



UNIVERSITA' DI PISA

Dipartimento di Scienze Veterinarie
Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

Tesi di Laurea

Indagine sui marker ematobiochimici della flogosi acuta nel cane

CANDIDATA
Giulia Lopardo

RELATORE
George Lubas

CORRELATRICE
Anna Pasquini

ANNO ACCADEMICO 2014/2015

INDICE

Riassunto	4
Abstract.....	5
INTRODUZIONE GENERALE	6
PARTE GENERALE	7
1 L'INFIAMMAZIONE.....	8
1.1 Alterazione dell'omeostasi e danno cellulare.....	8
1.2 Il processo infiammatorio.....	9
1.3 Elementi del sistema immunitario.....	10
1.3.1 Immunità innata o aspecifica.....	10
1.3.2 Immunità acquisita o specifica.....	11
1.4 Elementi dell'immunità innata.....	12
1.4.1 Cellule sentinella: le cellule dendritiche.....	12
1.4.2 Granulociti neutrofili.....	12
1.4.3 Monociti e macrofagi.....	15
1.5 Mediatori dell'infiammazione.....	16
1.5.1 Le citochine.....	17
1.6 Eventi dell'infiammazione acuta locale.....	20
1.6.1 Fisiopatologia della flogosi acuta.....	20
1.6.2 Manifestazioni cliniche della flogosi acuta.....	22
1.7 Risposta di fase acuta sistemica.....	23
1.7.1 Febbre.....	23
1.7.2 Proteine di fase acuta.....	25
1.7.2.1 Proteina C Reattiva.....	28
1.7.2.2 Fibrinogeno.....	30
1.7.2.3 Albumina.....	32
1.7.3 Leucociti Neutrofili.....	34
1.7.4 Sideremia.....	35
2 MARKER EMATOBIOCHIMICI DELLA FLOGOSI ACUTA	40
2.1 Cos'è un Biomarker.....	40
2.2 Biomarker Infiammatori.....	41
2.3 Conta leucocitaria e formula leucocitaria.....	42
2.3.1 Neutrofilia.....	42
2.3.2 Deviazione a sinistra.....	43
2.3.3 Neutrofili Tossici.....	44
2.3.4 Monociti attivati.....	44
2.3.5 Linfociti reattivi.....	45
2.3.6 Vari leucogrammi rilevabili in corso di infiammazione.....	45
2.3.7 Leucogrammi non infiammatori.....	46
2.3.8 WBC e valutazione dei neutrofili come marker di infiammazione.....	47
2.4 Proteine di fase acuta.....	48
2.4.1 APPs principali.....	48
2.4.2 CRP - Proteina C Reattiva.....	49
2.4.2.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici.....	49
2.4.2.2 Fattori che possono influenzare la misurazione di CRP.....	49
2.4.2.3 Variazioni della CRP in corso di patologie infiammatorie.....	50

2.4.2.4 Condizioni che possono influenzare le concentrazioni plasmatiche di CRP.....	55
2.4.3 APPs moderate	56
2.4.4 Fibrinogeno.....	57
2.4.4.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici	57
2.4.4.2 Variazioni della concentrazione plasmatica di fibrinogeno	58
2.4.5 APPs negative.....	59
2.4.6 Albumina	59
2.4.6.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici	60
2.4.6.2 Fattori che possono influenzare la misurazione dell'albumina.....	60
2.4.6.3 Variazioni dell'albumina in corso di patologie infiammatorie	60
2.4.6.4 Condizioni che possono influenzare la concentrazione plasmatica di albumina	61
2.4.6.5 Valutazione dell'albumina rispetto alle globuline	63
2.5 Ferro	63
2.5.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici	63
2.5.2 Fattori che possono influenzare la misurazione del ferro sierico	64
2.5.3 Variazioni della sideremia in corso di patologie infiammatorie.....	64
2.5.4 Condizioni che possono influenzare la concentrazione plasmatica di ferro..	66
PARTE SPERIMENTALE.....	68
3 INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE.....	69
4 MATERIALI E METODI	70
4.1 Materiali	70
4.1.1 Strumenti e metodiche per la misurazione dei diversi parametri nel laboratorio di PCV.....	70
4.1.2 Intervalli di riferimento	72
4.1.3 Campioni	72
4.2 Metodi.....	72
4.2.1 Criteri per la selezione dei campioni	72
4.2.2 Elaborazione dei dati e metodi statistici.....	73
5 RISULTATI	78
5.1 Distribuzione della popolazione in base al sesso	78
5.2 Distribuzione della popolazione in base alle razze.....	79
5.3 Distribuzione della popolazione in base all'età.....	80
5.4 Dati della statistica riepilogativa	81
5.5 Correlazione tra i marker infiammatori.....	82
5.6 Rapporto tra CRP e gli altri marker infiammatori.....	82
5.7 Fasce di incremento della CRP.....	83
5.8 Distribuzioni dei marker infiammatori.....	83
5.8.1 Tra gruppo infiammatorio e gruppo non infiammatorio	83
5.8.2 Tra fasce di incremento della CRP	86
5.9 Presenza o assenza di alterazioni nei diversi marker a confronto con la CRP	89
5.9.1 Presenza di alterazioni infiammatorie*	89
5.9.2 Totale assenza di alterazioni.....	91
5.10 Accuratezza, sensibilità e specificità dei diversi marker infiammatori rispetto alla CRP.....	91
5.11 Presenza di alterazioni leucocitarie e correlazione con i valori di CRP.....	94
6 DISCUSSIONE	96
6.1 Distribuzione della popolazione in base a sesso, razza ed età.....	96
6.2 Dati della statistica riepilogativa	97

6.2.1 Valori massimi e minimi	97
6.2.2 Mediana e percentili	98
6.2.3 Coefficienti di asimmetria e curtosi.....	99
6.2.4 Distribuzione dei dati	100
6.3 Correlazione tra i marker infiammatori	100
6.4 Rapporto tra CRP e gli altri marker infiammatori.....	103
6.5 Fasce di incremento della CRP.....	103
6.6 Distribuzioni dei marker infiammatori	103
6.7 Presenza o assenza di alterazioni nei diversi marker a confronto con la CRP ...	106
6.7.1 Presenza di alterazioni infiammatorie*	106
6.7.2 Totale assenza di alterazioni.....	107
6.8 Accuratezza, sensibilità e specificità dei diversi marker infiammatori rispetto alla CRP.....	108
6.9 Presenza di alterazioni leucocitarie e correlazione con i valori di CRP.....	109
7 CONCLUSIONI.....	111
Bibliografia.....	112
Ringraziamenti	117

Riassunto

Parole chiave: cane, infiammazione, marker ematici, proteina C reattiva

Introduzione: L'infiammazione rappresenta la reazione dell'organismo a vari tipi di stimoli patogeni. La risposta sistemica all'infiammazione acuta prende il nome di risposta di fase acuta (Acute Phase Response, APR) e determina la comparsa di modificazioni ematobiochimiche in alcuni parametri biochimici e leucocitari, che sono considerati buoni indicatori di flogosi, o marker infiammatori.

Scopo: Indagare il comportamento di alcuni marker infiammatori del cane, considerando la Proteina C Reattiva (C-reactive protein, CRP) come marker elettivo di APR e confrontandola con i valori di Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), conta leucocitaria totale (WBC), conta dei Neutrofili Segmentati (NeuSeg) e conta dei Neutrofili Banda (Band) e con la stima citologica dei Neutrofili Tossici (Neu TOX), Monociti Attivati (Mon ATT) e Linfociti Reattivi (Linf REA).

Materiali e Metodi: Indagine retrospettiva sul database informatico dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" del Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa. Sulla base dei valori di CRP sono state selezionate due popolazioni: "gruppo infiammatorio" con $CRP \geq 0,30$ mg/dL (1080 campioni – 980 pazienti) e "gruppo non infiammatorio" con $CRP \leq 0,29$ mg/dL (757 campioni – 668 pazienti). I dati raccolti sono stati studiati statisticamente.

Risultati: Presenza di una ridotta correlazione (da $|0,08|$ e $|0,26|$) ma molto significativa tra la CRP e gli altri marker; nessun rapporto di dipendenza statistica tra CRP e gli altri marker (R^2 corretto: 0,05 per $CRP \geq 0,30$ mg/dL; 0,02 per $CRP \leq 0,29$ mg/dL); i valori di AUC delle curve ROC per ogni marker segnalano che i NeuSeg sono un "test moderatamente accurato", mentre gli altri sono risultati essere dei "test poco accurati" per la diagnosi di malattia infiammatoria rispetto alla CRP; il Fib risulta il marker più sensibile (SS) e meno specifico (SP) (SS:52,7 SP:77,5 per valori di 400 mg/dL) mentre i Band sono risultati i meno sensibili ma i più specifici (SS:17,6 SP:98 per valori di 0,31 K/ μ L). Neu TOX e Mon ATT presentano una correlazione positiva bassa (0,23 e 0,22) ma molto significativa.

Conclusioni: Il potere diagnostico dei singoli marker infiammatori messi a confronto con la CRP è ridotto. Per aumentare l'accuratezza dell'indagine ematobiochimica volta a diagnosticare una malattia infiammatoria è necessario combinare più parametri contemporaneamente, soprattutto se non si dispone della misurazione di CRP.

Abstract

Key words: dog, inflammation, blood markers, C reactive protein

Background: Inflammation represents the reaction of the organism to various pathogenic stimuli. The systemic response to the acute inflammation is called Acute Phase Response (APR) and causes the onset of hemato-biochemical modifications of some biochemical and leukocyte parameters, which are considered good indicators of phlogosis, or inflammatory markers.

Objectives: To investigate the behavior of several canine inflammatory markers, considering C-reactive protein (CRP) as elective marker of APR and comparing it with values of Fibrinogen (Fib), Albumin (Alb), Iron (Fe), total Leukocyte count (WBC), Segmented Neutrophils count (NeuSeg), and Band Neutrophils count (Band) and with cytological estimation of Toxic Neutrophils (Neu TOX), Activated Monocytes (Mon ATT) and Reactive Lymphocytes (Linf REA).

Materials and Methods: Retrospective investigation on the database of Veterinary Teaching Hospital “Mario Modenato” of the Department of Veterinary Science, University of Pisa. Based on CRP values two populations: “inflammatory group” with $CRP \geq 0.30$ mg/dL (1080 samples – 980 patients) and “noninflammatory group” with $CRP \leq 0.29$ mg/dL (757 samples – 668 patients) have been selected. Collected data have been studied statistically.

Results: Presence of a low (from |0.08| to |0.26|) but very significant correlation between CRP and other markers; no statistical relationship between CRP and other markers (R^2 adjusted: 0.05 for $CRP \geq 0.30$ mg/dL; 0.02 for $CRP \leq 0.29$ mg/dL); AUC values of ROC curves for each marker indicate that NeuSeg are a “moderately accurate test”, while the others were found to be “low accurate tests” compared to CRP for the diagnosis of inflammatory disease; Fib results to be the more sensitive (SS) and the less specific (SP) marker (SS:52.7 SP:77.5 for of 400 mg/dL) while Bands results the less sensitive but the more specific marker (SS:17.6 SP:98 for values of 0.31 K/ μ L). Neu TOX and Mon ATT show a positive correlation that is low (0.23 and 0.22) but very significant.

Conclusion: The diagnostic power of each single inflammatory marker compared with CRP is reduced. To increase the accuracy of the emato-biochemical investigation aimed to diagnose an inflammatory disease, combining more parameters simultaneously, particularly in the absence of CRP measurement, is necessary.

INTRODUZIONE GENERALE

L'inflammatione acuta è la complessa risposta che l'organismo mette in atto se sottoposto a insulti di vario genere, poiché i suoi meccanismi sono finalizzati a confinare e combattere l'agente patogeno; quando l'agente patogeno non è immediatamente e facilmente identificabile, l'accertamento dello stato infiammatorio rappresenta anche la "spia" di questa situazione.

Per il clinico riconoscere uno stato infiammatorio è dunque molto importante e per poterlo fare deve valutare i sintomi, i segni clinici e le modificazioni ematobiochimiche che derivano dalla risposta infiammatoria acuta.

Questa tesi si occupa dei marker ematici della flogosi acuta nel cane. L'attenzione è quindi rivolta alle modificazioni ematobiochimiche nei parametri maggiormente presi in considerazione per la valutazione dello stato infiammatorio di un paziente e alla loro interpretazione.

Con la parte compilativa, prima sono stati esposti i meccanismi della flogosi e delle conseguenti alterazioni ematiche dei parametri biochimici e leucocitari, dopo è stato illustrato lo stato dell'arte dei principali parametri utilizzati per la diagnosi di malattia infiammatoria: Proteina C Reattiva (CRP), Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Leucociti (WBC), Neutrofili segmentati (NeuSeg) e Neutrofili banda (Band).

Con la parte sperimentale è stata condotta un'indagine retrospettiva sui dati presenti nel sistema informatico dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" del Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, per osservare e studiare il comportamento di CRP, Fib, Alb, WBC, NeuSeg e Band, in soggetti con e senza infiammazione acuta.

Inoltre, sono state considerate alcune alterazioni cellulari rilevabili durante la lettura microscopica dello striscio ematico: Neutrofili tossici (Neu TOX), Monociti attivati (Mon ATT) e Linfociti reattivi (Linf REA).

Per stabilire la presenza o assenza di infiammazione è stata utilizzata la CRP come parametro discriminante per includere i dati nel gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) o nel gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$).

PARTE GENERALE

1 L'INFIAMMAZIONE

1.1 Alterazione dell'omeostasi e danno cellulare

L'omeostasi è una delle caratteristiche peculiari degli organismi viventi, tutti gli apparati del corpo di un organismo vi partecipano, tutti i tessuti e tutte le cellule che li compongono hanno meccanismi più o meno complessi e interconnessi finalizzati al mantenimento della stabilità del sistema.

Perché le cellule possano assolvere alle loro funzioni, deve essere mantenuto un equilibrio tra la domanda fisiologica ed i limiti imposti dalla struttura cellulare e dalle sue possibilità metaboliche.

(Robbins et al. 2005)

La biologia riconosce nel “sistema omeostatico” 4 elementi fondamentali costituiti da:

- recettore (percepisce le condizioni esterne ed interne)
- centro di controllo (decide come comportarsi quando il recettore rileva delle alterazioni)
- effetore (esegue ciò che è stato deciso dal centro di controllo)
- stimolo (ogni evento che agisce sul sistema determinando il cambiamento percepito dal recettore)

Le cellule sono programmate strutturalmente e metabolicamente per rispondere a una vasta gamma di stimoli, che rientrano nell'ambito del fisiologico. Ma quando questi diventano eccessivi come intensità e/o durata, oppure quando compaiono stimoli patologici che alterano le capacità di risposta, si innescano svariate alterazioni con cambiamenti metabolici e morfologici, come conseguenza del tentativo da parte delle cellule di mettere in atto risposte adattative efficaci a mantenere la vitalità del tessuto/organo di cui sono parte.

Il primo grado di alterazione è quello dell' “*adattamento*”, che implica modificazioni dell'accrescimento cellulare: ipertrofia (aumento del volume cellulare con aumento del numero di organelli), iperplasia (incremento del numero di cellule di volume normale), atrofia (riduzione di numero e volume delle cellule), metaplasia (cambiamento del tipo di differenziazione cellulare).

Quando il limite della capacità adattativa viene superato o quando l'adattamento non è proprio possibile, lo stimolo determina direttamente un danno subletale e si verificano alterazioni metaboliche di vario tipo responsabili di “*degenerazione cellulare*” con accumulo patologico (ovvero accumulo di sostanze che normalmente non sono presenti o che lo sono solo in misura minore) e alterazioni morfologiche.

La degenerazione cellulare, può essere reversibile o irreversibile a seconda dell'intensità e della durata dello stimolo e quindi del grado di compromissione del metabolismo cellulare che esso determina.

In caso di degenerazione reversibile si assiste ad un cambiamento cellulare patologico che può regredire e tornare alla normalità se lo stimolo che l'ha indotta viene rimosso. Mentre nella degenerazione irreversibile il danno cellulare è permanente e conduce a morte cellulare.

La morte è quindi l'esito finale di un processo degenerativo in progressione. Tuttavia si può verificare anche come conseguenza immediata di uno stimolo responsabile di danno letale diretto.

Si distinguono due tipi fondamentali di morte cellulare: oncosi e apoptosi.

Nell'oncosi la morte segue una condizione di precedente rigonfiamento cellulare ed è ciò che avviene dopo una degenerazione cellulare irreversibile.

Nell'apoptosi invece la morte avviene in seguito a contrazione cellulare e si verifica (sia in circostanze patologiche che fisiologiche) per attivazione dei geni letali responsabili di una morte programmata, con la produzione di corpi apoptotici che esprimono sulla loro membrana ligandi per i recettori delle cellule fagocitarie.

La necrosi indica più genericamente la morte di cellule e tessuti in un organismo vivente.

Le cause di danno letale diretto sono molteplici e possono essere di natura

- 1) fisica: come nel caso di eventi che provocano un insulto meccanico sui tessuti tale da superare la loro capacità di resistenza (contusioni, abrasioni, lacerazioni o eventi traumatici di vario tipo), di esposizione degli stessi a temperature estreme (ustioni, congelamenti), o all'elettricità.
- 2) chimica (sostanze fortemente acide o basiche, tossine ecc..)
- 3) infettiva (batteri, virus, protozoi)
- 4) immunitaria

Quando il danno cellulare è esteso l'organismo mette in atto una serie di meccanismi finalizzati a confinare la lesione ed eliminare l'agente patogeno, tali eventi rappresentano nel loro insieme la risposta infiammatoria.

1.2 Il processo infiammatorio

La *Flogosi* (dal gr. *phlōgōsis* 'combustione'), o *Infiemmazione*, è quindi quel processo complesso e articolato che l'organismo mette in atto in risposta ad un insulto tissutale.

L'insulto tissutale può essere di natura degenerativa, traumatica, chimica, infettiva, immunologica o neoplastica; la risposta flogistica che ne deriva è un processo aspecifico che nasce con la finalità di restaurare l'omeostasi dell'organismo, rimuovendo la causa del disturbo attraverso risposte fisiopatologiche che cercano di confinare la lesione, rimuovere la causa del disturbo e preparare i tessuti alla guarigione.

La flogosi è un processo dinamico, articolato in più fasi, che coinvolge i tessuti vitali. Inizia come fenomeno localizzato a livello del focolaio infiammatorio (laddove si è verificato il danno tissutale) associata quindi ad alterazioni e manifestazioni locali che si sviluppano entro pochi minuti dall'insulto, ma nella sua rapida evoluzione coinvolge ed influenza l'intero organismo, provocando alterazioni ematiche di vario tipo (in base all'entità ed all'estensione del danno) e talvolta la comparsa di sintomi sistemici e aspecifici.

Le sue fasi sono ben definite e una volta che il processo infiammatorio viene innescato evolve indipendentemente dalla causa, tant'è che i suoi meccanismi possono divenire potenzialmente dannosi e l'infiammazione stessa può assumere un ruolo patogenetico in alcune malattie.

Lo stimolo flogogeno evoca infatti la reazione infiammatoria, ma questa può talora esacerbare i danni inizialmente provocati dall'agente/evento patogeno progredendo in modo indipendente da esso.

La patologia generale distingue due forme di flogosi: angioflogosi e istoflogosi.

- L'angioflogosi corrisponde all'infiammazione acuta, che si sviluppa in breve tempo dal momento in cui si verifica il danno tissutale ed essendo aspecifica si manifesta sempre in modo simile, qualsiasi sia il tipo di agente patogeno che l'ha evocata.
Comporta cambiamenti vascolari (direttamente o indirettamente indotti) ed essudazione liquida e cellulare, localizzati al focolaio infiammatorio e si accompagna alla comparsa della reazione sistemica di fase acuta.
- L'istoflogosi corrisponde invece all'infiammazione cronica, dove c'è una maggiore partecipazione degli elementi mesenchimali del tessuto colpito. Comprende diverse forme che possono essere aspecifiche o specifiche, quelle specifiche presentano espressioni anatomo-istopatologiche tipiche per l'agente eziologico che le ha indotte.

Il passaggio dall'angioflogosi all'istoflogosi è legata alla persistenza dell'agente patogeno nei tessuti, all'incapacità di inattivare i prodotti enzimatici del patogeno anche se questo non è più presente, oppure alla comparsa di meccanismi immunomediati. Anche nel corso di un'infiammazione cronica si verificano delle risposte sistemiche con alterazione di alcuni parametri ematologici e possibile comparsa di sintomi sistemici.

Le cellule e le molecole coinvolte in questo processo appartengono al Sistema Immunitario, sistema di difesa dell'organismo che nei vertebrati ha due espressioni: l'immunità innata o aspecifica e l'immunità acquisita o specifica.

