sistemi difensivi "innati", non specifici, in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp. 567-583, 1998
- Poli G., Rocchi M. : Come l'organismo si difende: una sintesi, in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp.547-553, 1998
- Poli G., Rocchi M. : Sistemi difensivi acquisiti e specifici: struttura e funzione del sistema immunitario, in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp. 585-604, 1998
- Poli G.: Gli anticorpi: struttura e caratteristiche biologiche, in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp. 607-619, 1998
- Poli G.: Immunità cellulo-mediata, in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp. 685-708, 1998
- Poli G.: Immunità umorale: produzione e attività degli anticorpi, in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp.621-634, 1998
- Poli G.: Immunoprofilassi in *Microbiologia ed immunologia veterinaria*, ed. Utet, pp. 763-788, 1998
- Poot J, Rogers ME, Bates PA, Vermeulen A.: Detailed analysis of an experimental challenge model for *Leishmania infantum* (JPC strain) in dogs, *Vet Parasitol.*, 130(1-2):41-53, 2005

Pos O., Van der. Stelt M., Woltink G., Changes in the serum concentration and glycosylation of human alpha- 1 acid glycoprotein and alpha-1 protease inhibitor in severely burned persons relations to interleukin-6 levels, *Clin. Exp. Immunol.*, 82, 579–582 (1990).

Pozio E, Gradoni L, Gramiccia M: La leishmaniosis canine en Italia de 1910 a 1983, *Ann Parasitol Hum Comp*, 60:543-553, 1985

Prélaud P: *Allergologia canina*, Prima ed. Italiana, Edagricole, 2003

Prina E, Lang T, Glaichenhaus N, Antoine JC.: Presentation of the protective parasite antigen LACK by Leishmania-infected macrophages, *J Immunol.* 156(11):4318-27, 1996

Pryor WA. Cancer and free radicals. *Basic Life Sci.* 1986;39:45-59.

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, et al.: Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs, *Parasitol* 122(Pt 3):253-261, 2001

Quinnell RJ, Courtenay O, Davidson S, Garcez L, et al.: Detection of *Leishmania infantum* by PCR, serology and cellular immune response in a cohort study of Brazilian dogs, *Parasitol* 122(Pt 3):253-261, 2001

Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, et al.: Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis, *J Infect Dis* 183(9):1421-1424, 2001

Rabehi L, Ferriere F, Saffar L, Gattegno L: alpha 1-Acid glycoprotein binds human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) envelope glycoprotein via N-linked glycans. *Glycocon J*, 1995, 12:7-16.

Reddy ST, Wadleigh DJ, Grijalva V, Ng C, Hama S, Gangopadhyay A, et al. Human paraoxonase-3 is an HDL-associated enzyme with biological activity similar to paraoxonase-1 protein but is not regulated by oxidized lipids. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:542–7.

Regan A.D., Ousterout D.G., Whittaker G.R. Feline lectin activity is critical for the cellular entry of feline infectious peritonitis virus. *Journal of virology* 84(15): 7917-1721; 2010

Remaley AT, Kuhns DB, Basford RE, Glew RH, Kaplan SS.: Leishmanial phosphatase blocks neutrophil O-2 production, *J Biol Chem.* 259(18):11173-5, 1984

resistance arteries in severe human essential hypertension. *J. Hypertension.* - 1997. - 15. - p. 57-63.

Rhalem A, Sahibi H, Guessous-Idrissi N, Lasri S, Natami A, Riyad M, Berrag B.: Immune response against *Leishmania* antigens in dogs naturally and experimentally infected with *Leishmania infantum*, *Vet Parasitol.* 81(3):173-84, 1999

Rhodes J.M., Usefulness of novel tumour markers, *Ann. Oncol.*, 10 (Suppl. 4), 118-121 (1999).

Ribeiro JM: Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists?, *Infect Agents Dis.*, 4(3):143-52, 1995

Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ: Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate, *Vet Parasitol* 84(1-2):33-47, 1999

Rogers GN, Paulson JC: Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology*, 1983, 127:361-373.

Romagnani S: The Th1/Th2 paradigm, *Immunol Today* 18(6):263-6, 1997

Romppanen J, Punnonen K, Anttila P: Serum sialic acid as a marker of alcohol consumption: effect of liver disease and heavy drinking. *Alcoholism: Clin Exp Res* 2002, 26:1234-1238.