Nell'infiammazione acuta i meccanismi messi in atto in modo coordinato da questi due sistemi di difesa si possono suddividere e descrivere in quattro fasi (le quattro "R"):

- Riconoscimento dei patogeni da parte delle cellule "sentinella"
- Reclutamento dei leucotici nel sito d'infezione
- Rimozione dell'agente flogogeno
- Risoluzione del processo infiammatorio

(Abbas et al. 2000)

1.3 Elementi del sistema immunitario

1.3.1 Immunità innata o aspecifica

Comprende tutti quei meccanismi di difesa dell'organismo presenti fin dalla nascita che rimangono immutati nel corso della vita dell'individuo e che entrano in funzione come prima linea difensiva, indipendentemente dalla natura dell'insulto.

E' costituita da:

- Barriere meccaniche o anatomiche dell'organismo: superfici cutanee e mucose, strutturate in epitelii continui che ostacolano l'ingresso di organismi patogeni nell'organismo.

- Barriere fisico-chimiche o fisiologiche: temperatura corporea; pH delle secrezioni (ad esempio l'acidità dei succhi gastrici); mucine e peptidi ad azione antibatterica (come le defensine prodotte dalle cellule epiteliali della cute e le criptochinine prodotte dalle cellule epiteliali delle cripte della mucosa gastro-intestinale); clearance muco-ciliare delle vie respiratorie; il regolare transito intestinale ecc...
- Cellule del sistema immunitario ad attività aspecifica con capacità fagocitarie (granulociti neutrofili e macrofagi) o capacità citotossiche (cellule natural killer e cellule dendritiche)
- Citochine (glicoproteine prodotte dalle cellule del sistema immunitario) e proteine circolanti (come il sistema del complemento, le proteine di fase acuta e la cascata della coagulazione)

1.3.2 Immunità acquisita o specifica

Interviene in un secondo tempo rispetto all'immunità innata (che coordina e amplifica la risposta dell'immunità specifica) e si modifica nel corso della vita di un individuo in relazione agli antigeni a cui esso viene esposto, acquisendo la capacità di reagire in modo diverso e specifico ai diversi agenti patogeni. Il suo complesso meccanismo è infatti dotato di memoria e la sua potenza d'azione e velocità di intervento si accrescono con ripetute esposizioni allo stesso agente patogeno.

Le sue caratteristiche sono quindi: specificità e memoria immunologica, adattabilità e discriminazione tra self e non-self, ovvero la capacità di identificare e rispondere a molecole estranee (non-self) evitando invece di innescare risposte verso i componenti dell'organismo (self).

L'immunità specifica è costituita principalmente dai linfociti e dai loro prodotti e si esprime con due distinti meccanismi: Immunità Umorale e Immunità Cellulo-Mediata.

L'immunità umorale è sostenuta dai linfociti B che si trovano nel sangue e che producono anticorpi in seguito al riconoscimento di antigeni liberi.

Gli anticorpi sono glicoproteine solubili della classe delle globuline, dette "immunoglobuline" o anche "gammaglobuline" per le loro caratteristiche di migrazione in campo elettroforetico. Essi reagiscono con molecole antigeniche estranee all'ospite (non-self) e vi si legano in modo da neutralizzarle e favorire la loro eliminazione. Costituiscono pertanto la principale difesa specifica nei confronti dei microrganismi patogeni extracellulari e delle tossine da loro prodotte.

Mentre l'immunità cellulo-mediata è sostenuta dai linfociti T, che riconoscono gli antigeni legati al complesso maggiore di istocompatibilità (MCH) espresso sulla superficie delle cellule presentanti l'antigene (APC), che possono essere cellule dendritiche, macrofagi, linfociti B o cellule infette.

La loro attività di difesa prevede quindi l'interazione con le cellule dell'immunità innata e dell'immunità umorale, con produzione di citochine (linfocine) che modulano la risposta difensiva dell'organismo e con l'intervento di linfociti T citotossici che provvedono a distruggere le cellule infette inducendone l'apoptosi.

1.4 Elementi dell'immunità innata

1.4.1 Cellule sentinella: le cellule dendritiche

Le cellule dendritiche sono le cosiddette “cellule sentinella” distribuite ubiquitariamente ma con maggior concentrazione alle porte di ingresso dell'organismo per gli eventuali patogeni, quindi nei tessuti che fungono da barriera fisica (cute e mucose) e nei linfonodi. Le cellule dendritiche provvedono a catturare gli “intrusi” internalizzandoli mediante fagocitosi e processando gli antigeni, per poi esporne sulla superficie cellulare un frammento associato ad una molecola del complesso maggiore di istocompatibilità (MHC) di classe II. Si comportano quindi come cellule presentanti l'antigene, (APC) per facilitarne il riconoscimento da parte delle altre cellule del sistema immunitario.

Sono una popolazione molto eterogenea di cellule che si può suddividere in due categorie sulla base delle cellule da cui originano:

- Cellule dendritiche mieloidi (MDCs) che derivano dai monociti, sono le più rappresentate e si trovano in quasi tutti i tessuti ad eccezione di encefalo, occhi e testicoli.
- Cellule dendritiche plasmocitoidi (PDCs) di derivazione linfoide e sono localizzate negli organi linfoidei e nel torrente sanguigno.

(Tizard 2009)

1.4.2 Granulociti neutrofili

Rappresentano il 60-77% della popolazione leucocitaria circolante (Aguggini et al. 2006) e sono i primi a raggiungere il focolaio infiammatorio, ad iniziare la rimozione delle cellule morte, dei frammenti di fibrina e dei residui necrotici che si formano in seguito ad eventi traumatici, bruciature ed altri tipi di lesioni, e sono i principali protagonisti delle flogosi batteriche.

Hanno un diametro di 10-20 micron, presentano un nucleo polilobato (da 2 a 7 lobi, il numero dei segmenti aumenta con l'età della cellula) e granulazioni citoplasmatiche con reazione neutra alle colorazioni istologiche, motivo per cui sono definiti granulociti neutrofili (e ben si distinguono dai granulociti eosinofili, affini ai coloranti acidi come l'eosina, e dai basofili i cui granuli dimostrano invece affinità per i coloranti basici).

La loro produzione avviene nel midollo osseo a partire dalle cellule staminali totipotenti che generano sia la linea linfoide che quella mielode, dalla cellula staminale mielode in grado di generare la serie eritrocitaria, megacariocitaria e mielocitica si differenzia la cellula staminale unipotenziale da cui si possono sviluppare la linea monocitaria e quella granulocitaria.

Dalla cellula unipotenziale della linea granulocitaria si sviluppano il mieloblasto ed il promielocita, dopo di che avviene la differenziazione del neutrofilo (o dell'eosinofilo o del basofilo) che matura attraverso i vari stadi di metamielocita, granulocita neutrofilo non segmentato (a banda) e granulocita neutrofilo segmentato (maturo).

Tale processo è controllato principalmente da due fattori di crescita: il Granulocyte colony stimulating factor (G-CSF) e il Granulocyte Macrophage colony stimulating factor (GM-CSF). (Dale 2009)

Una volta maturati, i neutrofili vengono rilasciati in circolo dove permangono 5-10 ore prima di migrare nei tessuti, dove sopravvivono da 1 a 4 giorni per poi andare incontro

ad apoptosi. L'intera popolazione viene totalmente rimpiazzata da 1 a 2,5 volte al giorno (Villiers & Blackwood 2006).

In circolo i neutrofili sono distribuiti in due "pools" che si distinguono per la differente localizzazione delle cellule all'interno dei vasi e conseguentemente anche per il loro diverso comportamento:

- Circulating neutrophil pool (CNP) : costituito dalle cellule che scorrono liberamente nel sangue e che si trovano in posizione centrale rispetto al lume vasale;
- Marginated neutrophil pool (MNP) : costituito dai neutrofili che scorrendo in prossimità dell'endotelio (cosa che avviene primariamente a livello capillare e delle piccole vene) formano legami temporanei con le molecole di adesione delle cellule endoteliali; in seguito all'adesione i neutrofili possono staccarsi e tornare nel CNP oppure migrare nei tessuti.

La migrazione dei neutrofili marginati nei tessuti è sempre unidirezionale (quindi i neutrofili una volta usciti dal torrente circolatorio non sono in grado di tornare indietro) ed in condizioni fisiologiche avviene a random.

L'infiammazione, attraverso il rilascio di citochine infiammatorie, influenza l'espressione delle molecole di adesione da parte delle cellule endoteliali e dei recettori ad alta affinità da parte dei neutrofili, che aumentano il "rolling" e la forza di adesione, favorendo il successivo processo di migrazione verso i tessuti.

Nel cane, come nella maggior parte dei mammiferi, il rapporto CNP/MNP in condizioni fisiologiche è vicino a 1. Su un totale di $10,2 \times 10^8/\text{kg}$ di neutrofili presenti nel sangue, $5,4 \times 10^8$ appartengono al CNP mentre $4,8 \times 10^8$ al MNP (Willard & Tvedten 2012).

I maggiori processi che influenzano la concentrazione di neutrofili nel sangue sono:

- Produzione: proliferazione e differenziazione delle cellule staminali e/o effettiva maturazione delle cellule allo stadio di mielociti.
- Rilascio da parte del midollo: normalmente sono i neutrofili maturi a lasciare il midollo.
- Distribuzione tra CNP e MNP.
- Migrazione dei neutrofili dal sangue ai tessuti (i neutrofili segmentati hanno maggiore capacità di migrare nel compartimento extravascolare rispetto ai neutrofili immaturi).

(Stocham & Scott 2008)

I neutrofili possiedono diversi tipi di granuli intracitoplasmatici che si formano sequenzialmente durante la differenziazione delle cellule progenitrici mieloidi:

- I granuli primari, o *azzurrofilo*, sono piccoli lisosomi che contengono numerose proteine con attività battericida. Le più rappresentative sono la mieloperossidasi (MPO) e le alfa-defensine (i maggiori costituenti dei granuli azzurrofilo, circa il 5% delle proteine totali in essi contenute). La MPO è un enzima che si forma solo nei primi stadi di sviluppo della cellula (a livello di promielocita), quando viene secreta dal neutrofilo attivato reagisce con H_2O_2 formando NADPH ossidasi che incrementa la tossicità di questo ossidante. I granuli azzurrofilo contengono inoltre proteasi, azzurrocidine, un terzo del lisozima totalmente prodotto dai neutrofili e lattoferrina.

- I granuli secondari, o *specifici*, sono più grandi e numerosi, si formano nelle cellule in sviluppo allo stadio di mielocita e metamielocita e contengono la maggior parte del lisozima, oltre a fosfatasi alcalina, lattoferrina e proteine cationiche.
Le membrane dei granuli secondari contengono anche integrine e altre molecole di adesione che si spostano verso la superficie cellulare durante l'attivazione. (Cheville 2003)
- I granuli terziari sono presenti nei neutrofili a banda o nei segmentati e sono ricchi di lisozima e gelatinasi.

I neutrofili esprimono sulla loro superficie recettori per i frammenti FC delle immunoglobuline (FC γ s), recettori per le molecole di adesione e recettori per il complemento.

La proprietà dei neutrofili sono:

1. Chemiotassi
2. Fagocitosi
3. Sintesi di superossidi e di enzimi litici contenuti nei granuli
4. Modulazione dell'infiammazione

1. La chemiotassi è la movimentazione delle cellule verso un determinato sito in risposta ai fattori chemiotattici (i mediatori chimici diffusibili dell'infiammazione), il movimento è unidirezionale e avviene secondo gradiente di concentrazione. Anche macrofagi ed eosinofili rispondono ai fattori chemiotattici, ma i neutrofili sono maggiormente recettivi e rispondono a molti mediatori diversi: frazioni del complemento (C3 e C5), fibrinopeptidi (che derivano dalla degradazione della fibrina), prodotti collagenolitici, citochine solubili (IL-1, IL-8, PAF o fattore di attivazione piastrinica), callicreina, componenti batteriche come le endotossine e leucotrieni. L'interazione di queste molecole con vari tipi di recettori espressi sulla superficie dei neutrofili consente loro di esercitare l'effetto chemiotattico a diversi livelli.

Il primo è quello riguardante l'affinità recettoriale tra neutrofili e cellule endoteliali attivate, per cui da un'adesione transitoria l'adesione diventa sempre più stabile, il rallentamento dei neutrofili che rotolano sulla superficie endoteliale favorisce il contatto e l'interazione con ulteriori molecole chemiotattiche, che determinano attivazione neutrofilica e la loro successiva migrazione transendoteliale attraverso le giunzioni intercellulari delle pareti vasali.

In ambiente extravascolare i neutrofili interagiscono con la matrice extracellulare del tessuto connettivo e grazie a modificazioni del citoscheletro riescono a spostarsi con movimenti ameboidi che aumentano la loro velocità in modo direttamente proporzionale alla concentrazione di fattori chemiotattici. (Cheville 2003)

2. e 3. L'attività microbica è costituita da una combinazione di processi ossidativi e processi enzimatici dipendenti dall'ossigeno che si attivano contemporaneamente alla fagocitosi quando la cellula viene a contatto con un qualsiasi stimolo patogeno. (Smith 1994)

La fagocitosi è un processo di endocitosi che dipende dall'interazione dei recettori espressi sulla superficie del neutrofilo con molecole opsonizzanti che rivestono l'agente patogeno o con determinati antigeni che il patogeno stesso esprime sulla sua superficie; una volta avvenuto il legame (e la conseguente adesione neutrofilo/patogeno) la

membrana citoplasmatica del neutrofilo si invagina, inglobando il microrganismo all'interno di un vacuolo definito fagosoma.

Quindi si attivano contemporaneamente due meccanismi:

- A) l'aumento improvviso ed imponente delle reazioni metaboliche da parte della cellula con un incremento di 50-100 volte il consumo di ossigeno, fenomeno che viene chiamato “*respiratory burst*” o “esplosione respiratoria”; questo porta alla produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e specie reattive dell'azoto (RNS) come l'ossido di azoto, aventi effetto citotossico.
- B) la degranolazione dei neutrofili, che può essere sia intracellulare sia extracellulare; in quella intracellulare i granuli si fondono al fagosoma formando il fagolisosoma, le sostanze microbicide contenute dai granuli vengono così a contatto con il patogeno determinandone la digestione. Nella degranolazione extracellulare le molecole rilasciate danneggiano i tessuti dell'ospite (*neutrophyl paradox*) amplificando il processo infiammatorio.

4. La modulazione della risposta infiammatoria da parte dei neutrofili avviene mediante il rilascio di alcune citochine proinfiammatorie come IL-1, IL-6, TNF- α e PAF (fattore di attivazione piastrinica) che da una parte rendono le cellule endoteliali dei vasi limitrofi più adesive per i neutrofili stessi, dall'altra attivano le piastrine che producono così molecole vasoattive, trombossani, oltre ad esprimere una maggiore aggregazione piastrinica.

Esiste tuttavia anche una modulazione di tipo antinfiammatorio da parte dei neutrofili, che per azione dell'acido arachidonico possono dare origine a prodotti che inibiscono l'ulteriore migrazione di neutrofili nel sito della lesione. (Tizard 2009)

1.4.3 Monociti e macrofagi

I monociti sono lo stadio immaturo e circolante dei fagociti mononucleati e si trasformano in questi elementi attivi quando abbandonano il torrente sanguigno per raggiungere i tessuti, diventando quindi macrofagi.

La produzione dei monociti avviene nel midollo osseo con meccanismi più complessi rispetto a quelli che regolano la produzione dei neutrofili, così come più complesso risulta il ciclo vitale di queste cellule che, anche dopo aver abbandonato il midollo, conservano la capacità di proliferare e differenziarsi in macrofagi di vario tipo a seconda dei tessuti in cui si localizzano, quali ad esempio:

- istiociti: localizzati nel tessuto connettivo
- cellule di Kupffer: localizzati nei sinusoidi epatici
- cellule microgliali: nel sistema nervoso centrale
- macrofagi alveolari e macrofagi polmonari intravascolari
- osteoclasti: localizzati nel tessuto osseo

➤ Dai monociti originano inoltre le cellule dendritiche mieloidi (APC) descritte precedentemente.

In condizioni fisiologiche i macrofagi sono continuamente coinvolti nella degradazione degli eritrociti invecchiati, del colesterolo, dei polimeri della fibrina, delle secrezioni polmonari alveolari e di altre proteine. Mentre in corso di infiammazione costituiscono la seconda linea di difesa della flogosi, contribuendo a uccidere alcuni agenti patogeni e particelle estranee, rimuovere i detriti necrotici, eliminare le cellule danneggiate o

invecchiate ed i loro metaboliti ed assumono un ruolo predominante nei processi granulomatosi e piogranulomatosi dell'istoflogosi, dove possono fondersi per formare le cellule giganti. (Cheville 2003, Dale et al. 2008; Willard & Tvedten 2012)

Nel corso dell'infiammazione acuta le sostanze ad azione chemiotattica sui neutrofili non hanno effetti specifici sui monociti, per cui i fagociti mononucleati sono scarsamente presenti nei primi stadi (Cheville 2003), tendono ad accumularsi nel sito flogistico piuttosto lentamente rispetto ai neutrofili, ma essendo più longevi finiscono di solito per dominare gli ultimi stadi della risposta immunitaria.

In corso di infiammazione le funzioni dei macrofagi sono principalmente: presentazione dell'antigene, fagocitosi (finalizzata a uccidere il patogeno e/o a eliminare i detriti) e immunomodulazione. (Dale et al. 2008)

I macrofagi risultano meno selettivi nell'attività fagocitaria e sono in grado di inglobare particelle di dimensioni ragguardevoli, come anche cellule morte (Aguggini et al. 2006), l'attività di fagocitosi è più lenta rispetto a quella svolta dai neutrofili e la degradazione che ne deriva è incompleta, i residui digeriti si accumulano in grossi lisosomi detti corpi residuali che possono essere espulsi dalla cellule per esocitosi (Cheville 2003) mentre frammenti dell'antigene vengono esposti associati ai complessi maggiori di istocompatibilità di classe II per la stimolazione della risposta immunitaria specifica.

Riguardo l'attività di immunomodulazione essa dipende dalla produzione di citochine ad azione pro-infiammatoria, in particolare di IL-1 e TNF- α e di chemochine come la CXCL8 (o IL-8) e la CXCL2 (o MIP-2)

1.5 Mediatori dell'infiammazione

I mediatori dell'infiammazione sono le molecole prodotte o rilasciate in seguito all'insulto tissutale che innescano e coordinano la risposta infiammatoria e l'attività delle varie cellule in essa coinvolte.

Si possono così riassumere:

Mediatori plasmatici

Attivatori del fattore di Hageman:
Sistema delle chinine
Sistema della coagulazione e fibrinolisi
Attivatori del complemento

Tabella 1.1 - Mediatori plasmatici (modificato da Robbins et al. 2005)

Mediatori cellulari

Mediatori preformati e contenuti nei granuli:
Amine vasoattive: istamina e serotonina
Enzimi lisosomiali
Mediatori sintetizzati in seguito a stimolazione:
Prostaglandine
Leucotrieni
Fattore di attivazione piastrinico
Specie reattive dell'ossigeno
Ossido nitrico
Citochine

Tabella 1.2 - Mediatori cellulari (modificato da Robbins et al. 2005)

1.5.1 Le citochine

Sono molecole glicoproteiche a basso peso molecolare (8-40 kDa), chiamate genericamente citochine, che realizzano una sorta di comunicazione tra le cellule e influenzano molte funzioni cellulari, alcune direttamente connesse con la reazione flogistica altre con la risposta immunitaria; risultano quindi fondamentali per la coordinazione e la regolazione della risposta infiammatoria.

Hanno un'elevatissima affinità per i loro recettori, per cui sono in grado di esplicare i relativi effetti biologici a concentrazioni picomolari.

Sono prodotte prevalentemente da cellule infiammatorie (del sistema immunitario innato e acquisito) ma in misura minore anche da altre cellule coinvolte nei processi infiammatori, come piastrine, cellule endoteliali, fibroblasti e alcune cellule epiteliali. (Vella et al. 1992)

La loro sintesi ed il loro rilascio sono strettamente legati alla presenza di stimoli (sia endogeni che esogeni) in grado di attivare le cellule. I geni codificanti per le citochine infatti non vengono normalmente trascritti e, di conseguenza, gli RNA messaggeri (mRNA) codificanti per le citochine non sono presenti nelle cellule a “riposo”. Quando invece si presenta uno stimolo efficace si verifica una rapida attivazione della trascrizione dei geni codificanti per le citochine, un accumulo dei relativi mRNA e quindi la sintesi del prodotto proteico. Esistono tuttavia anche meccanismi di regolazione post-trascrizionali (che controllano la stabilità degli mRNA e regolano così la sintesi proteica) e meccanismi post-traduzionali (che regolano la secrezione delle citochine all'esterno della cellula). (Vella et al. 1992)

La secrezione delle citochine è comunque un evento breve e autolimitante, poiché non vengono stoccate all'interno della cellula.

L'azione delle citochine può essere locale, potendo esercitare effetto sia su cellule vicine (azione paracrina) che sulla stessa cellula che le ha secrete (azione autocrina); o sistemica andando quindi ad interagire con cellule distanti rispetto al sito dove sono state prodotte (azione endocrina).

Oltre ad essere prodotte da vari tipi cellulari, le citochine possono essere allo stesso tempo attive su un'ampia varietà di cellule, determinando così effetti biologici su più organi bersaglio contemporaneamente e tale proprietà è definita “pleiomorfismo”. Un'altra proprietà caratteristica è la “ridondanza d'azione”, per cui diverse citochine agenti su uno stesso bersaglio cellulare determinano il medesimo effetto biologico. Infine queste molecole spesso agiscono innescando una produzione “a cascata”, ovvero la produzione di una citochina attiva varie cellule a produrre altre citochine che a loro volta ne stimolano altre. Questo meccanismo è noto come “cascata citochinica” (“*cytokine cascade*”) e quando il processo flogistico esuberante sfugge ai meccanismi di autocontrollo, le citochine assumono un ruolo patologico e la loro produzione incontrollata viene definita “tempesta citochinica” (“*cytokine storm*”). Queste proprietà differenziano e contraddistinguono chiaramente le citochine dagli ormoni del sistema endocrino.

Il termine “citochina” è generico e comprende le sostanze prodotte dai linfociti, le sostanze prodotte dai monociti/macrofagi e tutte quelle prodotte da un ampio spettro di cellule.

La nomenclatura utilizzata per identificarle e distinguerle si basava sulla funzione, sulla cellula secernente o sulla cellula bersaglio, ma i nomi attribuiti a molte di queste molecole in realtà non sono appropriati poichè descrivono, per esempio, una specifica azione biologica (in genere la prima in ordine di tempo ad essere stata descritta) quando in realtà la stessa molecola produce molteplici effetti (pleiotropismo) ed in effetti qualsiasi termine descrittivo risulta inadeguato a definirne le proprietà. (Vella et al. 1992) Quindi sebbene tale nomenclatura sia da considerare ormai obsoleta, si fa ancora riferimento ad essa, riconoscendo le seguenti tipologie di citochine:

- a) **Interleuchine (IL):**
così chiamate nella credenza che fossero secrete da cellule leucocitarie e destinate ad interagire con altri leucociti per la comunicazione tra cellule del sistema immunitario, mentre è stato visto che vengono secrete da molte altre cellule e che regolano un'ampia varietà di risposte, comprendendo sia citochine con effetto pro-infiammatorio sia citochine con effetto anti-infiammatorio; (Tisoncik et al. 2012)
- b) **Interferoni (IFN):**
interferiscono sulla replicazione virale, la produzione di interferone è uno dei primi meccanismi ad attivarsi durante le infezioni virali, penetrando nelle cellule che esprimono i recettori per l'IFN sopprime la replicazione del virus; (Cheville 2003)
- c) **Fattori di crescita (GSF):**
stimolano la crescita e la differenziazione dei precursori delle cellule del sangue e sono associati anche all'infiammazione come parte di un complesso meccanismo di risposte cellulari ad effetto pro-infiammatorio che include IL-1 e TNF; (Tisoncik et al. 2012)
- d) **Tumor necrosis factor (TNF):**
caratterizzato originariamente per la sua capacità di indurre apoptosi in alcune cellule tumorali, esplica la medesima azione su cellule infette da virus ed esercita effetto pro-infiammatorio agendo su un'ampia gamma di cellule.

Si fa inoltre riferimento a “**chemochine**” per indicare le citochine che esercitano effetto chemiotattico, “**linfocine**” per indicare quelle prodotte dai linfociti e “**monochine**” per quelle prodotte da monociti/macrofagi.

La classificazione funzionale delle citochine le suddivide invece in tre gruppi in base alle loro funzioni biologiche:

1. Citochine che agiscono sull'immunità innata:
prodotte principalmente dai macrofagi in risposta ad un agente immunogeno e sono responsabili delle prime reazioni infiammatorie (sono quindi comprese tra le citochine “pro-infiammatorie”).
Sono: IL-1, IL-6, IL12, IL-18, TNF- α e sono responsabili della produzione di NOS-2 e di COX-2 enzimi che determinano la produzione di molecole ossidanti (come NO) e infiammatorie (prostaglandine e leucotrieni).
2. Citochine che agiscono sull'immunità acquisita:
prodotte dai linfociti T in risposta al riconoscimento dell'antigene specifico.
3. Citochine che stimolano l'emopoiesi:
prodotte da cellule del midollo osseo, da leucociti e da altri tipi cellulari, sono in grado di stimolare la crescita e differenziazione dei leucociti immaturi.

Mentre sulla base degli effetti relativi alla risposta infiammatoria, le citochine si suddividono in

1. Citochine pro-infiammatorie:

che amplificano la risposta flogistica. Le prime a comparire sono il TNF- α e l'IL-1, che attivano la cascata citochinica coinvolgendone altre, quali l'IL-6, IL-8, IL-12, IL-18, l'IFN- γ , il GM-CSF, la Macrophage Inflammatory Protein-1 (MIP-1), il PAF e vari fattori chemiotattici (entrano in gioco anche altri mediatori come le prostaglandine, i leucotrieni, i trombossani e l'ossido nitrico che regolano l'espressione del fenomeno infiammatorio locale determinando gli effetti che saranno descritti nello specifico più avanti).

2. Citochine anti-infiammatorie:

che modulano la risposta infiammatoria allo scopo di limitare i potenziali effetti dannosi che questa potrebbe altrimenti provocare. Sono l'IL-4, IL-10, ed il Transforming Growth Factor- β , prodotte principalmente dai linfociti T helper.

In questo meccanismo di controregolazione della risposta infiammatoria sono coinvolti anche gli antagonisti per i recettori delle citochine (come l'IL-1RA), i recettori solubili per IL-1, la IL-1 binding protein e la TNF- α binding protein (Gruys et al. 2005), oltre ai glucocorticoidi e alle catecolamine.

Nel complesso, le citochine liberate durante la fase acuta dei processi infiammatori mediano le reazioni locali ed innescano la risposta sistemica con la comparsa di febbre, cambiamenti nel metabolismo di molti organi, significativa alterazione della sintesi proteica da parte del fegato con produzione delle proteine di fase acuta e leucocitosi. Le citochine Tumor Necrosis Factor- α , Interleuchina-1 e Interleuchina-6 risultano particolarmente elevate in molti, se non tutti, gli stati infiammatori (Scheller et al. 2011), sono pertanto quelle che più caratterizzano i processi infiammatori. Di seguito la descrizione dei relativi effetti biologici.

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)

E' considerato il principale mediatore della risposta infiammatoria acuta e viene prodotto da macrofagi, linfociti T attivati dalla presenza di antigeni, mastociti, cellule endoteliali, linfociti B e fibroblasti, conseguentemente a qualunque insulto cellulare/tissutale, ma in modo particolare dalla presenza dei lipolisaccaridi dei batteri Gram negativi.

Agisce su cellule tumorali e infettate da virus inducendo l'attivazione di caspasi e proteasi che sono i principali mediatori dell'apoptosi (Tizard 2009) ed è a questa proprietà che deve il suo nome.

Stimola le cellule endoteliali ad esprimere le molecole di adesione sulla loro superficie aumentando l'adesione dei leucociti, "*rolling neutrophil*", promuove quindi il reclutamento e l'attivazione dei neutrofili e dei macrofagi nel sito di infiammazione, ne potenzia l'attività microbica e promuove la sintesi di altri mediatori dell'infiammazione (IL-1, NOS-2, COX-2, ulteriore TNF- α) amplificando così il processo flogistico.

A livello epatico stimola la sintesi di proteine della fase acuta.

Induce anche la produzione di IL-2 nei linfociti T (Petersen et al. 2004) che svolge un ruolo fondamentale nella regolazione dell'immunità specifica.

Agisce anche sul sistema endocrino, studi in vitro hanno rilevato che il TNF- α è in grado di determinare incremento di ACTH, PRL e GH inibendo invece la secrezione di

TSH, effetti che sono stati confermati in vivo ad eccezione di quello sul TSH, dove viene ipotizzato che l'effetto di inibizione venga mediato da altre strutture. (DeSouza 1993)
Il TNF- α risulta molto importante per i meccanismi di difesa dell'organismo volti a confinare e neutralizzare l'agente patogeno, ma in corso di sepsi dove si verifica una liberazione massiva di TNF- α , questa citochina diventa responsabile di shock e coagulazione intravasale disseminata. (Murphy 2011)

Interleuchina-1 (IL-1)

E' prodotta principalmente da macrofagi attivati e dalle cellule dendritiche, ma anche da linfociti T e linfociti B, cellule Natural Killer, neutrofili, cellule endoteliali, fibroblasti e cheratinociti.

Molte sue proprietà sono sovrapponibili a quelle del TNF- α ed esercita quindi effetti pro-infiammatori.

A livello sistemico aumenta il catabolismo della muscolatura striata, incrementando l'immediata disponibilità di aminoacidi e stimola il fegato a sintetizzare proteine della fase acuta. (Cheville 2003)

A livello ematopoietico stimola la produzione di GM-CSF con induzione di neutrofilia, mentre determina una riduzione della risposta all'eritropoietina da parte del midollo osseo. (Tizard 2009)

Allo stesso tempo agisce anche sui neutrofili circolanti attivandoli, aumentando così la loro risposta alla chemiotassi e favorendone la degranulazione; determina inoltre attivazione dei linfociti T e B.

Negli ultimi stadi dell'infiammazione IL-1 agisce come fattore di crescita per i fibroblasti e per le altre cellule coinvolte nei fenomeni riparativi. (Cheville 2003)

Interleuchina-6 (IL-6)

Viene principalmente sintetizzata da macrofagi attivati, linfociti T e B, mastociti, neutrofili, eosinofili, cellule endoteliali, fibroblasti, cheratinociti, cellule mesenchimali, ma la sua produzione è inducibile quasi in ogni tessuto e tipo cellulare (condrociti, cellule muscolari lisce, osteoclasti, cellule epiteliali bronchiali, astrociti, cellule dell'endometrio...) (Biffi et al. 1996)

IL-6 modula la risposta immunitaria e infiammatoria sia locale che sistemica (Biffi et al. 1996) ed esercita effetti pro-infiammatori, ma sono state dimostrate anche azioni riparative e anti-infiammatorie. (Scheller et al. 2011)

Causa plasmocitosi e produzione di immunoglobuline (e gioca infatti un ruolo fondamentale nella patogenesi dei disordini autoimmuni, tanto che era conosciuta anche come "plasmacytoma growth factor"), induce la sintesi di GM-CSF, promuove la differenziazione delle cellule nervose, partecipa alla risposta di fase acuta dei processi infiammatori e si comporta come pirogeno endogeno, stimola il fegato a produrre proteine della fase acuta e influenza la regolazione ormonale (incrementando, nell'uomo, il rilascio di ACTH, GH, PRL, LH). (Biffi et al. 1996)

1.6 Eventi dell'infiammazione acuta locale

1.6.1 Fisiopatologia della flogosi acuta

Quando uno stimolo flogogeno colpisce un qualsiasi distretto anatomico provocando un insulto tissutale, i primi eventi innescati dalla risposta infiammatoria sono:

- **alterazione della permeabilità** della rete capillare e venosa

- **iperemia attiva e**
- **iperemia passiva** del distretto colpito dallo stimolo flogogeno.

Ciò avviene per attivazione delle cellule endoteliali attorno al sito lesionato e rilascio di varie sostanze ad attività pro-infiammatoria: prostaglandine che inducono vasodilatazione, citochine ad azione chemiotattica per i leucociti (come IL-1 e TNF) e fattori di procoagulazione.

Spesso si verifica anche degranolazione dei mastociti tissutali con rilascio di istamina (che aumenta la permeabilità postcapillare e mantiene la vasodilatazione), eparina (che diminuisce la coagulabilità e stimola l'angiogenesi), serotonina (che aumenta la permeabilità capillare) e leucotrieni (che sono responsabili del dolore).

Si assiste quindi ad un aumento dell'afflusso di sangue, che persiste per attivazione di un riflesso nervoso assonale che mantiene la dilatazione arteriosa.

Il riempimento capillare ed il rigonfiamento endoteliale che consegue all'attivazione delle cellule endoteliali, determinano un rallentamento di flusso che provoca stasi ematica.

Alla stasi si associa un aumento della marginazione leucocitaria con incremento del neutrophil rolling e dell'adesione transitoria dei leucociti all'endotelio.

Si verifica quindi:

- **essudazione liquida, proteica e cellulare.**

Le alterazioni emodinamiche nel sito della flogosi interrompono il normale interscambio di liquidi tra compartimento vascolare e interstizio, con incremento della quota di fluidi che passano nell'interstizio associato a mancato riassorbimento da parte delle venule post-capillari, tale meccanismo determina la comparsa di edema.

In seguito all'essudazione liquida si verifica emoconcentrazione che rallenta ulteriormente il flusso sanguigno. Si verifica inoltre essudazione delle proteine plasmatiche per l'alterazione della permeabilità vasale sopramenzionata, e polimerizzazione del fibrinogeno in fibrina nel sito della flogosi.

I leucociti marginati vengono attivati dalle citochine pro-infiammatorie ed aumentando l'espressione dei recettori per le molecole di adesione endoteliali vi aderiscono in modo stabile, questo consente la successiva migrazione leucocitaria nel focolaio infiammatorio (dei neutrofili prima e dei monociti successivamente) determinando la fase di essudazione cellulare.

L'evento successivo è quello di:

- **degranolazione e attivazione leucocitaria.**

Una volta che i neutrofili hanno raggiunto il focolaio infiammatorio, guidati dai gradienti di concentrazione dei fattori chemiotattici, degranolano rilasciando fattori antimicrobici (H_2O_2 , enzimi idrolitici, lisozima), chinine (responsabili di vasodilatazione, aumento della permeabilità vasale e stimolazione nervosa) e proteasi che determinano danno cellulare sia nei confronti degli agenti patogeni sia nei confronti dei tessuti dell'ospite.

Vengono liberati anche fattori di attivazione piastrinica e procoagulanti, con conseguente aggregazione piastrinica e attivazione della coagulazione; inoltre le piastrine attivate producono e rilasciano PDGF (fattore di crescita di derivazione piastrinica) che stimola la neoangiogenesi.

Gradualmente anche i monociti rispondono ai segnali chemiotattici e, raggiungendo il focolaio infiammatorio, si trasformano in macrofagi che sintetizzano e rilasciano collagenasi, elastasi, lisozima, peptidi antimicrobici e citochine (IL-1, IFN- γ , TNF- α). Il TNF- α innesca la cascata citochinica.

Si assiste infine alla:

➤ **attivazione della risposta sistemica**

che sarà descritta meglio successivamente, ma che si può brevemente riassumere in:

- Produzione e rilascio da parte del fegato delle proteine di fase acuta.
- Aumentata leucopoiesi e aumentato rilascio di leucociti da parte del midollo osseo con comparsa in circolo di forme immature (neutrofili a banda).
- Aumentata linfopoiesi da parte di linfonodi e milza.

(Cheville 2003)

Tutti questi eventi si susseguono molto rapidamente, entro 1 ora circa dall'insulto tissutale.

1.6.2 Manifestazioni cliniche della flogosi acuta

I cosiddetti “segni cardinali” della flogosi acuta sono le conseguenze cliniche degli eventi fisiopatologici sopra descritti, che si verificano a livello del focolaio infiammatorio.

Localmente si apprezzano: **Rubor** (rossore), **Calor** (calore), **Tumor** (gonfiore), **Dolor** (dolore), aspetti tipici dell'infiammazione che furono identificati e descritti già nel I secolo d.C. dal filosofo romano Celso.

Inoltre la **Functio laesa** (perdita di funzione dell'organo/tessuto colpito) è un altro importante segno caratteristico dei processi infiammatori e fu aggiunto da Galeno nel II secolo d.C.

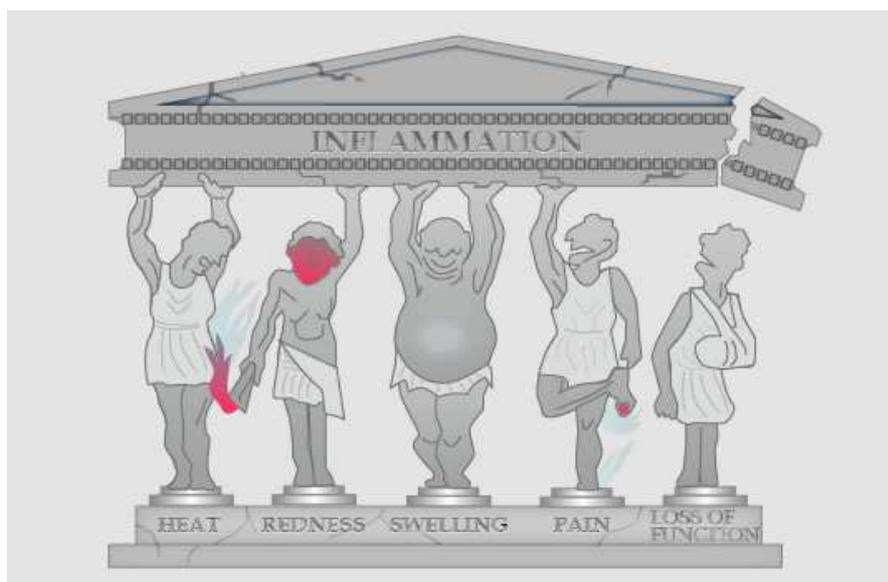


Figura 1 - I segni cardinali della flogosi acuta

L'attivazione della risposta sistemica può tuttavia determinare la comparsa di altre manifestazioni cliniche di carattere generale che saranno affrontate nel prossimo paragrafo.

Solitamente gli eventi dell'infiammazione acuta portano ad uno dei seguenti esiti:

1. **Completa risoluzione**, che avviene quando il danno è limitato o di breve durata.
Quando la lesione è stata di modesta entità il tessuto danneggiato ha ancora la possibilità di rigenerarsi, portando al ripristino anatomico-funzionale del sito oggetto di infiammazione.
2. **Guarigione tramite sostituzione con tessuto connettivo** (fibrosi).
Avviene dopo un danno tissutale di notevole entità, oppure quando la lesione infiammatoria colpisce tessuti che non sono in grado di rigenerare o quando si forma un abbondante essudato ricco di fibrina.
3. **Progressione verso l'infiammazione cronica.** (Robbins et al. 2005)

1.7 Risposta di fase acuta sistemica

Il rilascio di citochine e altri mediatori dell'infiammazione da parte delle cellule coinvolte nella reazione flogistica acuta e la seguente interazione di queste molecole con diverse cellule target dell'organismo, determina la comparsa di una reazione sistemica che prende il nome di “**risposta di fase acuta**” che può sfociare poi, nei casi più gravi, nella SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome).

L'intensità della risposta di fase acuta dipende generalmente dall'intensità del processo flogistico iniziale, a sua volta dipendente dall'aggressività dell'agente patogeno.

Gli eventi che costituiscono la risposta di fase acuta sono:

- Febbre
- Variazioni nelle concentrazioni delle proteine di fase acuta (APPs)
- Aumento dell'indice di eritrosedimentazione per aumento del fibrinogeno e delle altre APPs
- Leucocitosi neutrofilica, generale aumento della leucopoiesi e riduzione dell'eritropoiesi, aumentata reattività immunitaria
- Riduzione delle concentrazioni ematiche di zinco e ferro
- Attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene con incremento dei livelli di glucocorticoidi endogeni e adrenalina
- Riduzione della tiroxina nelle infiammazioni gravi

1.7.1 Febbre

→ TERMOREGOLAZIONE

Il controllo centrale della temperatura corporea risiede nell'area ipotalamica anteriore (centro della termoregolazione) che riceve le informazioni dai termocettori cutanei e dai recettori viscerali riguardanti la temperatura corporea e quella ambientale e, insieme all'ipotalamo posteriore e alla formazione reticolare rostrale, provvede all'integrazione dei segnali e all'elaborazione degli eventuali adattamenti corporei. Infatti se le informazioni ricevute denotano un

abbassamento o un innalzamento della temperatura corporea, il centro della termoregolazione attiva i meccanismi fisiologici per mantenerla entro il range della normalità, che dipende dal “set point” o “punto di regolazione” ipotalamico. (Ettinger & Feldman 2000)

Nel cane la temperatura corporea normale varia da 38,1 a 39,3 °C (Aguggini et al. 2006) con oscillazioni che dipendono da fattori individuali (quali età, razza e taglia) dallo stato fisiologico e dai ritmi circadiani.

- La febbre rappresenta l'aumento della temperatura corporea di un soggetto legato all'alterazione del set point ipotalamico che è spostato su valori più alti; i meccanismi messi in atto dal centro termoregolatore sono quindi finalizzati a aumentare e mantenere elevata la temperatura corporea. (Ettinger & Feldman 2000)

La febbre è solitamente associata alla presenza di un agente dannoso e/o del danno che esso ha provocato, come conseguenza della liberazione di pirogeni esogeni e pirogeni endogeni.