- Romppanen J., Punnonen K., Anttila P., Serum sialic acid as a marker of alcohol consumption: effect of liver disease and heavy drinking, *Alcoholism: Clin. Exp. Res*, 26, 1234-1238 (2002).
- Rose M.C., Voynow J.A., Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease, *Physiol. Rev.* 86, 245-278 (2006).
- Rosenblat M, Vaya J, Shih D, Aviram M. Paraoxonase 1 (PON1) enhances HDL-mediated macrophage cholesterol efflux via the ABCA1 transporter in association with increased HDL binding to the cells: a possible role for lysophosphatidylcholine. *Atherosclerosis* 2005; 179: 69–77.
- Rossen JW, Bekker CP, Voorhout WF, Strous GJ, Van der EA Rottier PJ: Entry and release of transmissible gastroenteritis coronavirus are restricted to apical surfaces of polarized epithelial cells. *J Virol* 1994, 68:7966-7973.
- Rossi L, Baldelli R, Capelli G, Ferroglio E, et al.: Leishmap: the network for monitoring the spread of canine leishmaniasis and its vectors in northern Italy, *Proc. Third World Congress on Leishmaniasis*, p. 201, Palermo-Terrasini 2005
- Rossi S, Rossi G, Giordano A, Paltrinieri S. Homocysteine measurement by an enzymatic method and potential role of homocysteine as a biomarker in dogs. *J Vet Diagn Invest.* 2008 Sep;20(5):644-9.
- Rottier PJM: The molecular dynamics of feline coronaviruses. *Vet Micr*, 1999, 69:117-125.
- Roura X, Fondevila D, Sanchez A, Ferrer L: Detection of Leishmania infection in paraffin-embedded skin biopsies of dogs using polymerase chain reaction, *J Vet Diagn Invest* 11(4):385-387, 1999
- Roura X, Sanchez A, Ferrer L: Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique, *Vet Rec.*, 144(10):262-4, 1999
- Roura X: Scelte diagnostico-terapeutiche difficili in corso di leishmaniosi canina, *Atti Incontro SIDEV 25 febbraio 2001*
- Roura X: Uso della PCR nella diagnosi della leishmaniosi canina, *Atti Incontro SIDEV 25 febbraio 2001*
- Ruax C.G., Steiner J.M., Williams D.A. Metabolism of amino acids in cats with severe cobalamin deficiency. *American Journal of Veterinary Research* 62: 1852-1858; 2001
- Rüfenacht S., Sager H., Müller N., Schaerer V., Heier A., Welle M.M., Roosje P.J: Two cases of feline leishmaniosis in Switzerland, *Vet. Rec.* 156(17):542-5, 2005
- Rutishauer U., et al, Polysialic acid in the plasticity of the developing and adult vertebrate nervous system, *Nat. Rev. Neurosci.*, 9, 26-35 (2008).
- Saha S, Mondal S, Banerjee A, Ghose J, Bhowmick S, Ali N.: Immune responses in kala-azar, *Indian J Med Res.* 123(3):245-66, 2006
- Salk, P.L., Yogeewaran G., Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine tumor cell lines, *Science*, 212, 1514–1516 (1981).
- Santos-Gomes GM, Rosa R, Leandro C, Cortes S, et al.: Cytokine expression during the outcome of canine experimental infection by *Leishmania infantum*, *Vet Immunol Immunopathol* 88:21-30, 2002
- Sasaki K, Ma ZY, Khatlani TS, Okuda M, Inokuma H, Onishi T: Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *J Vet Med Sci*, 2003, 65:545-548.
- Sasaki, K., Ma, Z.Y., Khatlani, T.S., Okuda, M., Inokuma, H., Onishi, T.: Evaluation of feline serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker. *Journal of Veterinary Medical Science* 65, 545-548, 2003

Sata T., Roth J., Zuber C., Expression of alpha 2-6 linked sialic acid residues in neoplastic but not in normal colonic mucosa, *Am Histochem Cytochem*, 37, 1577–1588 (1991).

Schachter H, Vliegenthart JF (Elsevier Science B.V., 1995),pp. 201–59.

Schauer R., Achievements and challenges of sialic acid research, *Glycoconj. J.*, 17, 485–499 (2000).

Schellenberg S. Grenacher B., Kaufmann K., Reusch C.E., Glaus T.M. Analytical validation of commercial immunoassays for the measurement of cardiovascular peptides in the dog. *The Veterinary Journal*. - 2008. - 178.(1) - p- 85-90.

Schiffrin E.L. Deng L.Y., Sventek P., Day R. Enhanced expression of endothelin-1 gene in endothelium of

Schiffrin E.L. Role of endothelin-1 in Hypertension. *Hypertension, Journal of the American Heart Association*. - 1999. - 34. - p. 876-881.

Schnaar R. L., Glycolipid-mediated cell-cell recognition in inflammation and nerve regeneration, *Arch. Biochem. Biophys.*, 426, 163-172 (2004).

Schrader M., Fahimi H.D. Peroxisomes and oxidative stress. *Biochimica et biophysica Acta* 1763(12): 1755-1766; 2006

Schultze B, Krempel C, Ballesteros M L, Shaw L, Schauer R, Enjuanes L, Herrler G: Transmissible gastroenteritis coronavirus, but not the related porcine respiratory coronavirus, has a sialic acid (N-glycolylneuraminic acid) binding activity. *J Virol* 1996, 70:5634-5637.

Schultze B, Wahn K, Klenk HD, Herrler G: Isolated HE-protein from hemagglutinating encephalomyelitis virus and bovine coronavirus has receptor-destroying and receptor-binding activity. *Virology*, 1991b, 180:221-228.

Schulz A, Mellenthin K, Schönian G, Fleischer B, Drosten C.: Detection, differentiation, and quantitation of pathogenic leishmania organisms by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR assay, *J*

Schutter EM, Visser JJ, van Kemp GJ: The utility of lipid-associated sialic acid (LASA or LSA) as a serum marker for malignancy. A review of the literature. *Tum Biol*, 1992, 13:121-132.