I pirogeni esogeni sono tutte le molecole capaci di evocare indirettamente la febbre inducendo la produzione di citochine pirogeniche, come avviene per gli agenti infettivi o per i loro metaboliti (come il lipopolisaccaride endotossico dei batteri Gram negativi, o le esotossine dei batteri Gram positivi), gli immuno-complessi, alcuni agenti farmacologici e anche alcune molecole intracellulari liberate durante processi di necrosi (come le HMGB-1 della cromatina, o i frammenti di membrana citoplasmatica); alcuni autori riconoscono infatti come pirogeni esogeni anche sostanze derivanti dalle cellule dell'individuo stesso, che vengono definiti *pirogeni esogeni di origine endogena*, poiché determinano la comparsa della febbre solo in relazione alla stimolazione dei veri pirogeni endogeni.

Tali pirogeni endogeni sono quindi molecole prodotte dall'organismo e in grado di interagire direttamente a livello dei centri termoregolatori ipotalamici determinando la risposta febbrile.

(Pontieri et al. 2004)

Sono riconosciute come tali le citochine pirogeniche, la cui principale fonte sono i monociti circolanti (DeSouza 1993) ma anche le altre cellule che partecipano al processo infiammatorio.

Da tenere presente che pure alcune cellule neoplastiche sono in grado di produrre pirogeni endogeni.

I pirogeni endogeni sono: TNF α/β , **IL-1**, INF $\alpha/\beta/\gamma$, IL-6, IL-8, MIP1- α/β

(Ettinger & Feldman 2000, Silverstein & Hopper 2014)

Molte sostanze differenti, che possono originare da altrettanto svariate patologie (infezioni batteriche/virali/protozoarie, infiammazioni non di origine infettiva, malattie immunomediate, neoplasie, farmaci..) possono comportarsi come pirogeni esogeni e quindi indurre la comparsa della febbre attraverso l'intervento delle citochine pirogeniche (che poi sono le stesse che amplificano la risposta infiammatoria promuovendo altre risposte sistemiche di fase acuta).

I meccanismi con cui si concretizza il rialzo della temperatura corporea sono di due tipi: il primo e più immediato è quello delle **termoconservazione** che rende possibile un rapido aumento della temperatura di 2-3°C in breve tempo.

Si verifica vasocostrizione periferica e vasodilatazione a carico degli organi interni, fenomeno che limita la dispersione del calore attraverso la superficie corporea. Inoltre, l'animale mette in atto adattamenti comportamentali finalizzati ad aumentare la sua temperatura (poiché nella febbre la percezione è che sia troppo bassa) come la ricerca di fonti di calore o di luoghi in cui la dispersione è limitata, e l'accovacciamento.

Il secondo meccanismo è quello della **neotermogenesi**, per cui l'organismo mette in atto delle risposte finalizzate ad aumentare la produzione di calore.

In questa fase è coinvolto l'asse TSH/T3-T4, l'azione degli ormoni tiroidei sui vari tessuti determina infatti l'aumento del metabolismo cellulare con consumo di O₂ e produzione di ATP, stimola la lipolisi, e attiva geni dipendenti dalle sequenze "TRE" (Elementi Responsivi agli ormoni Tiroidei) che determinano effetti di neotermogenesi a lungo termine, attivando:

- **ATP-asi ioniche**, che consumano grandi quantità di ATP producendo calore
- **termogenine I e II** del tessuto adiposo, proteine presenti nella membrana mitocondriale che dissipano il potenziale protonico sotto forma di calore.
- **enzimi del metabolismo energetico e lipolitico** necessari a produrre gli intermedi energetici e l'ATP necessario per la produzione di calore.

(Pontieri et al. 2004)

1.7.2 Proteine di fase acuta

Lo studio delle proteine di fase acuta si è espanso significativamente dal 1990 in ragione della loro importanza nel rilevare precocemente e/o monitorare gli stati infiammatori di un individuo, essendo una delle espressioni del sistema immunitario innato che si attiva più rapidamente durante la risposta infiammatoria acuta.

- JJ Kaneko le definisce un "*termometro molecolare*" (Kaneko et al. 2008)

Le proteine di fase acuta (APPs) sono proteine la cui concentrazione plasmatica varia almeno del 25% durante il corso di una infiammazione acuta significativa, come in caso di eventi traumatici, danno tissutale o infezione.

Durante l'infiammazione alcune di queste proteine diminuiscono la loro concentrazione e sono dette **proteine di fase acuta negative**. Come ad esempio l'albumina, la transferrina, la transtiretina (TTR o prealbumina) e l' α -lipoproteina (HDL).

Mentre la maggior parte delle APPs in corso d'infiammazione aumentano la loro concentrazione e sono dette **proteine di fase acuta positive**.

Appartengono a questo gruppo la Proteina C-reattiva (CRP), la sierioamiloideA (SAA), l'aptoglobina (Hp), il Fibrinogeno (Fb), l' α -1 glicoproteina acida (AGP), la Ceruloplasmina (Cp), frazioni del complemento C₃ e C₄, la proteina C e la transferrina.

La APPs positive sono coinvolte nella riparazione dei tessuti danneggiati e nella lotta contro i microorganismi invasori, contribuendo al tentativo dell'organismo di ripristinare l'omeostasi per ritornare ad uno stato di salute; mentre l'ipotesi a spiegazione delle APPs negative è che la loro sintesi venga ridotta in favore delle APPs positive e ne risulti aumentato il catabolismo.

La risposta delle varie APPs ad uno stimolo infiammatorio è differente sia per quanto riguarda l'intensità che la velocità; sulla base di questo le APPs positive vengono distinte in principali, moderate e minori.

Le APPs principali presentano, in linea di massima, le seguenti caratteristiche:

- valori basali $< 0.1\mu\text{g/dL}$
- rapido incremento e decremento delle loro concentrazioni sieriche (è possibile quindi apprezzare un aumento dei livelli sierici di tali proteine già entro 4-5h dall'inizio dello stimolo infiammatorio) (Furlanello 2012)
- intensità dell'incremento che varia da 100 a 1000 volte la loro concentrazione sierica basale
- il picco della concentrazione sierica viene solitamente raggiunto 24-48h dall'inizio dello stimolo infiammatorio
- breve emivita, che determina un rapido declino delle loro concentrazioni sieriche in caso di guarigione

Le APPs moderate presentano invece:

- valori basali più alti
- una velocità di incremento minore (8-10h dall'inizio dello stimolo infiammatorio)
- un incremento di 5-10 volte la concentrazione sierica basale
- raggiungimento del picco 2-3 giorni dopo l'inizio dello stimolo infiammatorio
- decremento più lento in caso di guarigione con ripristino dei livelli basali tardivo rispetto alla fine del processo flogistico

Infine le APPs minori incrementano del 50% o al massimo del 100% (raddoppiando quindi il proprio valore sierico basale) con un aumento della loro concentrazione molto graduale.

(Kaneko et al. 2008; Gómez-laguna et al. 2010)

Le varie specie presentano differenze nella risposta delle singole APPs ai processi infiammatori, per cui la stessa proteina può essere classificata come APP principale nel cane e moderata o minore nel gatto e viceversa.

- ➔ Nel cane si considerano quindi:
APPs principali: **CRP, SAA**
APPs moderate: **Hp, Cp, AGP, Fb**

◆ Sintesi delle APPs:

La sintesi delle APPs è regolata dal rilascio di citochine proinfiammatorie durante il corso della risposta di fase acuta, in particolare da IL-1, IL-6 e TNF- α con un'importante mediazione da parte dei glucocorticoidi endogeni e delle catecolamine che sono rilasciate per attivazione dell'asse ipotalamo-ipofisi-surrene, che stress e infiammazione stessa determinano.

(Gómez-laguna et al. 2010)

Nel 1984 fu studiata la correlazione tra l'azione di glucocorticoidi e catecolamine e la produzione di una proteina di fase acuta principale nel ratto (la α -macrofetoproteina). Fu osservato che procedure capaci di indurre stress con aumento di corticosteroidi endogeni determinavano un moderato aumento della APP di riferimento e che la somministrazione di desametasone comportava innalzamenti della APP paragonabile a quella indotta da un intervento di laparotomia. L'osservazione che in animali feriti si verificava un rapido incremento delle catecolamine fece supporre che queste potessero esercitare un effetto sulla produzione di APP, ma in seguito a surrenectomia (che deprimeva fortemente la risposta di fase acuta) somministrazioni di desametasone aumentavano i livelli di APP mentre somministrazioni di adrenalina non suscitavano

tale effetto. Secondo gli autori questo indicava che le catecolamine giocano un ruolo importante nella risposta di fase acuta mediata dai glucocorticoidi esercitando probabilmente un'azione permissiva nei loro confronti (almeno nel ratto) (Ganong 1963), inoltre somministrazioni combinate di glucocorticoidi e adrenalina in soggetti surrenectomizzati ripristinavano totalmente la produzione di di APP per un effetto che appariva più sinergico che additivo. (Van Gool et al. 1984)

Circa l'influenza dei glucocorticoidi sulla sintesi delle proteine di fase acuta è stato più volte oggetto di studio anche il fibrinogeno (Crane & Miller 1977; Princen et al. 1984). Tuttavia i glucocorticoidi non suscitano lo stesso effetto su tutte le APPs.

Il meccanismo di produzione mediato dalle citochine coinvolge recettori delle citochine, vie di segnalazione, e l'induzione di mRNA per le APPs, che vengono rilasciate da 6 a 12 ore dopo la stimolazione (Kaneko et al. 2008)

Le citochine si legano ai rispettivi recettori espressi sulla membrana delle cellule bersaglio attivando differenti meccanismi di trasduzione del segnale, in base al tipo di interazione citochina-recettore alcuni di questi eventi molecolari conducono all'attivazione, o alla nuova sintesi, dei fattori di trascrizione che si legano al DNA sugli elementi regolatori dei geni bersaglio che codificano per le proteine di fase acuta, attivandone l'espressione genica e quindi la sintesi.

(Moshage 1997; Jensen & Whitehead 1998; Streetz et al. 2001)

La produzione di APPs è in larga misura sostenuta dagli epatociti, quindi l'organo principalmente coinvolto in questa risposta è il fegato che si occupa della sintesi di Hp, CRP, SAA, AGP, fattori della coagulazione tra cui il fibrinogeno, componenti del complemento, ceruloplasmina ed altri, che durante la risposta di fase acuta subiscono un incremento (e sono le proteine di fase acuta positive) e provvede alla sintesi di albumina, transferrina ed altre proteine che nella stessa situazione subiscono invece un decremento (proteine di fase acuta negative).

Ma esiste anche una produzione extraepatica di APPs.

E' da tempo dimostrata la produzione di AGP da parte di linfociti (Gahmberg & Andersson 1978) e la sua produzione da parte di altri organi (reni, intestino, cuore, prostata) è stata più volte descritta nell'uomo (Fournier et al. 2000; Poland et al., 2002). Jabs et al. 2003 dimostrarono mediante l'utilizzo di PCR real time e tecniche di immunoistochimica, che le cellule epiteliali della corticale renale stimulate dall'IL-6 esprimevano CRP-mRNA; Calabro et al. 2005 hanno condotto uno studio in vitro su adipociti umani dimostrando che sotto l'effetto di citochine proinfiammatorie queste cellule producono CRP.

◆ Funzioni delle APPs:

Molte di queste proteine sono considerate elementi del sistema immunitario innato poiché pur avendo molteplici funzioni, durante la risposta di fase acuta partecipano attivamente alle funzioni di difesa aspecifica, difendendo l'organismo dagli effetti dannosi della patologia in atto e della flogosi e cercando di ristabilire l'omeostasi. Molte APPs svolgono un'azione antibatterica e sono in grado di influenzare lo svolgimento della risposta immune (ad esempio CRP, SAA e AGP).

Alcune APPs hanno attività antiproteasica, come l' α 1-antitripsina e l' α 2-macroglobulina, e servono a contenere i danni provocati dagli enzimi proteolitici rilasciati da macrofagi e neutrofili nel focolaio infiammatorio, che risultano lesivi anche per i tessuti sani.

Altre APPs svolgono invece un'attività di pulizia e recupero di metaboliti, legandosi a molecole rilasciate dalle cellule danneggiate e rendendole nuovamente disponibili per l'organismo, riducendo invece la disponibilità di queste sostanze agli agenti patogeni, come Hp, SAA, CRP.

Per quanto riguarda le APPs negative invece la loro riduzione è funzionale sia per aumentare la quantità di aminoacidi disponibili per la sintesi delle APPs positive (questo è particolarmente vero per l'albumina), sia perchè essendo proteine di trasporto che legano ormoni e vitamine, la loro riduzione incrementa la quota libera di queste sostanze nel sangue, aumentando così la presenza delle forme biologicamente attive di ormoni e vitamine senza che l'organismo abbia dovuto incrementarne la produzione. (Paltrinieri 2007)

Nel complesso le proteine di fase acuta sono oltre 200, ma solo un numero ristretto viene preso in considerazione nella pratica clinica.

1.7.2.1 Proteina C Reattiva

E' una proteina pentamerica, costituita da 5 subunità di circa 20 kDa per una massa totale di 100-150 kDa. La CRP canina differisce da quella umana perchè 2 delle 5 subunità sono glicosilate (mentre nella CRP umana nessuna lo è) e migra su SDS-PAGE formando una doppia banda (mentre quella umana forma una banda unica).

Nel cane come nell'uomo la CRP migra nella regione γ durante l'elettroforesi.

(Meyer & Harvey 2007)

E' stata la prima proteina di fase acuta ad essere riconosciuta e descritta.

Nel 1930 Tillet e Francis si accorsero che i sieri di pazienti umani affetti da diverse malattie infettive in fase acuta precipitavano (in presenza di ioni calcio) se messi a contatto con la frazione polisaccaridica C di *Streptococcus pneumoniae*. Per questo la proteina responsabile di questa reazione fu denominata proteina C reattiva.

Oltre a reagire con il polisaccaride C dello pneumococco, la CRP forma un legame calcio-dipendente con i fosfatidi della colina (lecitina, lisolecitina, sfingomielinina), con altri lipidi, polisaccaridi e peptidopolisaccaridi, contenenti o meno la fosforilcolina, e con vari polianioni, inclusi gli acidi nucleici, l'eparina e il solfato di destrano.

In assenza di ioni calcio, la proteina C reattiva si lega invece ai vari policationi (tra cui gli istioni, la proteina cationica dei leucociti e la protamina) utilizzando un sito di legame differente. (Salerno 2012).

La funzione primaria della CRP è sostanzialmente quella di legare diverse configurazioni molecolari che vengono tipicamente rilasciate in corso di danno cellulare o che si trovano espresse sulla superficie dei patogeni (e tali molecole sono comunque sempre presenti durante un processo infiammatorio) esercitando un importante ruolo nella risposta immunitaria innata aspecifica.

La fosforilcolina ad esempio si trova in un gran numero di specie batteriche e rappresenta un componente dei fosfolipidi che costituiscono le membrane eucariotiche (quindi presente anche nelle cellule dell'ospite). Poichè il gruppo di testa di queste molecole nelle cellule intatte è inaccessibile alla CRP, essa può legarsi alla fosforilcolina solo in caso di danno cellulare con alterazioni delle membrane cellulari o di apoptosi. (Black et al. 2004)

La CRP, interagendo con le membrane cellulari danneggiate, frammenti cellulari, cromatina e proteine nucleari, oltre che con vari componenti di diversi batteri, funghi e parassiti, riconosce rapidamente la presenza di un danno tissutale o di un agente infettante e partecipa attivamente alla difesa aspecifica e precoce dell'organismo, con

caratteristiche funzionali simili a quelle delle IgG, ma con la differenza di non presentare affinità specifica verso un determinato antigene.

Ad esempio durante la risposta di fase acuta di un'infezione batterica la CRP si lega ai patogeni realizzando l'**opsonizzazione**, che da una parte determina l'attivazione del complemento attraverso la via classica (legandosi al fattore C1q e al fattore H del complemento) e dall'altra favorisce la fagocitosi delle cellule batteriche opsonizzate, contribuendo quindi, in un modo o nell'altro, alla rapida eliminazione del materiale a cui si è legata.

Per quanto riguarda la facilitazione dei processi di fagocitosi, CRP interagisce con i recettori per i frammenti FC delle immunoglobuline (FC γ RI) che si trovano sulla superficie di neutrofili e macrofagi (analogamente è in grado di legarsi ai recettori FC γ RII presenti sulla superficie dei linfociti B).

In particolare, la classe di recettori FC γ Rs coinvolti nel potenziamento della risposta immunitaria aspecifica è quella dei recettori attivatori, associati nella loro coda citoplasmatica a motivi ITAM (Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif) che attivano le protein-tirosin-chinasi (PTK) che a loro volta fosforilano e attivano altri elementi che fanno parte della cascata di trasduzione del segnale, stimolando così risposte biologiche di:

- secrezione di citochine pro-infiammatorie
- attivazione della fagocitosi
- aumento del metabolismo ossidativo

Mentre l'altra classe di recettori FC γ R è quella dei recettori inibitori che sono collegati a motivi ITIM (Immunoreceptor Tyrosine-based Inhibition Motif) i quali attivano la protein-fosfatasi-proteica (PTP) che blocca i recettori attivatori. (Black et al. 2004)

La CRP sembra in grado di legarsi ad entrambe le classi di recettori (contenenti ITAM e ITIM) sia FC γ RI che FC γ RII, ma i meccanismi specifici con cui la CRP interagisce con le varie cellule del sistema immunitario non sono ancora del tutto chiariti.

Ad ogni modo è stato osservato che CRP esercita attività pleiotropica contribuendo a modulare la risposta infiammatoria e determinando effetti sia pro-infiammatori che anti-infiammatori.

Pasceri et al. hanno visto che nell'uomo concentrazioni uguali o > 5 mcg/mL hanno un significativo effetto proinfiammatorio nelle cellule endoteliali della vena ombelicale e delle arterie coronarie, poiché inducono una up-regulation dell'espressione di molecole ICAM-1 (molecola di adesione intercellulare), VCAM-1 (molecola di adesione vascolare) e di E-selectina (endoteliale). (Pasceri et al. 2000)

E' stato poi osservato in vitro che CRP inibisce la sintesi di ossido nitrico nelle cellule endoteliali aortiche, stimola il rilascio di IL-8 da molti tipi di cellule, incrementa il rilascio di IL-1, IL-6, IL-18 e TNF- α da parte dei macrofagi.

Mentre come effetti anti-infiammatori induce l'espressione di IL-1RA (antagonista recettoriale dell'IL-1), incrementa il rilascio della citochina antinfiammatoria IL-10 e reprime la sintesi dell'interferone.

Sebbene alcune di queste proprietà espresse in vitro siano coerenti con i complessi effetti osservati in vivo, è verosimile che la funzione di CRP sia dipendente dal contesto e che possa sia migliorare che smorzare la risposta infiammatoria a seconda della circostanza. (Black et al. 2004)

La CRP si comporta da proteina di fase acuta positiva principale e la sua concentrazione aumenta di oltre 100 volte nell'arco di 24-48h dallo stimolo flogistico (Villiers & Blackwood 2006).

Nel cane le variazioni della concentrazione di CRP nel plasma sono misurabili già 4-5 ore dopo un unico stimolo infiammatorio, mentre nell'uomo la risposta della CRP è più lenta e non si apprezzano variazioni prima delle 6 ore successive allo stimolo flogistico (Gruys et al. 2005).

E' una delle APPs più sensibili nella specie canina e la sua emivita è di 19 ore (Mukorera et al. 2011), pertanto quando si verifica un aumento dei valori di CRP rispetto ai suoi livelli basali questo è sempre chiaramente indicativo della presenza di un processo infiammatorio sistemico (Christensen et al. 2014) in atto.

La sua concentrazione plasmatica si mantiene elevata soltanto se persiste l'esposizione antigenica e infiammatoria che determina il rilascio delle citochine pro-infiammatorie responsabili dell'ulteriore sintesi di CRP, questa APP quindi rimane ad elevati livelli di concentrazione plasmatica per tutta la durata della patologia, per poi scendere bruscamente dopo che lo stimolo flogistico è stato rimosso. (Mukorera et al. 2011)

La rapida produzione e clearance della CRP ne fa dunque un marker estremamente utile per indicare la situazione clinica di un animale.

La durata e l'intensità del picco della risposta di CRP possono poi variare in base al tipo di stimolo, ma rimane tuttavia un marker aspecifico di risposta infiammatoria sistemica.

1.7.2.2 Fibrinogeno

Il fibrinogeno (conosciuto anche come fattore I della coagulazione) è una glicoproteina solubile composta per il 3-5% da carboidrati, del peso molecolare di 340 kDa, che contiene tre paia di catene polipeptidiche diverse unite da legami disolfuro.