Schwegmann-Weßels C, Herrler G: Sialic Acids as receptor determinants for coronaviruses. *Glycocon J*, 2006, 23:51-58.

Schwegmann-Weßels C, Zimmer G, Laude H Enjuanes L, Herrler G: Binding of transmissible gastroenteritis coronavirus of cell surface sialoglycoproteins. *J Virol*, 2002, 76:6037-6043.

Scott M., Stockham S., *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, Ames, IA: Iowa State University Press; 251–276 (2002).

Sen G.C.: "Viruses and interferons". *Annual Review of Microbiology* 55 ; 255-281, 2001

Shah MH, Telang SD, Shah PM, Patel PS. Tissue and serum alpha 2-3- and alpha 2-6-linkage specific sialylation changes in oral carcinogenesis. *Glycoconj J*. 2008 Apr;25(3):279-90. Epub 2007 Dec 25.

Shlipak M.G. and Massie B.M. The clinical challenge of cardiorenal syndrome. *Circulation* 110: 1514-1517, 2004

Shlipak M.G., Smith G.L., Rathore S.S., Massie B.M. and Krumholz H.M. Renal function, digoxin therapy and heart failure outcomes: evidence from the digoxin intervention group trial. *Journal of American Society of Nephrology* 15: 2195-2203, 2004

Sialyltransferase specificity in selectin ligand formation, *Blood*, 100, 3618-3625 (2002).

Sideris V, Papadopoulou G, Dotsika E, Karagouni E: Asymptomatic canine leishmaniasis in Greater Athens area, Greece, *Eur J Epidemiol.*, 15(3):271-6, 1999

Sillanauke P, Pönniö M, Jääskeläinen IP: Occurrence of sialic acids in healthy humans and different disorders. *Eur J Clin Invest*, 1999, 29:413-425.

- Sillanaukee P, Ponnio M, Seppa K: Sialic acid: new potential marker of alcohol abuse. *Alcoholism: Clin Exp Res*, 1999a, 23:1039-1043.
- Sillanaukee P., Ponnio M., Seppa K., Sialic acid: new potential marker of alcohol abuse, *Alcoholism: Clin Exp Res*, 23, 1039-1043 (1999a).
- Simonson M.S. Wann S., Mene P., Dubyak G.R., Kester M., Nakazato Y., Sedor J.R., Dunn M.J. Endothelin stimulates phospholipase C, Na/H exchange c-Fos expression, and mitogenesis in rat mesangial cells. *Journal Clin Invest.* - 1989. - 83. - p. 708-712.
- Simpson KJ, Henderson NC, Bone-Larson CL, Lukacs NW, Hogaboam CM, Kunkel SL. Chemokines in the pathogenesis of liver disease: so many players with poorly defined roles. *Clin Sci (Lond)* 2003; 104: 47-63.
- Singh VK, Balaraman S, Tewary P, Madhubala R.: *Leishmania donovani* activates nuclear transcription factor-kappaB in macrophages through reactive oxygen intermediates, *Biochem Biophys Res Commun.*, 322(3):1086-95, 2004
- Slappendel RJ: Canine leishmaniasis. A review based on 95 cases in The Netherlands, *Vet Q.*, 10(1):1-16, 1988
- Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, et al.: The Ibizian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection, *Vet Parasitol* 90(1-2):37-45, 2000
- Solano-Gallego L, Riera C, Roura X, Iniesta L, et al.: *Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment, *Vet Parasitol.* 96(4):265-276, 2001
- Sousa-Franco J, Araujo-Mendes E, Silva-Jardim I, L-Santos J, Faria DR, Dutra WO, Horta MF: Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis, *Microbes Infect.*, 8(2):390-400, 2006
- Sparkes AH – altri autori: An appraisal of value of laboratory testes in the diagnosis of FIP *J Am An Hosp Assoc*, 1994, 30:345----.
- Sparkes AH, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA: Feline infectious peritonitis: a review of clinical pathological changes in 65 cases, and a critical assesment of their diagnostic value. *Vet Rec*, 1991, 129:209-212.
- Spath M, Schollmeyer P: T-cell lymphoma under immunosuppressive treatment in minimal change glomerulopathy with nephrotic syndrome, *Dtsch Med Wochenschr.*, 25;120(34-35):1161-4, 1995
- Stam F., van G.C., ter Wee P.M. et al. Homocysteine clearance and methylation flux rates in health and end-stage renal disease: association with S-adenosylhomocysteine. *American Journal of Physiology. Renal physiology* 287: F215-223, 2004
- Stark G.G., Kerr I.M., Williams B.R.G., Silverman R.H., Schreiber R.D.: "How cells respond to interferons". *Annual Review of Biochemistry* 67; 227-264, 1998
- Stockham SL, Scott MM.: *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, Iowa State University Press, 2004
- Stossel TP.: The E. Donnall Thomas Lecture, 1993. The machinery of blood cell movements., *Blood.* 84(2):367-79, 1994
- Suzuki E, Hirata Y., Kohmoto O., Sugimoto T., Hayakawa H., Matsuoka H., Sugimoto T., Kojima M., Kangawa K., Minamino N., Matsuo H. Cellular mechanisms for synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cultured rat atrial cells. *Circ Res.* - 1992. - 71. - p. 1039-1048.
- Svennerholm L., The gangliosides, *J. Lipid. Res.*, 5,145-155 (1964).
- Svobodová M, Votýpka J, Nicolas L, Volf P.: *Leishmania tropica* in the black rat (*Rattus rattus*): persistence and transmission from asymptomatic host to sand fly vector *Phlebotomus sergenti*, *Microbes Infect.* 5(5):361-4, 2003

- Takashima S., Tsuji S., Unique enzymatic properties of mouse sialyltransferases, ST6Gal II and ST8Sia VI, *Trends Glycosci, Glycotech.*, 16, 345-356 (2004).
- Tangvoranuntakul P, Gagneux P, Diaz S, Bardor M, Varki N, Varki A, Muchmore E. Human uptake and incorporation of an immunogenic nonhuman dietary sialic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Oct 14;100(21):12045-50
- Tecles F, Spiranelli E, Bonfanti U, Cerón JJ, Paltrinieri S: Preliminary studies of serum acute phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of Veterinary Internal Medicine* 19:865-870, 2005
- TerWee J, Lauritzen AY, Sabara M, Dreier KJ, Kokjohn, K: Comparison of the primary signs induced by experimental exposure to either a pneumotrophic or a 'limping' strain of feline calicivirus. *Vet Micr*, 1997, 56:33-45.
- Teske E, Rutteman GR, Kuipers-Dijkshoorn NJ, van Dierendonck JH, van Heerde P, Cornelisse CJ. DNA ploidy and cell kinetic characteristics in canine non-Hodgkin's lymphoma. *Exp Hematol.* 1993;21:579-584.
- Tessier-Vetzel D. Tissier T., Chetboul V., Carlos C., Nicolle A., Benbaron D., Dandrieux J., Thoulon F., Carayon A., Pouchelon J.L. Diagnostic and prognostic value of endothelin-1 plasma concentrations in dogs with heart and respiratory disorders. *Veterinary Record.* - 2006. - 158. - p. 783-788.
- Thougaard AV, Hellmén E, Jensen AL: Total serum sialic acid is a general disease marker rather than a specific tumour marker in dogs. *J Vet Med A*, 1998, 45(8): 471-479.
- Thougaard AV, Jensen AL, Wenck A: Evaluation of an automated spectrophotometric assay for the determination of total sialic acid in canine serum. *Vet Res Comm*, 1994, 18: 337-45.
- Tizard I.R. : Antibodies: soluble forms of BCR, in *Veterinary Immunology-an introduction*, ed. W.B. Saunders Company, pp. 139-148, 2000
- Tizard I.R. : Helper T cells and their response to antigen, in *Veterinary Immunology-an introduction*, ed. W.B. Saunders Company, pp. 98-109, 2000
- Tohyama K, Shiga S, Fujimoto H, Hamaguchi Y, Ichiyama S. Automated analysis of differentiation-induced leukaemic cells during all-trans retinoic acid therapy of acute promyelocytic leukemia. *Arch Pathol Lab Med.* 2003;127:e4-10.
- Tohyama K, Shiga S, Itose Y, et al. Improved detection of minimal acute myeloid leukemia cells by the use of the combined parameters of XE-2100 hematology analyzer. *Cytometry B Clin Cytom.* 2005;66:18-24.
- Torrent E, Leiva M, Segales J, Franch J, Pena T, Cabrera B, Pastor J: Myocarditis and generalised vasculitis associated with leishmaniosis in a dog, *J Small Anim Pract.*, 46(11):549-52, 2005
- Tresnan DB, Levis R, Holmes KV: Feline aminopeptidase N serves as a receptor for feline, canine, porcine, and human coronaviruses in serogroup I. *J Virol*, 1996, 70:8669-8674.
- Tullis GE, Burger LR, Pintel DJ: The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol*, 1993, 67:131-141.
- Tuma D., Sorrell M., Effect of ethanol on hepatic secretory proteins, *Rec. Dev. Alcohol*, 2, 159-180 (1984).
- Tuma DJ, Sorrell MF: Effect of ethanol on hepatic secretory proteins. *Rec Dev Alcohol* 1984, 2:159-180.
- Turk R., Juretić D., Turk N., Rekić B., Simeon-Rudolf V. Robić M., Svetina A. Serum paraoxonase activity in dairy cows during pregnancy. *Res Vet Sci* 79(1): 15-18; 2005

Tvedten H., Lilliehöök I., Hillström A., Häggström J. Plateletcrit is superior to platelet count for assessing platelet status in Cavalier King Charles Spaniels. *Veterinary Clinical Pathology* 37(3): 266-271; 2008

Ueland P.M., Nygard O., Vollset S.E. and Refsum H. The Hordaland Homocysteine Studies. *Lipids* 36 Suppl. S33-9, 2001

Ugorski M., Laskowska A., Sialyl Lewis: a tumor associated carbohydrate antigen involved in adhesion and metastatic potential of cancer cells, *Acta Biochimica Polonia*, 49, 303-311, (2002).