Dotata di mobilità elettroforetica intermedia tra la regione β e γ è considerata generalmente come una β -globulina (Aguggini et al. 2006) sebbene sia generalmente esclusa dalle analisi elettroforetiche perchè per queste viene di norma utilizzato il siero. (Douglas & Wardrop 2010)

Viene sintetizzato nel fegato dagli epatociti e la velocità di sintesi è regolata (in condizioni fisiologiche) dalla sua concentrazione plasmatica; il fibrinogeno ha un tempo di emivita variabile tra 2,5 e 4,5 giorni ed i suoi livelli in circolo sono normalmente mantenuti costanti a valori compresi tra 200 e 400 mg/dL, (Aguggini et al. 2006) rappresentando circa il 5% delle proteine plasmatiche totali (Kaneko et al. 2008)

Il fibrinogeno svolge un ruolo essenziale nella coagulazione, rappresentando il precursore della fibrina e comportandosi come mediatore (in associazione con la trombospondina) dell'aggregazione piastrinica. L'attivazione delle piastrine provoca infatti un cambiamento nella conformazione dei recettori di superficie piastrinica GpIIb-IIIa che permette loro di legarsi alle molecole di fibrinogeno, queste fungono da ponti di congiunzione tra più piastrine favorendo così la formazione di ampi aggregati piastrinici.

La trasformazione del fibrinogeno in fibrina avviene ad opera della trombina, enzima proteolitico conosciuto anche come fattore II α della coagulazione. La trombina si lega al fibrinogeno e lo attacca scindendo da esso i fibrinopeptidi A e B (FpA e FpB) e generando monomeri di fibrina insolubili. Il distacco di FpA e FpB espone degli specifici siti di legame che rendono possibile la polimerizzazione spontanea dei monomeri di fibrina in filamenti di fibrina (protofibrille) che con l'avanzamento del processo di polimerizzazione diventano sempre più spessi e ramificati e finiscono col formare una sorta di rete.

Le interazioni tra le protofibrille sono reversibili, ma l'intervento del fattore XIII determina la stabilizzazione dei filamenti di fibrina. (Douglas & Wardrop 2010)
La fibrina concorre quindi alla riparazione dei tessuti e rappresenta una matrice chemiotattica per le cellule infiammatorie. (Murata et al. 2004)

Il fibrinogeno e la fibrina che ne deriva, oltre ad essere fondamentali per la coagulazione svolgono un ruolo di modulazione dell'infiammazione attraverso diversi meccanismi.

Il fibrinogeno si lega infatti a varie integrine e molecole di adesione, di cui la più importante sembra essere l'integrina $\alpha_M\beta_2$, recettore espresso dai monociti, la cui interazione determina l'attivazione dei monociti con conseguente incremento dei livelli di ROS e dell'espressione di citochine (TNF- α , IL-1 e IL-6) e di chemochine (MIP-1e2 e MCP-1).

Il fibrinogeno, inoltre, agendo attraverso questo recettore e altre integrine e molecole di adesione influenza la migrazione dei leucociti durante il processo infiammatorio. La molecola di adesione intercellulare ICAM-1 delle cellule endoteliali, ad esempio, è un altro importante recettore per il fibrinogeno, attraverso il loro rispettivo legame il fibrinogeno funziona da ponte di collegamento che migliora l'interazione tra leucociti ed endotelio.

L'esposizione delle cellule endoteliali alla fibrina induce invece la sintesi di IL-8 che svolge azione chemiotattica per i neutrofili e le altre cellule coinvolte nella risposta infiammatoria. (Jennewein et al. 2011)

Il fibrinogeno si comporta da APP positiva moderata a lenta reazione, con possibile ritardo di qualche giorno del suo incremento rispetto all'insulto flogistico (Gruys et al. 2005), durante la fase acuta dell'infiammazione gli epatociti ne incrementano la sintesi ed i livelli sierici aumentano gradualmente, la sua produzione si mantiene aumentata per tutta la durata del processo infiammatorio. Sebbene l'entità del suo incremento sia moderata, essendo i suoi valori basali piuttosto elevati, in termini quantitativi il fibrinogeno rappresenta la proteina maggiormente sintetizzata durante la risposta di fase acuta.

Calcoli fatti in medicina umana riportano che durante la APR vengono degradati approssimativamente 12 gr di tessuto muscolare per rendere disponibili gli aminoacidi necessari a sintetizzare 1 gr di fibrinogeno (che, come le altre APP, ha un'elevata proporzione di aminoacidi aromatici rispetto ai muscoli). (Kaneko et al. 2008)

E' però importante tenere presente che quando l'infiammazione è accompagnata da fenomeni di coagulazione e fibrinolisi, l'incremento della sintesi di fibrinogeno si associa ad un suo aumentato consumo; tale consumo (che dipende dalla conversione in fibrina) può quindi mascherare l'aumentata produzione di fibrinogeno e viceversa l'aumentata produzione che si verifica nella APR può mascherare un eccessivo consumo. (Stocham & Scott 2008)

Le rilevazioni analitiche possono così riferire valori della concentrazione plasmatica di fibrinogeno all'interno dei range di riferimento senza riflettere il reale stato infiammatorio sottostante.

1.7.2.3 Albumina

L'albumina è la proteina plasmatica più abbondante (costituisce dal 35 al 50% delle proteine plasmatiche totali) e allo stesso tempo quella con il peso molecolare più basso, 67 kDa, che nelle condizioni di pH del sangue possiede una carica elettrica fortemente negativa. Le dimensioni ridotte e la carica elettrica conferiscono all'albumina la maggiore velocità di spostamento nell'elettroforesi delle proteine sieriche, e per via del suo peso molecolare è anche la prima proteina plasmatica a passare attraverso le pareti vasali durante l'essudazione di un processo infiammatorio (Cheville 2003) e attraverso il filtro renale in seguito ad alterazioni patologiche (Aguggini et al. 2006).

Viene sintetizzata dagli epatociti ad opera del reticolo endoplasmatico rugoso, passa nell'apparato del Golgi che ne veicola la secrezione, e si riversa nei sinusoidi epatici distribuendosi poi nel circolo sistemico insieme agli altri componenti del sangue. La quantità sintetizzata giornalmente in condizioni fisiologiche è di 150-200 mg/kg di peso corporeo (Aguggini et al. 2006) ed i valori plasmatici massimi e minimi nel cane sono 2,5-4,5 g/dL (Meyer & Harvey 2007)

La secrezione di albumina, in linea generale, viene stimolata dalla riduzione della pressione osmotica (Evans 2002) del liquido interstiziale nello spazio extravascolare epatico, ma è condizionata anche da fattori ormonali (quali insulina, cortisolo e GH che ne aumentano la sintesi) (Mirici Cappa 2012) e viene significativamente influenzata dalle alterazioni fisiopatologiche che si verificano durante patologie infiammatorie di varia natura, dove la sua secrezione risulta diminuita per effetto delle citochine pro-infiammatorie IL-1, IL-6 e TNF- α , al tempo stesso responsabili dell'aumento di sintesi e rilascio della APP positive. (Kaneko et al. 2008)

L'albumina è in effetti riconosciuta come una proteina di fase acuta negativa.

Il tempo di emivita dell'albumina nel cane è di 8,2 gg (Aguggini et al. 2006; Kaneko et al. 2008).

Viene catabolizzata da tutti i tessuti metabolicamente attivi, poiché rappresenta una fonte di aminoacidi che può essere sfruttata dalle cellule per la sintesi di proteine specifiche.

La clearance dell'albumina da parte dei tessuti è in parte regolata dal peptide natriuretico atriale (ANP), ormone di origine peptidica prodotto da cellule specializzate del miocardio e coinvolto nel controllo omeostatico del volume ematico. Infatti ANP da una parte agisce a livello renale (sia inibendo il riassorbimento di Na⁺ che inibendo la secrezione di Aldosterone) provocando la diminuzione della sodiemia e l'aumento della diuresi (Aguggini et al. 2006), ma dall'altra agisce favorendo il catabolismo dell'albumina (specialmente a livello dei muscoli scheletrici) con un'azione diretta sulle cellule endoteliali, che ne altera la permeabilità a livello microvascolare ed in modo specifico per l'albumina, attraverso un meccanismo mediato dal sistema recettoriale-enzimatico costituito dal GC-A (guanilato ciclasi di tipo A) e dal GMP ciclico intracellulare come secondo messaggero. (Curry et al. 2010; Chen et al. 2012). Così quando l'albumina si riversa nello spazio interstiziale viene captata dalle cellule per pinocitosi e idrolizzata ad opera di proteasi lisosomiali.

Funzioni dell'albumina:

- *Mantenimento della pressione colloid-osmotica*

L'albumina è la proteina plasmatica più importante per il mantenimento della pressione colloid-osmotica del sangue, che dipende dal numero delle molecole presenti.

Infatti, anche se la concentrazione dell'albumina è simile alla concentrazione delle globuline, nel plasma sono presenti molte più molecole di albumina che di globuline (Meyer & Harvey 2007); la concentrazione espressa in g/dL infatti è simile semplicemente perchè l'albumina ha un peso molecolare inferiore.

Inoltre la forte carica negativa dell'albumina provoca l'attrazione e la ritenzione dei vari cationi (soprattutto del Na^+) nel comparto vascolare (effetto di Gibbs-Donnan) e lega un piccolo numero di ioni Cl^- che aumentando la sua carica negativa incrementano ulteriormente la sua capacità di trattenere ioni Na^+ all'interno del capillare.

Questo piccolo aumento della concentrazione di elettroliti nel plasma che l'albumina è in grado di determinare, accresce significativamente la sua forza osmotica (Levy et al. 2007), tanto che essa è responsabile per l'80% del mantenimento della pressione oncologica. (Kaneko et al. 2008)
- *Proteina di trasporto*

L'elevato numero di gruppi reattivi presenti nella molecola fa sì che l'albumina possa legarsi reversibilmente con svariati anioni e cationi, svolgendo così un'importante funzione di trasporto (Aguggini et al. 2006); è effettivamente in grado di interagire con molte sostanze organiche che normalmente non vengono veicolate da proteine specifiche, ad esempio cationi liberi come il calcio, il rame e lo zinco, metaboliti come la bilirubina e gli acidi grassi liberi, alcuni ormoni come la tiroxina, farmaci scarsamente solubili come FANS e digossina e numerose sostanze tossiche. (Kaneko et al. 2008; Meyer & Harvey 2006)

L'albumina inoltre si lega irreversibilmente tramite legami covalenti a glucosio e galattosio. Si tratta di un processo spontaneo di glicosilazione non enzimatica che aumenta in funzione della glicemia e che interessa anche altre proteine (ma l'albumina è quella maggiormente interessata) che nel complesso prendono il nome di fruttosamine. La glicosilazione cambia la struttura secondaria e terziaria dell'albumina alterandone le proprietà, provoca infatti una drastica riduzione della sua affinità per la bilirubina (inferiore del 50% circa rispetto all'albumina normale) mentre ne aumenta l'affinità per il ferro. (Festa et al. 2012)
- *Funzione tampone nel mantenimento dell'equilibrio acido-base*

Nella sua composizione molecolare l'albumina contiene molecole di istidina (che presenta una costante di dissociazione acida) con numerosi residui imidazolici che le consentono di cedere o di legare ioni H^+ in base ai valori di pH. Questo la rende un tampone che in condizioni di alcalosi cede cariche positive, mentre in condizioni di acidosi cede cariche negative.
- *Antiossidante*

L'albumina è costituita anche da cisteina che presenta un residuo esposto (un gruppo sulfidrico sul cys 34) con importanti funzioni antiossidanti, si comporta infatti come un avido spazzino delle specie reattive dell'ossigeno e dei radicali liberi, rendendo l'albumina il principale e predominante antiossidante presente in circolo (Anraku et al. 2001; Kaneko et al. 2008)

Durante la fase acuta di un processo infiammatorio i livelli di albumina decrescono gradualmente. Questo in piccola parte è dovuto alla migrazione extravascolare di questa proteina, conseguente all'alterata permeabilità vascolare nel focolaio flogistico ed in maggior misura alla down regulation determinata dalle citochine pro-infiammatorie sugli epatociti, con inibizione della sua sintesi epatica.

1.7.3 Leucociti Neutrofili

Come già descritto in precedenza, in seguito ad un insulto flogistico si attivano varie risposte locali con rilascio di citochine pro-infiammatorie e chemiotattiche che innescano e modulano la risposta infiammatoria locale e sistemica di fase acuta, fenomeno in cui è coinvolto il sistema immunitario aspecifico con il particolare intervento dei granulociti neutrofili.

Durante la fase acuta di una risposta infiammatoria, la cinetica dei neutrofili cambia in relazione agli effetti esercitati dai mediatori dell'infiammazione.

La vasodilatazione locale ed il rilascio di sostanze pro-infiammatorie e chemiotattiche da parte delle cellule coinvolte nel fenomeno flogistico incrementano la fuoriuscita dei neutrofili marginati dai vasi sanguigni che irrorano il focolaio flogistico (Thrall et al. 2012); e l'azione delle citochine a livello del midollo osseo provoca un immediato aumento del rilascio dei neutrofili dal pool di riserva, con conseguente aumento del pool circolante, oltre che la stimolazione ad una maggior produzione e maturazione. (Stocham & Scott 2008)

Per meglio comprendere la cinetica di queste cellule è utile analizzare la distribuzione dei neutrofili all'interno del midollo osseo oltre che nei compartimenti periferici.

Nel midollo osseo si riconoscono una componente proliferativa costituita dai mieloblasti, dai progranulociti e dai mielociti (ProNP: proliferative neutrophil pool) e una componente maturativa che comprende metamielociti, neutrofili a banda e neutrofili segmentati (MatNP: maturative neutrophil pool).

All'interno del MatNP si distingue un sottogruppo costituito dal cosiddetto pool di riserva (SNP: storage neutrophil pool) rappresentato dai neutrofili maturi, ovvero quelli segmentati, pronti per essere rilasciati nel sangue in quantità relative alle richieste dell'organismo.

I neutrofili che abbandonano il midollo si distribuiscono così tra pool circolante (CNP) e pool marginato (MNP) all'interno dei vasi sanguigni e infine migrano nel pool tissutale (TNP). (Stocham & Scott 2008)

L'infiammazione ha come conseguenze:

- aumentato spostamento dei neutrofili dal pool circolante, al pool marginato, a quello tissutale $CNP \rightarrow MNP \rightarrow TNP$, fenomeno che tende a ridurre la concentrazione dei neutrofili nel sangue periferico
- maggior rilascio di neutrofili dal pool di riserva midollare $SNP \rightarrow CNP$, che tende invece ad aumentarne la concentrazione nel sangue periferico.

E' quindi evidente che il numero di neutrofili presenti nel pool circolante è il risultato del bilancio tra consumo di neutrofili e loro rilascio midollare.

La riserva midollare di neutrofili maturi è relativamente alta nel cane (Thrall et al. 2012) e quando, in seguito al processo infiammatorio, si determina l'aumentato rilascio di neutrofili segmentati dal SNP, generalmente questo eccede la migrazione dei neutrofili nel focolaio flogistico determinando così aumento del numero assoluto di neutrofili circolanti, ovvero neutrofilia (o leucocitosi neutrofilica). (Stocham & Scott 2008)

Quando però l'estensione e la gravità del processo infiammatorio provocano un aumentato consumo di neutrofili, il SNP si riduce ed in seguito a deplezione delle riserve di neutrofili maturi il midollo comincia a rilasciare neutrofili immaturi, in genere soltanto quelli a banda, per sopperire alle richieste dell'organismo.

Tale fenomeno è conosciuto come “*left shift*” o “deviazione a sinistra” della formula leucocitaria.

Il termine *left shift* deriva dalla rappresentazione della sequenza maturativa delle cellule del sangue nello schema di Arneth, che vede a sinistra le cellule immature e a destra quelle mature.

Si parla di deviazione a sinistra rigenerativa quando il numero dei neutrofili segmentati supera quello dei neutrofili a banda, ed è associato generalmente a neutrofilia.

Mentre nella deviazione a sinistra degenerativa i neutrofili a banda superano quelli segmentati e spesso la conta neutrofilica risulta normale o ridotta. Questo pattern è generalmente associato ad un processo infiammatorio “travolgente” e/o tossiemia che determina inibizione della granulopoiesi e soppressione della maturazione, se persiste è predittiva di una prognosi infausta. (Villiers & Blackwood 2006)

Dall'inizio di un processo infiammatorio il rilascio di neutrofili da parte del SNP si verifica in poche ore, mentre l'aumentata proliferazione dei mielociti impiega 2-4 giorni prima di provocare effetti a livello del sangue periferico. (Stocham & Scott 2008)

Quindi in base all'intensità del fenomeno infiammatorio, alla sua eziologia, ma anche in base al tempo trascorso rispetto al suo inizio, nell'infiammazione si può assistere a:

- Neutrofilia con elementi maturi
- Neutrofilia con deviazione a sinistra
- Conta neutrofilica normale con deviazione a sinistra
- Neutropenia con deviazione a sinistra

dove queste variazioni apprezzabili nel sangue periferico sono associate ad uno svuotamento del SNP e talvolta anche del resto del MatNP.

Nell'infiammazione cronica, invece, il midollo ha tempo di adattarsi alla richiesta periferica di neutrofili adeguandone la produzione, questo conduce ad uno stato di iperplasia granulocitica, per cui dopo 5 giorni si assiste a neutrofilia associata all'aumento di tutti i pools midollari della linea granulocitaria neutrofila.

(Stocham & Scott 2008)

1.7.4 Sideremia

Il ferro è presente in vari parenchimi dell'organismo sottoforma di diversi composti chimici.

Il sangue è il compartimento che contiene la quota più elevata di questo metallo.

A seconda del suo stato chimico e dei relativi significati biologici si possono distinguere tre forme di ferro:

1. Ferro attivo
2. Ferro di riserva
3. Ferro di trasporto

1. Il ferro attivo lo si può a sua volta suddividere in tre sottocategorie:

- Ferro emoglobinico:
legato all'emoglobina di eritrociti ed eritroblasti, costituisce il 60-70% del ferro totale.

- Ferro mioglobinico:
legato alla mioglobina, rappresenta circa il 3% del ferro totale.
- Ferro enzimatico:
impiegato nei catalizzatori cellulari, costituisce circa l'1% del ferro totale.

2. Il ferro di riserva è quello immagazzinato nei diversi parenchimi (midollo osseo, fegato e milza) sotto forma di ferritina o di emosiderina e rappresenta il 20-30% del ferro totale.

3. Il ferro di trasporto è infine quello presente nel siero legato alle molecole di trasporto e rappresenta lo 0,1% del ferro totale.

Compare in due stati di ossidazione: ferroso (Fe^{+2}) e ferrico (Fe^{+3}) che possono rispettivamente donare o accettare elettroni.

Il ferro di trasporto e quello di riserva si trovano tipicamente nello stato Fe^{+3} , ma per poter attraversare le membrane cellulari deve passare allo stato Fe^{+2} . Nella forma attiva legata all'emoglobina passa invece da uno stato all'altro in relazione al suo legame con l'ossigeno.

E' proprio questa capacità del ferro di variare il proprio stato ossidativo ed il suo potenziale redox a seconda dei legami che forma, che gli permette di svolgere numerose funzioni.

Il ferro è essenziale per:

- il trasporto dell'ossigeno: il ferro contenuto nel gruppo eme dell'emoglobina lega l'ossigeno ossidandosi da Fe^{2+} a Fe^{3+} e quando deve rilasciarlo ai tessuti si riduce nuovamente a Fe^{2+} ;
- per la respirazione cellulare: si trova infatti nei citocromi a,b,c deputati alla fosforilazione ossidativa nei mitocondri e nei centri Fe-S (proteine di vario tipo) che sono i trasportatori di elettroni più rappresentati;
- è coinvolto nella sintesi del DNA,
- nel ciclo dell'acido citrico, dove circa metà degli enzimi coinvolti in questa reazione contengono ferro o necessitano di questo metallo come cofattore
- e in varie reazioni enzimatiche.

Il ciclo del ferro all'interno del corpo è un sistema quasi chiuso perché le perdite di ferro sono molto limitate negli animali domestici, salvo che in condizioni patologiche caratterizzate da emorragie.

Una piccola quota del ferro fornito attraverso la dieta è assorbita nel piccolo intestino e trasferita poi nel plasma, dove viene legato dalle proteine di trasporto per veicolarlo attraverso la circolazione sanguigna ai vari distretti corporei.

Circa il 75% del ferro presente nel plasma sarà trasportato al midollo osseo per incorporarlo all'emoglobina degli eritrociti in via di sviluppo, mentre il rimanente ferro plasmatico sarà captato dagli altri tessuti, soprattutto dal fegato.

Quando gli eritrociti senescenti subiscono l'emocateresi e quindi vengono fagocitati, l'emoglobina viene degradata all'interno dei macrofagi e da questo processo viene liberato il ferro emoglobinico che può così essere nuovamente utilizzato.

Una parte di questo ferro "recuperato" viene liberata subito e resa così immediatamente disponibile per il sangue (l'emivita di questa quota di ferro è di 34 minuti nel cane), mentre il resto del ferro viene immagazzinato all'interno dei macrofagi sotto forma di ferritina o di emosiderina per essere poi rilasciato nel sangue più lentamente (l'emivita di questa quota di ferro è di 7 giorni).

Di fatti la maggior parte del ferro che entra nel plasma quotidianamente è quello che deriva dal rilascio dei macrofagi, mentre il ferro assorbito dal piccolo intestino (che è una piccola quantità) serve a compensare le limitate perdite che avvengono attraverso l'esfoliazione dell'epidermide, le cellule di desquamazione delle mucose, la bile, il sudore e le feci. (Kaneko et al. 2008)

Il ferro circolante nel siero in condizioni fisiologiche è associato alle proteine di trasporto, tale legame è necessario perché se fosse libero, al fisiologico pH e tensione di ossigeno del sangue, il ferro darebbe luogo a reazioni ossidative con formazione di radicali liberi e perossidi.

L'apotransferrina è una glicoproteina sintetizzata dal fegato, di circa 80 kDa, che contiene due siti di legame per il ferro che può legare in forma Fe^{+3} a pH neutro, ma se il pH scende a 5.5 l'ione viene dissociato poiché per ogni Fe^{+3} è necessario il concomitante legame di un anione di bicarbonato. L'apotransferrina legata al ferro diventa transferrina, che è la principale forma di trasporto di questo metallo nel sangue. Nello specifico, quando solo uno dei siti di legami viene occupato dal ferro si parla di transferrina monoferrica, se invece vengono occupati entrambi si parla di transferrina diferrica.

In base alla concentrazione di ferro nel plasma variano i livelli di apotransferrina, transferrina monoferrica e transferrina diferrica, con una predominanza della prima se i livelli di ferro sono bassi ed una predominanza dell'ultima se invece i livelli di ferro sono elevati, la proporzione delle tre molecole dipende quindi dalla percentuale di saturazione della transferrina con il ferro e la transferrina monoferrica è predominante quando la saturazione della transferrina è al 50%.

(Kaneko et al. 2008)

Altre molecole possono svolgere la funzione di trasporto e per indicare la quota di ferro legato ad esse si utilizza la sigla NTBI (non-transferrin bound iron).

Una di queste molecole è la ferritina (Chikazawa, Nakazawa, et al. 2013) che viene rilasciata in piccole quantità dai macrofagi e può essere captata tal quale dalle cellule (in particolare dagli epatociti), ma in normali condizioni rappresenta una proteina di trasporto di importanza minore.

La presenza di NTBI è in effetti normalmente molto bassa, tuttavia può aumentare quando la quantità di ferro presente nel siero supera la capacità di saturazione della transferrina (Kaneko et al. 2008) oppure in corso di infiammazione acuta, poiché la ferritina rappresenta una proteina di fase acuta positiva e subisce un leggero incremento nelle fasi iniziali dell'infiammazione con meccanismi ancora non del tutto chiariti. (Chikazawa, Nakazawa, et al. 2013)

Il ferro sierico viene quindi generalmente valutato misurando la transferrina, dato che in condizioni fisiologiche la quota di NTBI risulta pressoché insignificante, oppure andando a misurare direttamente il ferro totale presente nel siero (valore in cui saranno compresi sia il ferro legato alla transferrina che quello NTBI).

Come anticipato precedentemente l'omeostasi del ferro è essenzialmente un sistema chiuso.

Le perdite avvengono tramite meccanismi aspecifici, come la desquamazione cellulare, e non esistendo meccanismi specifici di escrezione del ferro né a livello epatico né a livello renale, l'equilibrio del ferro è controllato principalmente attraverso la sua assimilazione intestinale.

I meccanismi regolatori dell'assorbimento del ferro sono:

- “Regolatore della dieta”:

L'assorbimento intestinale è influenzato dalla quantità di ferro apportato con la dieta ed in particolare diete ricche di ferro inducono un minore assorbimento di ferro per un fenomeno descritto come “blocco mucosale”.

- “Regolatore dei depositi”:

controlla la captazione del ferro in funzione delle sue fluttuazioni all'interno dell'organismo; in condizioni di carenza di ferro corporeo il suo assorbimento intestinale aumenta fin quando i depositi di ferro non sono ripristinati.

- “Regolatore eritropoietico”:

modula l'assorbimento di ferro in base alle esigenze dell'eritropoiesi; questo tipo di controllo è dominante rispetto agli altri, tanto che permette un aumentato assorbimento indipendentemente dai livelli di deposito.

- “Regolatore dell'ipossia umorale”:

induce l'aumento dell'assorbimento di ferro a fronte di stati di ipossia acuta; non è ancora stato chiarito se questo meccanismo sia realmente distinto da quello eritropoietico.

- “Regolatore infiammatorio”:

induce la riduzione dell'assorbimento di ferro in corso di infezione e/o infiammazione oltre che la ritenzione dei suoi depositi cellulari; l'ipotesi è che si tratti di un meccanismo difensivo per limitare la proliferazione dei microorganismi patogeni che necessitano di ferro per il loro metabolismo.

(McCown & Specht 2011)

L'impegno, da parte dell'organismo ospite, di sottrarre il ferro che altrimenti sarebbe disponibile per i microrganismi patogeni, avviene anche localmente a livello del focolaio infiammatorio attraverso la lattoferrina, una proteina legante il ferro la cui affinità per questo metallo aumenta in ambiente acido (contrariamente a quanto avviene per le altre proteine di trasporto). La lattoferrina è rilasciata nel focolaio flogistico dai leucociti polimorfonucleati e si rivela una proteina efficiente per il recupero del ferro presente nei focolai infiammatori dove il pH scende in seguito all'azione difensiva dei leucociti ed al metabolismo dei microrganismi. (Jurado 1997)

Nei meccanismi di regolazione della concentrazione sierica di ferro è coinvolta l'epcidina, ormone peptidico prodotto dal fegato, la cui sintesi è influenzata dagli stessi fattori che regolano l'omeostasi del ferro. L'epcidina in condizioni fisiologiche esercita un controllo a feedback negativo sul ferro limitandone quindi l'eccessiva assunzione e/o rilascio dai depositi di riserva.

Nello specifico essa agisce sul DMT1, Divalent Metal Transporter 1, molecola di trasporto transmembrana degli enterociti e sulla ferroportina, proteina transmembrana che esporta il ferro dalla cellula verso l'esterno (l'unica attualmente conosciuta). (McCown & Specht 2011)

In corso di patologie infiammatorie e/o infettive si verifica un aumento dell'espressione di epcidina che dipende dall'azione delle citochine pro-infiammatorie, in particolare dell'IL-6; si verifica così un'inibizione dell'assorbimento intestinale e del rilascio di ferro dai depositi che sfugge agli altri sistemi regolatori.

Oltre a questo (in medicina umana) è stato osservato che l'IL 10 provoca un aumento dell'espressione di recettori per la transferrina sui macrofagi, fenomeno che si concretizza con una aumentata captazione di ferro all'interno delle cellule mediante endocitosi.

TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-10 influenzano inoltre il metabolismo dei macrofagi incrementando la sintesi di ferritina con un meccanismo di up-regulation e favorendo così l'immagazzinamento intracellulare (e la ritenzione) del ferro presente nell'organismo.

L'insieme di questi effetti conduce ad una deficienza relativa di ferro che in fase acuta determina un rapido abbassamento della sideremia e, se il processo infiammatorio si protrae, porta alla comparsa di anemia ipocromica da infiammazione dovuta alla mancanza di ferro disponibile per l'eritropoiesi.

2 MARKER EMATOBIOCHIMICI DELLA FLOGOSI ACUTA

2.1 Cos'è un Biomarker

Per definizione i biomarker sono caratteristiche oggettivamente misurabili che possono essere valutate come indicatori di uno stato fisiologico o patologico di un organismo biologico, o della sua risposta ad interventi terapeutici farmacologici.

I biomarker comprendono le risposte funzionali dell'organismo, rilevabili come segni clinici misurabili in modo oggettivo e ripetibile durante un esame obiettivo generale (temperatura corporea, frequenza cardiaca, pressione sanguigna) e le variazioni delle concentrazioni cellulari e molecolari rinvenibili nel sangue o in altri campioni biologici in seguito ad analisi di laboratorio.

I biomarker forniscono quindi informazioni circa lo stato di salute del paziente, in quanto ritenuti espressione di una determinata condizione o di malattia e possono essere utilizzati da soli oppure, più frequentemente, in associazione per poter meglio inquadrare la situazione clinica del paziente. (Strimbu & Tavel 2011)

Un biomarker, potenzialmente, può quindi essere utilizzato per:

- formulare una diagnosi,
- monitorare l'andamento di processi fisiologici e patologici,
- stabilire lo stadio o la gravità di una patologia consentendo la formulazione di una prognosi,
- monitorare le risposte dell'organismo a terapie mediche o chirurgiche.

I segni clinici, che hanno una lunga storia di utilizzo nella pratica medica, nel tempo sono stati sempre più affiancati da altri indicatori biologici con lo scopo di aumentare la sensibilità e la specificità nell'individuare un determinato stato fisiologico o patologico.

Ovviamente in base alla tipologia di marker, alcuni risultano di facile misurazione e sono quindi ampiamente impiegati nella pratica clinica di routine, mentre altri necessitano di procedure più complesse che richiedono talvolta l'appoggio a laboratori esterni più o meno specializzati e comportano costi maggiori.

Ad ogni modo le caratteristiche ideali di un buon biomarker sono: correlazione specifica con la malattia in atto, elevata sensibilità nel rilevare precocemente uno stato patologico, adeguata predittività sulla risposta del paziente al trattamento, possibilità di essere misurato attraverso metodiche semplici e rapide, accuratezza della sua determinazione da parte di queste metodiche, ridotta interferenza da parte di errori preanalitici.

2.2 Biomarker Infiammatori

Per quanto riguarda le patologie infiammatorie, i marker caratteristicamente associati ad esse sono:

- febbre
- leucocitosi neutrofilica
- variazione delle proteine di fase acuta positive e negative
- riduzione dei livelli sierici di ferro

Nell'interpretazione clinica di questi dati è però estremamente importante tenere presente tutti i possibili fattori in grado di influenzarne l'espressione, come processi morbosi concomitanti o terapie farmacologiche, che possono alterare la temperatura corporea o la concentrazione dei marker ematologici normalmente presenti in corso di una risposta di fase acuta (APR).

A titolo di esempio:

- in pazienti debilitati o cachettici la risposta febbrile può essere mascherata da una sottostante condizione di ipotermia;
- alcune patologie sono caratterizzate da febbre intermittente o ondulante, per cui se la temperatura del cane non è costantemente monitorata può capitare che durante la visita clinica il paziente risulti avere una temperatura corporea normale,
- in caso di una risposta inefficace del sistema immunitario aspecifico, con tossicità neutrofilica e/o deviazione a sinistra degenerativa, la sola conta leucocitaria può risultare insufficiente a rilevare uno stato patologico poiché può segnalare un numero normale di cellule;
- in pazienti con mielosoppressione (da agenti di vario tipo, come infezioni virali, neoplasie, agenti tossici o chemioterapici) il midollo osseo non può rispondere adeguatamente agli stimoli infiammatori e infettivi;
- l'aumento dell'aptoglobina può non essere apparente se è presente un concomitante processo emolitico, come l'aumento della sintesi di fibrinogeno può essere mascherato da una coagulazione intravasale disseminata;
- in caso di insufficienza epatica la sintesi proteica è fortemente compromessa e quindi non si assiste al tipico incremento delle APPs positive;
- terapie corticosteroidi alterano significativamente la conta e la formula leucocitaria, la concentrazione plasmatica di ferro e la sintesi di fibrinogeno;

E', inoltre, importante conoscere le caratteristiche cinetiche dei vari marker ematologici, quindi i relativi tempi necessari a rilevarne delle modificazioni, la loro persistenza e la loro sensibilità per poter interpretare al meglio i risultati delle analisi di laboratorio.

Le APPs, in linea generale, hanno dimostrato una sensibilità diagnostica più elevata della conta leucocitaria (WBCc), la ceruloplasmina e l'aptoglobina ad esempio si sono dimostrate sei volte più sensibili della WBCc nella segnalazione di un processo infiammatorio ed il loro incremento si manifesta anche in quei casi in cui la WBCc rimane inalterata (Solter et al., 1991).

In virtù delle loro differenti caratteristiche, la misurazione contemporanea di più APPs piuttosto che di una sola può fornire maggiori informazioni. In particolare risulta utile comparare almeno una APP maggiore (come la CRP o la SAA) con almeno una APP

moderata (come il fibrinogeno, l'aptoglobina o la ceruloplasmina) ed una negativa (albumina, transferrina). (Ceron et al. 2005)

La combinazione delle diverse tipologie di APPs, come anche la loro comparazione con gli altri marker di flogosi, è consigliata per migliorare l'inquadramento del caso clinico, distinguendo ad esempio un'infezione acuta da una cronica o aumentare le possibilità di discriminare tra stati patologici differenti. (Ceron et al. 2005)

2.3 Conta leucocitaria e formula leucocitaria

Nella progressione delle indagini diagnostiche con ricorso agli esami complementari è molto importante comprendere sempre un esame emocromocitometrico completo ottenuto da campioni di sangue in EDTA. Da esso sarà possibile ottenere una valutazione del patrimonio leucocitario circolante mediante la conta totale, la formula leucocitaria e la valutazione microscopica dello striscio ematico.

La maggior parte degli analizzatori utilizzabili a livello ambulatoriale fornisce risultati attendibili per quanto riguarda la conta totale di leucociti, ma per quanto riguarda la formula leucocitaria risultano spesso poco affidabili; è quindi molto importante verificare sempre la formula automatizzata con quella eseguita manualmente mediante analisi microscopica dello striscio ematico, dove è necessario valutare almeno 100 cellule della linea bianca (maggiore è il numero di cellule valutate maggiore è l'affidabilità della formula).

La formula leucocitaria è la determinazione percentuale dei diversi tipi cellulari appartenenti alla serie bianca, dalla quale è possibile ricavarne i valori assoluti (quindi una stima piuttosto realistica del numero di cellule per unità di sangue) con i quali si può stabilire se la concentrazione di una linea risulta normale, aumentata o diminuita rispetto ai normali intervalli di riferimento.

La valutazione dello striscio ematico è inoltre estremamente importante per osservare la morfologia degli elementi corpuscolati del sangue con particolare riferimento, in questo caso, alla valutazione morfologica dei leucociti; permette infatti di rilevare la presenza di elementi immaturi (ad esempio di neutrofili a banda, metamielociti ecc.), segni di attivazione cellulare (specialmente nei monociti o nei linfociti) e di eventuali segni di tossicità o di degenerazione neutrofilica (corpi di Döhle, schiumosità citoplasmatica, rigonfiamento cellulare ecc.), aspetti molto importanti per una corretta interpretazione dei risultati.

In corso di infiammazione gli elementi classicamente considerati come marker di flogosi acuta sono:

- Neutrofilia
- Deviazione a sinistra
- (Neutrofili tossici)

2.3.1 Neutrofilia

Nel cane gli intervalli di riferimento per la conta totale di WBC si aggirano attorno a valori di 6-18 mila cellule/ μ L di sangue, variabili da laboratorio a laboratorio, ed il range considerato normale per il numero di granulociti neutrofili è indicativamente 3-11 mila cellule/ μ L di sangue (anche per questo in realtà ogni laboratorio stabilisce i propri intervalli di riferimento).

In corso di un processo infiammatorio è ritenuto comune un incremento del numero di neutrofili compreso in un range di 12-30 mila cellule/ μL di sangue; occasionalmente la neutrofilia può raggiungere valori compresi tra 30-60 mila cellule per μL di sangue. (Stocham & Scott 2008)

In relazione all'entità della neutrofilia il numero totale di WBC può rimanere entro l'intervallo di riferimento oppure risultare aumentato.

Certe patologie infiammatorie sono più soggette di altre a determinare neutrofilia, ad esempio quelle che interessano i tessuti sottocutanei, il tratto respiratorio, il pancreas, il peritoneo, le cavità pleuriche, l'utero, il fegato o l'intestino, poiché da queste sedi i mediatori infiammatori possono raggiungere facilmente la circolazione sistemica.

Mentre i processi infiammatori che interessano le strutture cerebrali, il midollo spinale, le lesioni cutanee superficiali o le infiammazioni delle basse vie urinarie possono non dare neutrofilia.

Nei primi due casi perché i mediatori infiammatori rimangono confinati nell'ambiente protetto dalla barriera ematoencefalica, invece negli ultimi due perché i mediatori vengono facilmente persi o allontanati dagli essudati che si liberano verso l'esterno della lesione o diluiti e dispersi con le urine. (Stocham & Scott 2008)

2.3.2 Deviazione a sinistra

I neutrofili a banda hanno dimensioni simili alle cellule mature (10-15 μm di diametro) ma presentano un nucleo poco indentato a forma di U con braccia quasi parallele e la loro cromatina è meno condensata, per cui il nucleo si colora meno intensamente rispetto ai neutrofili maturi.

Un limitato numero di neutrofili a banda può essere rilevato anche in condizioni fisiologiche.

Ancora non esiste un limite numerico universalmente accettato per stabilire la presenza di una deviazione a sinistra significativa, ma solitamente viene utilizzato come riferimento un limite di 1000 neutrofili a banda per μL (Villiers & Blackwood 2005).

L'aumento di neutrofili a banda è suggestivo di un'attiva risposta flogistica (la cui eziologia può essere di vario tipo, dall'infezione, al danno tissutale con necrosi, alla neoplasia o alle malattie immunomediate), dal momento che questa compare in relazione all'aumentato consumo di neutrofili (sia come quantità che come rapidità con cui questo consumo avviene) richiamati dal sangue nella sede di infiammazione.

Come descritto nel capitolo precedente, la deviazione a sinistra può essere rigenerativa o degenerativa in relazione al numero di elementi immaturi rispetto a quelli maturi. La determinazione del tipo di deviazione rappresenta un dato di importante valore prognostico, in particolare per la deviazione a sinistra degenerativa che è considerata un segno prognostico negativo.

L'estensione e la sede del processo infiammatorio, oltre che la sua eziologia, influenzano ovviamente in modo significativo la cinetica dei neutrofili e quindi la comparsa di neutrofilia più o meno marcata e di deviazione a sinistra rigenerativa o degenerativa.

Una ferita da morso che interessi i tessuti sottocutanei provocherà ad esempio una neutrofilia da leggera a moderata con variabile deviazione a sinistra. Mentre in caso di perforazione intestinale e conseguente peritonite acuta, si determinerà un consumo di neutrofili nettamente maggiore che potrebbe con molta probabilità superare la capacità del MatNP, in questo caso si avrà una deviazione a sinistra associata a valori apparentemente normali dei neutrofili o a neutropenia.

2.3.3 Neutrofilii Tossici

A fronte di un'aumentata richiesta di neutrofilii a livello periferico il tempo di maturazione midollare può ridursi determinando la comparsa (oltre che di forme immature) di alterazioni tossiche, questo avviene caratteristicamente in corso di gravi infezioni batteriche e di anemia emolitica immunomediata.

I segni di tossicità neutrofilica sono riconoscibili come alterazioni morfologiche che comprendono: presenza dei corpi di Döhle (inclusioni citoplasmatiche di colore grigio-bluastro costituite da aggregati di reticolo endoplasmatico), aumentata basofilia citoplasmatica (perché risulta aumentato l'RNA citoplasmatico), vacuolizzazioni citoplasmatiche causate dalla degranolazione e dalla perdita di integrità delle membrane durante l'alterata maturazione, rigonfiamento nucleare e nuclei ad anello (che esprimono alterazioni particolarmente gravi del processo di maturazione).

La presenza di queste anomalie, oltre a essere associata alla presenza di processi infiammatori acuti, rappresenta spesso un segno prognostico negativo. In particolare, è stata osservata una correlazione positiva tra la severità delle manifestazioni tossiche, la presenza di neutropenia e la prevalenza di decessi (Aroch et al. 2005).

E' da tenere presente che alterazioni tossiche si riscontrano anche in seguito all'assunzione di alcuni farmaci e tossine, non sono pertanto strettamente legate alla presenza di processi infiammatori acuti.

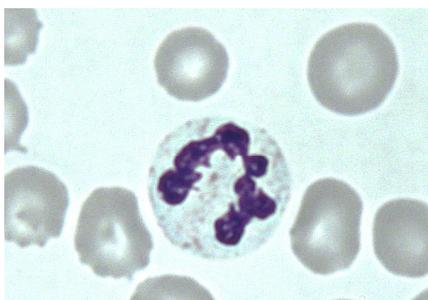


Figura 2.3.3 - Neutrofilo tossico. Foto scattata presso il laboratorio di Patologia Clinica Veterinaria dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato", Università di Pisa.

2.3.4 Monociti attivati

Sebbene questa alterazione non sia classicamente considerata come indicatore di flogosi, la presenza di monociti attivati nel sangue periferico rappresenta, in teoria, una forma di attivazione del sistema macrofagico piuttosto importante.

Infatti la trasformazione dei monociti in macrofagi normalmente avviene a livello tissutale. In seguito a processi infiammatori, soprattutto di origine infettiva, si può invece assistere alla comparsa di macrofagi circolanti che sono generalmente identificati come "monociti attivati". Si riconoscono facilmente per le grandi dimensioni e la presenza di abbondanti vacuoli citoplasmatici su uno sfondo citoplasmatico basofilo.