UrquhartGM, Armour J, Duncan JL, Dunn AM, Jennings FW : Tripanosomosi trasmesse meccanicamente, in *Parassitologia Veterinaria*, ed. Utet, 1996

Urquiaga I, Leighton F: Plant polyphenol antioxidants and oxidative stress, *Biol Res.*, 33(2):55-64, 2000

Ushio-Fukai M (2007) VEGF signaling through NADPH oxidase-derived ROS. *Antioxid Redox Signal* 9:731–739

Vaden SL, Pressler BM, Lappin MR, Jensen WA. The effects of urinary tract inflammation and sample blood

Vaidyanathan R.: Leishmania parasites (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) reversibly inhibit visceral muscle contractions in hemimetabolous and holometabolous insects, *J Invertebr Pathol.*, 87(2-3):123-8. 2004

Valli V.E., Jacobs R.M., Parodi A.L., Vernau W., Moore P.F. (2002) *Histological Classification of Hematopoietic Tumors of Domestic Animals*. Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C. pp. 56

Van der Meer W, Dinnisen J, De Keijzer MH. Evaluation of the Sysmex XT-2000i, a new automated haematology analyser. *Sysmex J Int.* 2002;12:71-75.

Van der Meer W, Dinnisen J., De Keijzer MH, Scott CS. Comparative evaluation of Abbott Cell-dyn CD3700, Bayer ADVIA 120 and Sysmex XE-2100 automated leukocyte differentials and flagging. *Lab Haematol.* 2002;8:102-117.

Van der Meer W, Scott CS, de Keijzer MH. Automated flagging influences the inconsistency and bias of band

Van Guldener C., Stehouwer C.: Homocysteine metabolism in renal disease. *Clin Chem Lab Med* (2003) 41(11): 1421-1417

Van Guldener C., Stehouwer C.: Homocysteine metabolism in renal disease. *Clin Chem Lab Med* (2003) 41(11): 1421-1417

Van Lenten BJ, Hama SY, De Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott SM, La Du BN, Fogelman AM, Navab M. Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response. *J Clin Invest* 1995; 96: 2758–2767.

Van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T: Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages, *J Immunol.* 1;173(11):6521-5, 2004

Varki A., Trousseau's syndrome: multiple definitions and multiple mechanism, *Blood*, 110, 1723-1729 (2007).

Varki A., Varki N., Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease, *Lab. Invest.*, 87, 851-857 (2007).

Varki N.M., Varki A., Heparin inhibition of selectin-mediated interactions during the hematogenous phase of carcinoma metastasis: rationale for clinical studies in humans, *Semin. Thromb. Hemost.*, 28, 53-66 (2002).

Varki NM, Varki A: Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest*, 2007, 87:851-857.

Vasan R.S., Beiser A., D'Agostino R.B. et al. Plasma homocysteine and risk for congestive heart failure in adults without prior myocardial infarction. *Journal of the American Medical Association* 289: 1251-1257; 2003

Vasson MP, Roch-Arveiller M, Couderc R, Baguet JC, Raichvarg D: Effects of alpha-1 acid glycoprotein on human polymorphonuclear neutrophils: influence of glycan microheterogeneity, *Clinica Chimica Acta*. 224(1):65-71, 1994

Vennema H: A comparison of the genomes of FECVs and FIPVs and what they tell us about the relationships between Feline Coronavirus and their evolution. *Fel Pract*, 1995, 23:40.

Ventura P., Panini R., Verlato C., Scarpetta G. and Salvioli G. Hyperhomocysteinemia and related factors in 600 hospitalized elderly subjects. *Metabolism* 50: 1466-1471, 2001

Vitale F, Reale S, Vitale M, Petrotta E, Torina A, Caracappa S.: TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples, *Ann N Y Acad Sci* 1026:139-43, 2004

Vlasak R, Luytjes W, Leider J, Spaan W, Palese P: The E3 protein of bovine coronavirus is a receptor-destroying enzyme with acetyltransferase activity. *J Virol*, 1988a, 62:4686-4690.

Vlasak R, Luytjes W, Spaan W, Palese P: Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C viruses. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 1988b, 85:4526-4529.

Wang X., Ye X. S., Zhang L. H., Recent development in the design of Sialyltransferase Inhibitors, *Medicinal Research Reviews*, 23, 32-47 (2003).

Ward JM: Morphogenesis of a virus in cats with experimental feline infectious peritonitis. *Virology*, 1970, 41:191-194.

Warhenbrock M.G., Varki A., Multiple hepatic receptors cooperate to eliminate secretory mucins aberrantly entering the bloodstream: are circulating cancer mucins the 'tip of iceberg'? , *Cancer Res.*, 66, 2433-2441 (2006).

Westgard J., Method validation, In: *Basic method validation*, 2nd ed., 156–157 (2003).

Westgard J.O. *Basic method validation*. 2nd edition. Westgrad QC, Medison, 2003

Westgard J.O. *Basic method validation*. Westgard quality corporation, Ogunquit ME, USA, 1999

Westgard JO: Precision and accuracy: concepts and assessment by method evaluation testing. *Crit Rev Clin Lab Sci.*, 1981, 13:283-330.

Wilkerson, M.J., Dolce, K., Koopman, T., Shuman, W., Chun, R., Garrett, L., Barber, L., Avery, A., 2005. Lineage differentiation of canine lymphoma/leukaemia and aberrant expression of CD molecules. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 106, 179–196

Williams RK, Jiang GS, Holmes KV: Receptor for mouse hepatitis virus is a member of the carcinoembryonic antigen family of glycoproteins. *Proc Natl Acad Sci Usa*, 1991, 88:5533-5536.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature*. - 1988. - 332. - p. 411-415.

Yeager CL, Ashmun RA, Williams RK, Cardellichio CB, Shapiro LH, Look AT, Holmes KV: Human aminopeptidase N is a receptor for human coronavirus 229E. *Nature*, 1992, 357:420-422.

Yogeeswaran Metastatic potential is positively correlated with cell surface sialylation of cultured murine cell lines, *Science*, 212, 1514–1516 (1981).

Yoricane R, Koike H. The arrhythmogenic action of endothelin in rats. *Jpn. J. Pharmacol.* - 1990. - 53. - p. 259-263.

Yurdakul P: Immunopathogenesis of *Leishmania* infections, *Mikrobiyol Bul.*, 39(3):363-81, 2005

Zambrano-Villa S, Rosales-Borjas D, Carrero JC, Ortiz-Ortiz L.: How protozoan parasites evade the immune response, Trends Parasitol. 18(6):272-8, 2002

Zatelli A., Paltrinieri S., Nizi F., Roura X., and Zini E. Evaluation of a urine dipstick test for confirmation or exclusion of proteinuria in dogs. American Journal of Veterinary Research 71(2): 235-240; 2010

Zweig M.H., Robertson E.A. Why we need better test evaluations. Clinical Chemistry 28:1272-1276; 1982

α 2,6 sialyltransferase, Nucleic acid Res., 18, 667 (1990).

APPENDICE

Oltre alle pubblicazioni e comunicazioni a congressi citate in precedenza e rivolte ad affrontare argomenti inerenti all'oggetto della tesi, durante il triennio di dottorato ho avuto modo di descrivere due casi clinico-patologici di particolare interesse, nello specifico un caso di leucemia monocitica cronica in un cane (N. 2 dell'elenco delle pubblicazioni) caratterizzato dall'estrema rarità in questa specie e un caso di tumore mammario caratterizzato da ipoglicemia paraneoplastica in seguito alla produzione di Insulin-like Growth Factor type 2 (N. 6 dell'elenco pubblicazioni). Inoltre, in collaborazioni con veterinari esterni alla facoltà, ho avuto modo di partecipare ad uno studio per la definizione dei parametri ematologico e biochimici nel riccio europeo dopo ricovero invernale presso i CRAS (Centro di Recupero Animali Selvatici), da cui è scaturita una pubblicazione (N. 23 dell'elenco pubblicazioni). Gli abstract di queste tre pubblicazioni sono riportati in calce a questa appendice.

Durante il triennio di dottorato ho avuto modo di acquisire esperienza nell'ambito della patologia clinica partecipando alla processazione e all'analisi dei campioni pervenuti per il servizio diagnostico sia presso la sezione di Patologia Generale e Parassitologia che presso il laboratorio centralizzato dell'ospedale veterinario dell'azienda "Polo Veterinario di Lodi".

Inoltre il mio lavoro di ricerca sia presso il laboratorio di Patologia Generale che quello del laboratorio centralizzato di Lodi, entrambi laboratori approvati dal *Committee for Laboratory Standards* come *Training Laboratory for the European College of Veterinari Clinical Pathology*, mi ha consentito di seguire il training program in previsione della partecipazione all'esame dell'European College of Veterinari Clinical Pathology.

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI CON IMPACT FACTOR

1. Rossi S., **Rossi G.**, Giordano A. and Paltrinieri S. Homocysteine measurement by an enzymatic method and potential role of homocysteine as a biomarker in dogs. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* 20:644-649; 2008
2. **Rossi G.**, Gelain M.E., Foroni S. and Comazzi S. Extreme monocytosis in a dog: a chronic monocytic leukaemia case. *Veterinary Record* 165(2):54-56; 2009
3. **Rossi G.** and Paltrinieri S. Total Sialic Acid (TSA): an acute phase reactant in cats with a possible role in feline coronavirus infection. *Canadian Journal of Veterinary Research* 73(2):144-150; 2009

4. Paltrinieri S., Ravvicini S., **Rossi G**, Roura X. Serum concentrations of the derivatives of reactive oxygen metabolites (d-ROMs) in dogs with leishmaniosis. *Veterinary Journal*; 2009, in press, doi:10.1016/j.tvjl.2009.08.019
5. Gelain M.E., **Rossi G.**, Giori L., Comazzi S., Paltrinieri S. Identification of neoplastic cells in blood using the Sysmex XT-2000iV: a preliminary step in the diagnosis of canine leukemia. *Veterinary Clinical Pathology* 39(2):169-179; 2010
6. **Rossi G.**, Errico G., Perez P., Rossi G., Paltrinieri S. Paraneoplastic hypoglycemia in a diabetic dog. *Veterinary Clinical Pathology*, 2010, in press, doi:10.1111/j.1939-165X.2010.00260.x