Figura 2.3.4 – Monocita attivato. Foto scattata presso il laboratorio di Patologia Clinica Veterinaria dell’Ospedale Didattico Veterinario “Mario Modenato”, Università di Pisa.

2.3.5 Linfociti reattivi

La presenza di una piccola percentuale di linfociti reattivi nel sangue periferico è considerata normale, tuttavia le modificazioni morfologiche e funzionali di queste cellule sono ritenute associate a una stimolazione immunitaria sistemica, perciò un loro aumento percentuale nella popolazione linfocitaria può indicare uno stato di flogosi.

I linfociti reattivi possono essere di vari tipi. Spesso sono contraddistinti da un maggior volume citoplasmatico con una colorazione intensamente basofila dovuta all’aumentata presenza di poliribosomi (associata a incremento delle sintesi proteiche).

Quando il fenomeno reattivo da parte della popolazione linfocitaria è intenso e protratto, si può assistere alla comparsa di forme reattive plasmocitoidi caratterizzate da maggiori dimensioni cellulari, basofilia citoplasmatica e presenza di una zona perinucleare più chiara (che rappresenta l’apparato del Golgi).

Si possono inoltre trovare i linfociti granulari, contraddistinti dalla presenza di granulazioni eosinofile all’interno del proprio citoplasma, spesso raggruppate in un’unica regione perinucleare.

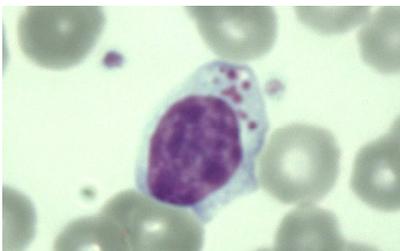


Figura 2.3.5 – Linfocita reattivo con granulazioni citoplasmatiche. Foto scattata presso il laboratorio di Patologia Clinica Veterinaria dell’Ospedale Didattico Veterinario “Mario Modenato”, Università di Pisa.

2.3.6 Vari leucogrammi rilevabili in corso di infiammazione

- **Neutropenia infiammatoria**

Sebbene il classico marcatore di infiammazione sia la neutrofilia (con eventuale deviazione a sinistra) è da ricordare che in base alla gravità del processo infiammatorio e talvolta anche del momento in cui vengono eseguite le analisi rispetto all’insorgenza della patologia, possono emergere pattern differenti.

Considerando ad esempio che i neutrofili rispondono entro poche ore accorrendo nel sito di flogosi, mentre la risposta midollare impiega più tempo, inizialmente si può riscontrare una neutropenia transitoria. Il momento in cui viene effettuato il prelievo di sangue rispetto all’evento lesivo (quando evidente e noto) deve essere dunque valutato

per meglio distinguere questo fenomeno da una risposta inefficace e degenerativa del sistema immunitario (normalmente associata a deviazione a sinistra degenerativa).

- **Neutrofilia infiammatoria acuta**

Entro 6-8 ore dallo stimolo infiammatorio il midollo osseo risponde accelerando il rilascio di neutrofili ed incrementandone la produzione, effetto quest'ultimo che si rende evidente a livello del sangue periferico 2-4 giorni dopo l'insulto flogistico.

Il leucogramma infiammatorio acuto è generalmente caratterizzato da neutrofilia che può essere accompagnata da deviazione a sinistra più o meno marcata in relazione alla gravità del processo infiammatorio, con possibile comparsa di alterazioni tossiche dei neutrofili.

Talvolta si può sovrapporre un leucogramma da stress con linfopenia ed eosinopenia. (Douglas & Wardrop 2010)

In caso di deviazione a sinistra degenerativa si può tuttavia presentare una conta neutrofilica normale o ridotta.

Neutrofilia infiammatoria cronica

Quando il processo infiammatorio si protrae, compaiono alterazioni nel midollo osseo caratteristiche con espansione di ProNP, MatNP e SNP, per soddisfare la domanda periferica di neutrofili. Si assiste quindi ad una neutrofilia generalmente matura (se presente una deviazione a sinistra risulta comunque modesta) e spesso si associa un aumento del numero di monociti, sebbene le alterazioni a carico delle altre linee leucocitarie risultino piuttosto variabili.

- **Risposta leucemoide**

Rappresenta una forma di infiammazione cronica con risposta prorompente del midollo osseo, che induce una neutrofilia marcata (50-100 mila neutrofili/ μ L) caratterizzata dalla concomitante presenza di forme immature che si può estendere fino agli stadi di mielociti e promielociti.

2.3.7 Leucogrammi non infiammatori

- **Neutrofilia da adrenalina**

Si tratta in realtà di una "pseudo-neutrofilia" fisiologica e transitoria che si determina in seguito a rilascio di adrenalina per paura, forte eccitazione o in seguito ad esercizio fisico molto intenso. L'adrenalina determina infatti lo spostamento dei neutrofili marginati nel pool circolante, che è quello dal quale vengono poi quantificati i neutrofili con gli esami eseguiti sul campione di sangue. E' quindi un aumento relativo del CNP rispetto al MNP, senza l'effettivo incremento del numero totale di neutrofili.

Si verifica entro pochi minuti dall'evento scatenante e dura 20-30 minuti; generalmente nel cane provoca una neutrofilia apparente lieve o moderata (nel gatto è molto più evidente poichè il rapporto CNP/MNP è 1/3) con neutrofili maturi. Può essere associata a linfocitosi.

Tale fenomeno si riscontra prevalentemente nei cuccioli mentre è piuttosto raro da rilevare nei soggetti adulti.

➤ **Neutrofilia da stress o da corticosteroidi**

Il cortisolo endogeno come i corticosteroidi esogeni determinano un aumento del numero di neutrofili nel sangue sia per incrementato rilascio dal SNP midollare (neutrofilia vera), che per riduzione della loro capacità di adesione all'endotelio vasale e conseguente ridotta migrazione dei neutrofili nel TNP. Ne deriva una neutrofilia caratterizzata da cellule mature e talvolta (specialmente in seguito a trattamenti corticosteroidi a lungo termine) con presenza di neutrofili ipersegmentati.

In questo tipo di neutrofilia si associa tipicamente la riduzione del numero di linfociti e di eosinofili, in un quadro ematologico definito come “leucogramma da stress”.

In seguito a trattamento corticosteroidi la neutrofilia si sviluppa entro 4-12 ore dalla somministrazione del farmaco per ritornare ai valori basali circa 24 ore dopo (Willard & Tvedten 2012)

➤ **Leucemia granulocitica cronica**

Patologia neoplastica midollare caratterizzata a livello ematologico da un'imponente neutrofilia per lo più matura, il numero di neutrofili si muove in un ampio range compreso tra 50 e 160 mila cellule/ μ L di sangue.

2.3.8 WBC e valutazione dei neutrofili come marker di infiammazione

Per poter effettuare una valutazione corretta delle informazioni riguardanti il patrimonio leucocitario del paziente è quindi importante che l'esame emocromocitometrico sia sempre accompagnato dalla valutazione dello striscio ematico, si devono conoscere i diversi leucogrammi ed i relativi significati clinici per essere in grado di distinguere quelli indicativi di infiammazione e poterne valutare, indicativamente, la gravità. La sola valutazione strumentale può infatti essere insufficiente se non addirittura fuorviante in certe situazioni.

I limiti della valutazione dei neutrofili come marker di infiammazione rimangono:

- sensibilità relativamente bassa, specialmente quando le patologie infiammatorie riguardano: encefalo, midollo spinale, cute e basse vie urinarie;
- bassa specificità, poiché i neutrofili partecipano anche ai processi riparativi il loro numero può rimanere aumentato per tempi variabili anche quando lo stimolo flogogeno è scomparso e la risposta di fase acuta si è esaurita,
- cinetica leucocitaria fortemente influenzata dai trattamenti corticosteroidi e dai corticosteroidi endogeni rilasciati in caso di stress o di iperadrenocorticismi,
- inoltre varie condizioni patologiche alterano fortemente la risposta del midollo osseo o la sopprimono del tutto:
 - infezioni virali come la parvovirus canina,
 - sindromi mielodisplastiche,
 - leucemie acute,
 - terapie con farmaci citotossici o reazioni idiosincrasiche a farmaci di vario tipo...

2.4 Proteine di fase acuta

Le proteine di fase acuta vengono prevalentemente sintetizzate dal fegato in risposta alle citochine infiammatorie e i cambiamenti a carico delle loro concentrazioni plasmatiche cominciano poche ore dopo l'esposizione dell'organismo ad un insulto flogistico capace di evocare una APR.

Per poter misurare le proteine plasmatiche presenti in un campione di sangue è necessario separare la parte fluida da quella corpuscolata, procedura che viene fatta in laboratorio mediante centrifugazione del campione.

Se il sangue, appena prelevato, viene messo in una provetta con anticoagulante si otterrà da esso il plasma; se invece viene messo in una provetta senza anticoagulante lo si lascerà prima coagulare e poi verrà centrifugato per ottenere il siero, che è la parte fluida del sangue privata del fibrinogeno (che è stato consumato per la coagulazione).

Le proteine di fase acuta sono numerose e solitamente vengono misurate solo alcune di esse, scelte sulla base di diversi fattori tra cui anche la semplicità di misurazione ed i relativi costi.

Si può anche decidere di monitorare una sola APP, ma dato che le diverse APPs (che nel complesso fanno tutte parte della risposta di fase acuta dell'organismo ad un processo infiammatorio) presentano differenze significative sia per quanto riguarda la misura delle variazioni nei relativi livelli plasmatici rispetto ai valori basali, sia per quanto riguarda la velocità con cui queste variazioni si realizzano e la loro persistenza, la misurazione di diverse proteine contemporaneamente fornisce maggiori informazioni contribuendo a delineare un quadro clinico più dettagliato. (Ceron et al. 2005)

Il confronto delle risposte di diverse APPs potenzialmente può aiutare il clinico a distinguere tra stati patologici diversi ed apporta maggiori informazioni riguardo l'evoluzione temporale della patologia.

A questo proposito un profilo “tipo” di APPs dovrebbe prevedere almeno

- a) 1 APPs principale,
- b) 1 APPs moderata,
- c) 1 APPs negativa.

2.4.1 APPs principali

Le proteine di fase acuta positive considerate principali sono quelle caratterizzate da una concentrazione sierica basale estremamente bassa ($< 0.1\mu\text{g/dL}$) il cui incremento, in corso di infiammazione, varia molto e rapidamente, in un range generalmente compreso tra 100 e 1000 volte la loro concentrazione basale. Nel cane le APPs principali sono la SAA e la CRP.

Esistono molti studi che hanno messo in comparazione queste due proteine per testarne la sensibilità e la specificità come marker della flogosi acuta, ma i risultati non sono sempre concordanti.

Diversi autori avevano concluso che la CRP fosse un marker di flogosi migliore rispetto alla SAA, sia per la maggior risposta evidenziata in corso di varie patologie, sia per la rapidità con cui le sue concentrazioni sieriche diminuivano in seguito al trattamento della patologia, per cui la riduzione della CRP corrispondeva con gli effettivi miglioramenti clinici dei pazienti e risultava un marker prognostico più precoce della

SAA (Jergens et al. 2003; Martínez-Subiela et al. 2003; Tecles et al. 2005; Dąbrowski et al. 2009), mentre uno studio del 2011 rilevava che SAA aumentava in modo più marcato rispetto alla CRP in cani infettati sperimentalmente con *Leishmania infantum*, sebbene la risposta di CRP risultasse comunque significativa (Martinez-Subiela et al. 2011) ed altri autori, in seguito ad uno studio retrospettivo che confrontava il comportamento delle due APPs in corso di varie patologie suddivise in 6 gruppi più il gruppo di controllo, avevano invece concluso che SAA fosse più sensibile nel segnalare la presenza di processi infiammatori sistemici rispetto alla CRP, poichè quest'ultima in diversi casi aveva subito incrementi modesti rimanendo su valori al limite di decisione clinica (Christensen et al. 2014). Un lavoro del 2012 che indagava il comportamento di alcune APPs in pazienti canini con due tipi di neoplasie, mastocitomi o sarcomi (questo gruppo riuniva casi di fibrosarcoma, sarcoma dei tessuti molli, emangiosarcoma, condrosarcoma, osteosarcoma, istiocitosi maligna e sarcoma scarsamente differenziato) era risultato che SAA non mostrava in nessun caso incrementi significativi dei suoi livelli sierici rispetto al gruppo di controllo, mentre la concentrazione di CRP era sempre significativamente maggiore sia nei pazienti affetti da mastocitoma che in quelli affetti da sarcoma, rispetto al gruppo di controllo. (Chase et al., 2012)

Ad ogni modo, CRP e SAA, sono entrambe considerate validi marker diagnostici di infiammazione sebbene non infallibili. La loro capacità diagnostica nel complesso può essere considerata sovrapponibile e le concentrazioni di tali proteine sono generalmente in accordo con l'evoluzione e l'espressione clinica delle malattie. (Christensen et al. 2014).

2.4.2 CRP - Proteina C Reattiva

2.4.2.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici

La CRP viene generalmente misurata utilizzando metodi immunologici, utilizzando anticorpi specifici per la CRP umana che cross-reagiscono con quella canina, oppure anticorpi specifici per la CRP canina. Le tecniche di misurazione consistono in metodiche immunoturbidimetriche adattate ad analizzatori biochimici automatizzati (Eckersall et al. 1991), metodiche ELISA (Rikihisa et al. 1994), test di agglutinazione su vetrino (Tagata et al. 1996), o nuovi metodi basati sulla immunofluorimetria time-resolved (TR-IFMA) (Parra et al. 2006)

Per quanto riguarda i livelli plasmatici di CRP di un soggetto sano, non esiste ad oggi un intervallo di riferimento universalmente riconosciuto. Indicativamente, essendo una APPs principale, la sua concentrazione in condizioni fisiologiche non supera valori di 0,1 µg/dL, sarà poi ciascun laboratorio a stabilire il proprio intervallo di riferimento.

2.4.2.2 Fattori che possono influenzare la misurazione di CRP

Anticoagulanti

La misurazione della CRP su siero è stata comparata a quella eseguita su vari campioni di plasma ottenuti attraverso l'utilizzo di diversi anticoagulanti: eparina, EDTA e sodio citrato.

E' stato evidenziato che i valori della CRP risultavano significativamente più bassi nei campioni contenenti sodio citrato rispetto agli altri e rispetto a quanto misurato sul siero.

Tuttavia la sottostima della CRP non era tale da comportare problemi per l'interpretazione clinica dei risultati. (Martínez-Subiela & Cerón 2005)

Emolisi

A seconda del metodo di misurazione adottato sono stati registrati risultati differenti:

1) Con tecnica ELISA il siero contenente emoglobina libera ha determinato una stima aumentata della CRP, che tuttavia non è apparsa tale da interferire con l'interpretazione clinica dei risultati;

2) Con metodo immunoturbidimetrico invece la stima della CRP in sieri con valori di emoglobina pari a 80 mg/dL è risultata ridotta del 90%, questo dato è ovviamente in grado di compromettere fortemente l'interpretazione dei dati.

(Martínez-Subiela & Cerón 2005)

Lipemia

E' stata valutata utilizzando una tecnica ELISA per la misurazione della CRP.

La presenza di lipemia determina un aumento della stima di CRP che non risulta tuttavia così elevata da influenzare l'interpretazione clinica dei risultati. (Martínez-Subiela & Cerón 2005)

Bilirubinemia

Valutata anch'essa con la tecnica ELISA, dove il siero bilirubinemico determina una stima ridotta della CRP, senza tuttavia alterarla al punto tale da cambiare l'interpretazione clinica dei risultati. (Martínez-Subiela & Cerón 2005)

2.4.2.3 Variazioni della CRP in corso di patologie infiammatorie

La CRP è stata oggetto di ricerca mediante numerosi lavori sperimentali che ne osservavano la risposta in seguito ad esposizione degli animali a vari stimoli flogogeni (ferite chirurgiche, iniezione di sostanze irritanti ecc..) e studi che valutavano numerose condizioni patologiche naturalmente contratte e le relative variazioni nelle concentrazioni di CRP.

Si è osservato molto spesso che essa rappresenta un eccellente indicatore di flogosi, sebbene i tempi di risposta e l'entità del suo innalzamento possano variare, sia in relazione al tipo e all'intensità dello stimolo, che a fattori individuali non meglio identificati (poiché all'interno di un gruppo affetto dalla stessa patologia si possono rilevare notevoli differenze nelle concentrazioni di CRP raggiunte tra i diversi pazienti).

Un interessante lavoro del 2013 ha valutato la risposta della CRP su 3 gruppi di cani sottoposti a diversi tipi di intervento: ovaristerectomia laparotomica (trauma chirurgico di maggiore intensità), ovaristerectomia laparoscopica (trauma chirurgico di media intensità), e vasectomia dei dotti deferenti (trauma chirurgico di minore intensità). La CRP era stata misurata prima dell'intervento e poi a 4 – 8 – 12 – 23 e 27 ore post intervento, osservando che l'incremento di CRP era correlato positivamente con il grado di intensità del trauma chirurgico, con una differenza significativa tra le concentrazioni

raggiunte nei diversi guppi. In tutti e tre i casi il picco di concentrazione della CRP veniva raggiunto alla 23° ora post intervento. (Kjelgaard-Hansen et al. 2013)

Nakamura et al. nel 2007 hanno eseguito uno studio retrospettivo su un'ampia gamma di casi con relative diagnosi di patologia, per andare a verificare i livelli plasmatici della CRP nelle diverse malattie infiammatorie e non.

Sulla base delle concentrazioni di CRP hanno separato le patologie in due gruppi: nel primo vi hanno inserito quelle in cui la CRP mostrava, nel complesso, incrementi significativi e talvolta anche molto elevati; nel secondo hanno inserito invece le patologie dove la CRP non risultava aumentata o lo era in modo non significativo.

All'interno del primo gruppo le malattie in cui la CRP risultava elevata in tutti i pazienti erano:

- | | |
|--------------------------------|--------------------------|
| ➤ piometra | min 3,5 max > 20 (mg/dL) |
| ➤ pannicolite nodulare sterile | min 10 max > 20 (mg/dL) |
| ➤ pancreatite acuta | min 6,1 max > 20 (mg/dL) |
| ➤ poliartrite idiopatica | min 1,7 max > 20 (mg/dL) |
| ➤ emangiosarcoma | min 3,1 max 16 (mg/dL) |

Mentre nelle altre patologie:

- | | |
|----------------------------------|---------------------------------|
| ➤ adenocarcinoma nasale | ➤ mesotelioma maligno |
| ➤ anemia emolitica immunomediata | ➤ demodicosi |
| ➤ colangiocarcinoma | ➤ epatite cronica |
| ➤ leucemia linfoblastica acuta | ➤ tamponamento cardiaco |
| ➤ istiocitosi maligna | ➤ sindrome mielodisplastica |
| ➤ bronchite/polmonite | ➤ adenocarcinoma intestinale |
| ➤ linfoma | ➤ trombocitopenia immunomediata |

erano presenti anche pazienti dove la CRP effettivamente non mostrava incrementi significativi, come nei casi (35 cani) con diagnosi di anemia emolitica immunomediata (AEI), dove i dati riportavano valori di CRP da 0 a > 20 mg/dL con una mediana di 6,5 mg/dL, o nei casi di linfoma (127 cani) che presentavano stessi valori minimi e massimi ed una mediana di 3,5 mg/dL.

Tuttavia la percentuale di pazienti colpiti da AEI che mostravano valori superiori al limite di riferimento (0,95 mg/dL) era 86%, con il 26% dei pazienti che presentava livelli di CRP > a 10 mg/dL; e per quanto riguarda i casi di linfoma i pazienti con livelli superiori al limite di riferimento erano il 72%, e quelli con valori > a 10 mg/dL il 21%. Per cui, nel complesso, queste malattie risultavano fortemente associate alla presenza di elevati incrementi della CRP.

Nel secondo gruppo invece, comprensivo delle patologie in cui CRP non risultava subire incrementi significativi, erano presenti casi di:

- | | |
|---|---------------------------------------|
| ➤ epilessia | ➤ rinite/bronchite |
| ➤ sublussazione atlanto-assiale | ➤ bronchite allergica |
| ➤ ernia con protrusione discale | ➤ megaesofago |
| ➤ tumori cerebrali | ➤ insufficienza della valvola mitrale |
| ➤ idrocefalo | ➤ shunt portosistemico |
| ➤ meningoencefalite necrotizzante | ➤ urolitiasi |
| ➤ collasso tracheale | ➤ leiomiomasarcoma |
| ➤ endocrinopatie (ipotiroidismo, iperadrenocorticismo, diabete mellito) | |

E' stato così osservato che CRP risulta inefficace nel rilevare processi infiammatori a carico del SNC e in generale le patologie neurologiche.

Non mostrando incrementi significativi neanche in casi di ernia con protrusione del disco della colonna vertebrale, è stato suggerito che CRP possa essere utile nel distinguere forme artritiche vertebrali da patologie del midollo spinale in pazienti con zoppia e dolore riferito alla colonna vertebrale.