COMUNICAZIONI A CONGRESSI NAZIONALI

7. **Rossi G.**, Cornaro C., Battilani M., Paltrinieri S. Risposte cellulari di leucociti felini incubati con peptidi immunogeni di coronavirus felino (FCoV). Atti del VI congresso nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria; Napoli 15-16 Maggio, 2009 Pag. 55-58
8. **Rossi G.**, Meregalli A. Rondena M., Moretti P., Pecile A., Paltrinieri S. Risultati preliminari sull'attività sialiltransferasica ed acido sialico in siero e tessuti di cani sani e con neoplasie mammarie. Atti del VI congresso nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria; Napoli 15-16 Maggio, 2009 Pag. 125-129
9. **Rossi G.**, Martino Volta N., Mangiagalli G., Paltrinieri S. Valori ematologici e biochimici in ricci (*erinaceus europaeus*) dopo riabilitazione presso centri di recupero. Atti del VII congresso nazionale dell'Associazione Italiana di Patologia Veterinaria; Castelsardo (SS), 17-18 Giugno 2010 Pag. 9

COMUNICAZIONI A CONGRESSI INTERNAZIONALI

10. Gelain M.E., **Rossi G.**, Paltrinieri S. Use of Sysmex XT-2000iV hematology analyser to identify haematopoietic neoplasms in dogs. XVII ECVIM-CA & IX meeting annuale ESVCP (Budapest HU, 13-15 settembre 2007). *Veterinary Clinical Pathology* 36(4):385-386; 2007

11. **Rossi G.**, Errico G., Perez P. and Paltrinieri S. Hypoglycaemia in a diabetic dog. XIII-ISACP & X-ESVCP Annual Meeting Proceedings, Barcelona 30/9 - 03/10; 2008 Pag. 135
12. Paltrinieri S., Gelain M.E., **Rossi G.**, Comazzi S. Analysis of canine haematopoietic neoplasms by using Sysmex the XT-2000iV. Proceedings of Sysmex European Haematology Symposium May 14-15, Istanbul, Turkey; 2009 Pag. 46-48
13. Palermo V., Carolla S., Locatelli C., **Rossi G.**, Breda S., Paltrinieri S., Sala E., Scarpa P., Brambilla P.G. Homocysteine: a novel biomarker for heart failure in dog? Poster at 19th Annual ECVIM Congress, Porto, September 8-10; 2009
14. **Rossi G.**, Breda S., Giordano A., Zatelli A., Paltrinieri S. Homocysteine in canine serum increases in severe renal failure but not in inflammatory bowel disease. XI Annual ESVCP-ECVCP Congress Proceedings (Thessaloniki, Greece, October 7-9, 2009) *Veterinary Clinical Pathology* 38(s1):E22; 2009
15. Giordano A., **Rossi G.**, Virtuoso A., Zatelli A., Paltrinieri S. Preliminary results about big endothelin 1 in serum from dogs with renal disease. XI Annual ESVCP-ECVCP Congress Proceedings (Thessaloniki, Greece, October 7-9, 2009) *Veterinary Clinical Pathology* 38(s1):E30; 2009
16. **Rossi G.**, Pezzia F., Giori L., Kjelgaard-Hansen M., Paltrinieri S. Preliminary study about paraoxonase activity in canine serum: correlation between CRP and paraoxonase acute phase proteins. Proceedings of VIII Congress of European Colloquium on Acute Phase Proteins, Helsinki, Finland, 25-27 August 2010 – Pag. 11-12
17. Giordano A., Giori L., **Rossi G.**, Pezzia F., Probo M., Veronesi M.C. Preliminary data about paraoxonase (PON1) in newborn calves: age related variation and comparison between healthy and sick animals. Proceedings of VIII Congress of European Colloquium on Acute Phase Proteins, Helsinki, Finland, 25-27 August 2010 – Pag. 12-14

18. Gelain M.E., Tutino G., **Rossi G.**, Giori L., Bertazzolo W. High fluorescent plateletes fraction in macrothrombocytopenic Norfolk terrier. Proceedings of XII ESVCP & XX ECVIM-CA Annual Congress, Toulouse, France, 8-11 September 2010 – Pag. 286
19. **Rossi G.**, Giori L., Campagnola S., Zatelli A., Zini E., Paltrinieri S. Analytical variability of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. Proceedings of XII ESVCP & XX ECVIM-CA Annual Congress, Toulouse, France, 8-11 September 2010 – Pag. 236-237

PUBBLICAZIONI SU RIVISTE INTERNAZIONALI UNDER REVISION

20. **Rossi G.**, Corsaro C., Battilani M., Paltrinieri S. Dosage of IFN- γ in feline whole blood after incubation with potential T cell epitopes of the nucleocapsid N protein of feline coronavirus. *Veterinary Microbiology. Stato attuale (novembre 2010): "accepted with major changes"*
21. Paltrinieri S., **Rossi G.**, Meregalli A., Moretti P., Rondena M. Sialic acid and sialyltransferase activity in serum and tissues of dogs with mammary tumors. *Veterinary Pathology Stato attuale (novembre 2010): "accepted with major changes"*
22. **Rossi G.**, Giori L., Campagnola S., Zatelli A., Zini E., Paltrinieri S. Analytical variability of urine protein-to-creatinine ratio determination in dogs. *American Journal of Veterinari Research Stato attuale (novembre 2010): "submitted"*
23. **Rossi G.**, Mangiagalli G., Paracchini G., Paltrinieri S. Hematological and biochemical values of hedgehogs (*Erinaceus europaeus*) after overwintering in rehabilitation centers. *Journal of Wildlife Diseases Stato attuale (novembre 2010): "submitted"*

ABSTRACT

EXTREME MONOCYTOSIS IN A DOG: A CHRONIC MONOCYTIC LEUKAEMIA CASE

Rossi G., Gelain M.E., Foroni S. and Comazzi S. *Veterinary Record* 165(2):54-56; 2009

A 11-year-old neutered male, mongrel dog was presented to the private veterinary with apathy, shudder and pale mucous membranes. Complete blood cells count revealed a severe normocytic normochromic anemia, extreme leukocytosis with monocytosis and thrombocytopenia. A diagnosis of Chronic Monocytic Leukemia (CMoL) was made based on flow cytometric immunophenotyping. CMoL is a rare disorder in domestic animals and, to our knowledge, none has before reported a definitive diagnosis of CMoL in a dog.

HEMATOLOGICAL AND BIOCHEMICAL VALUES OF HEDGEHOGS (*Erinaceus europaeus*) AFTER OVERWINTERING IN REHABILITATION CENTERS

Rossi G. Mangiagalli G., Paracchini G., Paltrinieri S. *Journal of Wildlife Diseases*

Every year several European hedgehogs need medical care, and they are hospitalized at rehabilitation centers, overwintered when necessary, and finally released into the wild.

In literature there is only one study about hematological reference intervals, and none about biochemical one. The aim of this study was to establish hematological and biochemical reference intervals for rehabilitated hedgehogs to assess the clinical status before the release, and to assess whether reference intervals suffer from sex-related differences or from differences due to the management of the rehabilitation centre.

Blood was collected from fifty hedgehogs that were recovered at three different rehabilitation centers, but only thirty-eight animals fulfilled the inclusion criteria (absence of clinical signs or of underweighting, Bunnell index higher than 0.80, and absence of hibernation during overwintering) and were thus included in the study.

Hematological reference intervals were determined using an automated laser cell counter. Morphological analysis of blood smears revealed a prevalence of lymphocytes, a constant presence of nucleated RBCs, Howell-Jolly bodies and basophils, and the presence of neutrophils and eosinophils with bilobated nuclei. Biochemical reference intervals were determined using an automated spectrophotometer and revealed higher creatinine and urea concentration and increased ALP and GGT activity compared with other domestic species. There were no significant differences between sex, but conversely the following significant differences related to the management were found: a significantly lower eosinophil count in one center, probably related to the anti-parasitic treatment, despite the absence of evident parasitic infections in other groups; a significantly

higher presence of activated and large granular lymphocytes, likely depending on a different environmental exposure to microorganisms; a lower concentration of total protein and glucose, and a higher concentration of cholesterol in one center, likely due to a different dietary management. In conclusion the reference intervals established in this study can be applied to monitor the healthy status of hedgehogs kept in rehabilitation centers and not gone into hibernation. Nevertheless, it would be important to establish reference intervals specific for each rehabilitation center, since the management can influence some of the results.

PARANEOPLASTIC HYPOGLYCEMIA IN A DIABETIC DOG

Rossi G., Errico G., Perez P., Rossi G., Paltrinieri S. *Veterinari Clinical Pathology*

A 6-year-old, female, Labrador dog had diabetes mellitus, which was difficult to control with insulin treatment. It also had a ductal solid mammary carcinoma with very rapid growth and was related temporally to onset of hypoglycemia. Eight months after the first diagnosis of diabetes the dog had a hypoglycemic crisis. Insulin administration was stopped and glycemia returned to normal. Nevertheless three months after the suspension of insulin treatment another hypoglycemic crisis developed and glucose concentration remained at life threatening levels (serum glucose was 29.6, 38.2, 25.4, 36.4 mg/dl) during the following months. At the same time the tumor increased in size until a diameter of about 16 cm. At the time of surgery hypoglycemia was 39,6 mg/dL. Serum glucose concentration, monitored every 3 hours, increased constantly after removal of the mammary tumor to 180 mg/dl at 12 hours later. Two days after surgery blood glucose concentration was 587.1 mg/dL. Paraneoplastic hypoglycemia was therefore attributed to the mammary tumor. Immunohistochemistry demonstrated an expression of IGF-2 by some of the tumor's cells, which apparently caused the hypoglycaemia during the tumor growth even in a diabetic dog. Hyperglycemia of the diabetic condition was very prominent after the surgical removal of the tumor and had been masked by the paraneoplastic effect of the tumor earlier.