Per quanto riguarda i processi infiammatori a carico delle vie aeree, in questo studio è emerso che le patologie che interessano le vie aeree profonde sono correlate ad aumenti significativi dei livelli di CRP più facilmente di quelle che interessano le vie aeree superficiali.

Il comportamento della CRP in corrispondenza di patologie neoplastiche risulta invece fortemente legato alla diffusione della neoplasia, infatti in tumori localizzati come il leiomioma CRP difficilmente appare aumentata. (Nakamura et al. 2008)

L'osservazione che CRP non sembra influenzata dalla natura della neoplasia, ma dal suo comportamento, è supportata anche da altri lavori, Caspi et al. (1987) avevano rilevato che le concentrazioni di CRP erano più alte in pazienti con tumori mammari che presentavano lesioni disseminate rispetto a quelli con lesioni localizzate o benigne, osservazione confermata con un ulteriore lavoro del 2009 da Tecles et al. dove CRP risultava significativamente aumentata solo nei pazienti che presentavano metastasi, oppure masse tumorali aventi diametro maggiore di 5 cm e ulcerazioni.

Nelle neoplasie ematologiche Tecles et al. (2005) ipotizzavano che la risposta delle APPs (tra cui la CRP) fosse influenzata dallo stato clinico del paziente, lo stadio del processo neoplastico e probabilmente dai fenomeni infiammatori secondari all'insulto tissutale determinato dal processo neoplastico stesso.

Il comportamento della CRP nel corso di neoplasia è quindi interessante anche per quanto riguarda il suo valore prognostico e per il monitoraggio delle terapie chemioterapiche eventualmente intraprese. Lavori sperimentali eseguiti su cani con linfoma multicentrico hanno infatti evidenziato la spiccata sensibilità e precocità della CRP nel rilevare la remissione del tumore in risposta alla chemioterapia o l'eventuale recidiva, con una forte correlazione negativa tra i livelli sierici di CRP e i tempi di sopravvivenza dei pazienti. (Merlo et al. 2007; Valentini & Melis 2009)

Per quanto riguarda la risposta agli agenti infettivi è stato osservato che il comportamento della CRP può variare in relazione ai diversi tipi di patogeni con cui l'organismo entra a contatto.

Comparando le risposte di tale proteina ad infezioni sperimentalmente indotte con agenti batterici e protozoari, si osserva che nel primo caso i picchi di CRP vengono raggiunti in 24/48 h post-infezione, mentre nel secondo i tempi di reazione sono molto variabili e tendenzialmente lunghi (vedi Tabella 2.1).

Agente patogeno	Incremento della CRP	Tempo di raggiungimento del picco di concentrazione		Fonte
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	Da 23 x a 95 x	Picco a 24/48 g post-infez.		Yamamoto et al. 1994
<i>Proteus mirabilis</i> (cistite)	Da 12 x a 28 x	Picco a 48 h post-infez.		Seo et al. 2012
<i>Micrococcus luteus</i> (inattivato)	32 x	Picco a 24/48 g post-infez.		Anziliero et al. 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	80 x	Picco a 24 h post-infez. (incremento significativo dalla 4° ora post-infez.)		Chaprazov & Borissov 2009
<i>Trypanosoma brucei</i>	Da 12 x a > 22 x	Picco a circa 7 gg post-infez.		Ndung'u et al. 1991
<i>Ehrlichia canis</i>	Da 3,3 x a 6,5 x	Picco tra 4 e 6 gg post-infez.		Rikihisa et al. 1994
" "		[CRP] comincia a > tra 4 e 16 gg post-infez.	Picco tra 15 e 42 gg post-infez.	Shimada et al. 2002
<i>Leishmania infantum</i>	5 x	[CRP] comincia a > 1 mese post-infez.	Picco a circa 3 mesi post-infez.	Martinez-Subiela et al. 2011

Tabella 2.1 – Risposta della Proteina C Reattiva (CRP) ai diversi agenti patogeni

Una spiegazione per la notevole differenza nel comportamento della CRP associata ai diversi agenti infettivi può essere attribuita alle differenze nei rispettivi cicli biologici e nella patogenesi delle relative malattie.

Infatti i microrganismi che si comportano come patogeni extracellulari sono riconosciuti precocemente dalle cellule sentinella, con attivazione della prima linea di difesa del sistema immunitario innato e induzione di una rapida risposta della CRP mediata dalle citochine infiammatorie.

Invece i microrganismi che si “nascondono” all'interno delle cellule, specialmente *Leishmania infantum* che si replica lentamente all'interno dei macrofagi con dei tempi di pre-patenza molto lunghi, determinano la comparsa di una risposta della CRP più tardiva rispetto all'inoculazione del patogeno e tendenzialmente più moderata, con incrementi della concentrazione di CRP minori rispetto ai valori raggiunti in corso di infezioni batteriche o a seguito di infezione da *Trypanosoma brucei*.

Nello studio di Martinez-Subiela et al. relativo all'infezione sperimentale con *Leishmania infantum* comunque si registravano incrementi progressivi dei livelli di CRP a partire dal 1° mese post-infezione, tali incrementi sono diventati significativi intorno al 2° mese ed hanno raggiunto il picco massimo al 3° mese post-infezione, momento che corrisponde all'inizio della terapia con allopurinolo. Nello stesso studio viene fatto notare che i sintomi clinici sono comparsi al 4° mese post-infezione.

Nelle infezioni caratterizzate da un repentino incremento della CRP essa risulta anche un ottimo parametro per il monitoraggio della terapia antimicrobica, poiché è in grado di segnalare tempestivamente l'efficacia del farmaco così come l'insorgenza di complicazioni.

In un lavoro su cagne sottoposte ad intervento di isterectomia per il trattamento chirurgico di piometra, la CRP ha manifestato un picco in tutte le pazienti 24 h dopo l'intervento ed è andata diminuendo progressivamente i suoi livelli sierici nelle cagne

senza complicazioni post-operatorie, mentre nei soggetti in cui si è verificata una contaminazione della ferita da *E.coli* (80%) o da *Staphylococcus spp.* (20%) ha manifestato un nuovo picco al 4° giorno post-intervento. In seguito alla variazione della terapia con un diverso antibiotico i valori di CRP hanno immediatamente ripreso a calare e al 17° giorno post intervento erano di nuovo ai livelli basali.

In corso di parvovirosi è stata riscontrata più volte una correlazione tra i livelli sierici crescenti di CRP e la probabilità di morte.

Secondo un lavoro del 2010 che metteva in comparazione CRP, Cp, Hp e albumina, la CRP era quella maggiormente sensibile nel predire il decesso dei pazienti; valori superiori a 92,4 mg/L risultavano infatti avere una sensibilità del 91% come marker di prognosi infausta (Kocaturk et al. 2010). Ma in un ulteriore studio sperimentale dello stesso anno è stato messo in evidenza che il valore prognostico della CRP acquisisce un rilievo nettamente maggiore se inserito nell'ambito di un monitoraggio seriale, poiché una valutazione puntiforme può non essere significativa. Nel presente studio infatti alcuni pazienti che all'ammissione presentavano concentrazioni di CRP relativamente basse sono poi deceduti, mentre altri con valori molto elevati hanno risposto positivamente alle terapie e sono sopravvissuti (Sala Gutierrez 2010).

Un lavoro successivo riferisce che la sensibilità e la specificità della concentrazione di CRP nel distinguere i pazienti che sarebbero sopravvissuti e quelli che sarebbero deceduti nelle 24 ore successive all'ammissione erano rispettivamente dell' 86,7% e 78,7% (McClure et al. 2013).

Nelle patologie infettive il cui esordio non è caratterizzato da processi infiammatori sufficienti ad evocare una risposta della CRP negli stadi iniziali, questa si dimostra tuttavia elevata quando l'agente patogeno raggiunge un livello di infestazione consistente all'interno dell'organismo.

CRP può quindi rappresentare anche in queste situazioni un utile marker di controllo per il monitoraggio della terapia specialmente se associato ad altre APPs (Martinez-Subiela & Ceron 2005).

Importante tenere ben presente che CRP è un marker infiammatorio aspecifico e molto sensibile nei confronti di altre patologie, quindi è fondamentale prendere in considerazione l'eventuale presenza di altre cause di infiammazione che si possono sovrapporre alla malattia diagnosticata e sottoposta a trattamento, nel caso in cui le analisi di controllo rivelino un aumento della concentrazione sierica di CRP.

Un lavoro di tesi del 2010 ha inoltre studiato l'andamento della CRP in pazienti canini con insufficienza renale. E' emerso che negli stadi IRIS 1 e 2 i valori di CRP mostravano variazioni analoghe a quelle del gruppo di controllo dove valori di CRP superiori al normale intervallo di riferimento potevano essere attribuiti ad un qualsiasi processo infiammatorio concomitante alla patologia renale. Mentre negli stadi IRIS 3 e 4 la concentrazione di CRP subiva un aumento considerevole e stabile divenendo quindi significativa.

I valori di CRP si muovevano indipendentemente da quelli della creatinina.

E' stata riscontrata una correlazione negativa tra i livelli di CRP ed i giorni di sopravvivenza dei pazienti IRIS 3 e 4, concludendo che essa rappresenta un marker tardivo di insufficienza renale che può essere utile per emettere una prognosi negli stadi più avanzati della malattia. (Tedeschi 2010)

2.4.2.4 Condizioni che possono influenzare le concentrazioni plasmatiche di CRP

➤ Età

Gli studi riguardanti l'influenza dell'età sulle proteine di fase acuta sono scarsi, tuttavia per quanto riguarda la CRP un lavoro giapponese del 2001 aveva rilevato una risposta significativamente ridotta in soggetti di 1 mese di età rispetto a soggetti di 3 e 18 mesi, ai quali era stata indotta una reazione infiammatoria mediante iniezione intramuscolare di olio di trementina. (Hayashi et al. 2001)

In uno studio successivo è stata valutata l'eventuale presenza di differenze nelle concentrazioni sieriche di CRP in cani sani di età compresa tra 3 e 72 mesi di età, ma i risultati non hanno evidenziato variazioni significative. (Kuribayashi et al. 2003)

➤ Gravidanza

E' riportato che la CRP subisce delle variazioni in corso di gravidanza. Alcuni autori riferiscono di un aumento nel periodo compreso tra 21 e 55 giorni dopo l'ovulazione, dove CRP raggiunge livelli di 80 mg/L (Eckersall et al. 1993). Altri riportano variazioni nelle concentrazioni di CRP in un periodo compreso tra 30 e 45 giorni post-ovulazione, con incrementi compresi tra 70,2 e 90,4 µg/ml (per una media di 77,5 +/- 7,1 µg/ml). (Kuribayashi et al. 2003)

Tuttavia Ulutas et al. in uno studio successivo non sono stati in grado di rilevare variazioni significative nei cani osservati nella prima e nella seconda metà della gravidanza.

Non hanno inoltre riscontrato alterazioni significative durante le varie fasi del ciclo estrale e durante l'anestro, dove i valori di CRP si sono mantenuti tra 0,8 e 2,09 µg/ml. (Ulutas et al. 2008)

➤ Obesità

L'obesità rappresenta l'eccessiva espansione del tessuto adiposo bianco rispetto alla massa corporea, condizione che predispone all'insorgenza di varie patologie oltre che determinare uno stato di infiammazione cronica di basso grado, dovuta alla capacità degli adipociti di secernere attivamente una vasta gamma di proteine chiamate genericamente adipochine, tra cui anche citochine pro-infiammatorie e alcune APPs.

E' stata infatti dimostrata l'espressione genica della CRP e dell'Hp nel tessuto adiposo canino e tali APPs possono essere prodotte dagli adipociti stessi. (Eisele et al. 2005)

Tuttavia secondo alcuni autori nella specie canina, contrariamente a quanto avviene nell'uomo, i cani obesi presenterebbero concentrazioni di CRP inferiori rispetto a soggetti normopeso (Veiga et al. 2008), ma un lavoro successivo smentisce questa conclusione, dimostrando invece che la CRP (insieme ad altre proteine) è positivamente correlata alla massa di tessuto adiposo bianco e che, sottoponendo a dieta 26 cani obesi, assieme alla perdita di peso si evidenziava una riduzione dei livelli di CRP. (German et al. 2009)

Ulteriore conferma di una correlazione positiva tra obesità e valori di CRP arriva da uno studio del 2011 dove sono state comparate le risposte di fase acuta conseguenti ad un'infezione indotta con *Staphylococcus intermedius*, osservando

che la CRP mostrava incrementi più rapidi ed elevati nel gruppo di cani obesi rispetto a quello dei cani normopeso. (Slavov et al. 2011)

➤ Glucocorticoidi

In passato alcuni autori avevano affermato che la CRP non viene influenzata dalla somministrazione di prednisolone a differenza di quanto accade con i leucociti (Yamamoto et al. 1994; Martínez-Subiela et al. 2004), tuttavia studi più recenti hanno dimostrato che i glucocorticoidi esercitano una significativa influenza sulla risposta della CRP in corso di infiammazione.

Un lavoro del 2006 effettuato su un gruppo di cani affetti da poliartrite idiopatica descriveva come, in seguito alla somministrazione di corticosteroidi, le concentrazioni di CRP calassero drammaticamente in tutti i soggetti già dopo pochi giorni dall'inizio del trattamento. (Ohno et al. 2006)

Nel 2009 in uno studio riguardante cani affetti da iperadrenocorticismo, con e senza concomitanti processi infiammatori, era stato notato che CRP manifestava una risposta moderata in corso di sepsi nei pazienti con iperadrenocorticismo, nettamente inferiore a quanto avveniva nei cani con funzionalità surrenalica normale. Gli autori supportavano quindi l'ipotesi che i corticosteroidi fossero capaci di inibire la risposta di tale proteina, suggerendo che un aumento di CRP moderato in questi soggetti debba far sospettare di una grave infiammazione sottostante. (Caldin et al. 2009)

Un altro lavoro dello stesso anno ha rilevato che in corso di anemia emolitica autoimmune la concentrazione media di CRP al momento della diagnosi era significativamente maggiore nei soggetti che non avevano ricevuto corticosteroidi:

- 191,2 +/- 101,2 µg/mL nei soggetti che non avevano ricevuto corticosteroidi;

- 115,3 +/- 58,5 µg/mL nei soggetti che avevano ricevuto trattamento corticosteroidico.

Inoltre è stata osservata una correlazione negativa tra il numero di trattamenti corticosteroidici ricevuti prima della diagnosi e le concentrazioni di CRP (Mitchell et al. 2009).

Tali risultati suggeriscono che i corticosteroidi sia endogeni che esogeni sono in grado di sopprimere la risposta della CRP riducendone quindi le concentrazioni plasmatiche in corso di infiammazione.

2.4.3 APPs moderate

Le APPs moderate del cane sono: Aptoglobina (Hp), Ceruloplasmina (Cp), α_1 -glicoproteina acida (AGP) e Fibrinogeno (Fb).

Le APPs moderate sono normalmente presenti in circolo con valori basali molto più elevati rispetto alle APPs principali, per cui il loro incremento è relativamente moderato (2-10 volte le loro concentrazioni basali) sebbene in termini quantitativi esse raggiungano valori considerevoli, tanto da determinare spesso un incremento anche nella concentrazione delle proteine totali.

Come marker di flogosi in passato veniva infatti utilizzata la determinazione della concentrazione delle proteine totali ed il rapporto albumina/globuline, dove un aumento della prima associato ad una riduzione del secondo sono indicativi di una risposta di fase acuta in atto; tuttavia questi dati sono troppo poco specifici e meno sensibili rispetto alla misurazione nel dettaglio di determinate APPs.

In linea generale le APPs moderate cominciano ad aumentare la loro concentrazione plasmatica a circa 8-10 h rispetto allo stimolo infiammatorio con raggiungimento del picco di massima concentrazione 2-3 giorni dopo; per quanto riguarda il fibrinogeno è riportato che incrementi significativi dei suoi valori sono rilevabili già alla 6° ora successiva ad un'infezione sperimentalmente indotta con *Staphylococcus aureus*, con picco al 3° giorno post-infezione (Zapryanova et al. 2013).

Il decremento in caso di guarigione risulta più lento rispetto alle APPs principali, con ripristino dei livelli basali tardivo rispetto alla fine del processo flogistico.

2.4.4 Fibrinogeno

Il fibrinogeno è stato per anni la proteina di fase acuta più ampiamente utilizzata nella pratica clinica perché ben conosciuta e facilmente analizzabile (Martínez-Subiela et al. 2001) così come la velocità di eritrosedimentazione (VES), parametro al quale si faceva riferimento come marker aspecifico di patologia in atto; la VES è infatti influenzata dall'aumento della viscosità del sangue che è correlata alla concentrazione delle proteine plasmatiche nel sangue ed in particolare all'aumento del fibrinogeno, che durante la fase acuta rappresenta la APP quantitativamente predominante (Gruys et al. 2005).

2.4.4.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici

Esistono diversi metodi per dosare il fibrinogeno: analisi gravimetriche, metodi elettromeccanici e metodi turbidimetrici, dosaggi dell'antigene “fibrinogeno” mediante tecniche immunologiche e metodi funzionali che sfruttano la capacità di coagulazione del plasma.

Il più diffuso e comunemente utilizzato è il tempo di coagulazione indotto dalla trombina (“tempo di trombina”) modificato secondo “Clauss”. Questo metodo si basa sulla velocità di formazione del coagulo in un plasma citrato diluito e al quale viene aggiunta una soluzione ad alta concentrazione di trombina. Utilizzando campioni standard di plasma con quantità note di fibrinogeno, viene realizzata una curva di riferimento (standard) attraverso la quale diventa poi possibile stimare la quantità di fibrinogeno presente nel plasma da analizzare in relazione al tempo impiegato per coagulare.

Il tempo di coagulazione (TT_{Clauss}) è inversamente proporzionale alla concentrazione di fibrinogeno.

Il TT_{Clauss} viene misurato in secondi, ma i valori della concentrazione di fibrinogeno sono letti attraverso la curva standard e riportati in unità di misura quali mg/dL o $\mu\text{mol/L}$. (Stocham & Scott 2008)

L'elevata concentrazione di trombina consente di annullare l'effetto di inibizione della coagulazione esercitato da eventuali terapie epariniche, mentre la presenza di sodio citrato e la diluizione del campione riducono le interferenze in caso siano presenti prodotti di degradazione della fibrina (FDPs).

E' da tenere presente che la concentrazione di fibrinogeno diminuisce lievemente dopo che il campione è stato stoccato per 48 ore a temperatura ambiente (Furlanello et al. 2006).

Il fibrinogeno in condizioni fisiologiche rappresenta il 4-5% delle proteine plasmatiche totali e la sua velocità di sintesi a livello epatico, in condizioni fisiologiche, è direttamente regolata dalla fibrinogenemia, in modo che la concentrazione plasmatica di

fibrinogeno sia mantenuta entro valori approssimativamente compresi tra 200 e 400 mg/dL.

2.4.4.2 Variazioni della concentrazione plasmatica di fibrinogeno

Le condizioni che determinano un aumento della concentrazione di fibrinogeno sono:

- Infiemmazione/Infezione:
durante un processo infiammatorio acuto il fibrinogeno si comporta da APP positiva moderata, reagisce quindi con un innalzamento dei suoi livelli plasmatici relativamente lento, che inizia alcune ore dopo l'insulto flogistico (da 6 a 10 ore) e prosegue gradualmente fino a raggiungere il picco di concentrazione 2 o 3 giorni dopo.
L'intensità del suo incremento può variare da 2 a 10 volte in relazione al grado di infiammazione (Murata et al. 2004).
- Gravidanza
(nei primi 28-37 giorni) (Sodikoff – Medicina di laboratorio del cane e del gatto)
- Glucocorticoidi
(endogeni in caso di iperadrenocorticismismo, o esogeni in caso di terapie corticosteroidi)
- Diabete mellito
- Glomerulonefrite
(sindrome nefrosica, associata a ipercolesterolemia e ipoalbuminemia)
- Insufficienza cardiaca congestizia
(Kittrell & Berkwitz 2012)
- Avvelenamento da rodenticidi (Sheafor & Couto 1999)

Si può inoltre avere un falso aumento dei valori di fibrinogeno in caso di emocostrazione.

Mentre decrementi della concentrazione di fibrinogeno possono essere determinati da:

- Coagulazione intravasale disseminata (CID)
- Sanguinamento e coagulazione localizzata
- Insufficienza epatica
- Avvelenamento
(il veleno di *Crotalus adamanteus* determina ipofibrinogenemia perchè degrada la molecola)

(Meyer & Harvey 2007)

Molti autori, indagando il comportamento del fibrinogeno rispetto alle APPs principali, descrivono che in seguito ad uno stimolo flogogeno generalmente si assiste ad un rapido incremento delle APPs principali seguito da un aumento più graduale del fibrinogeno che mantiene livelli plasmatici elevati più a lungo. Tuttavia in uno studio del 2011 (Slavov et al.) dov'era stato analizzato il comportamento di CRP e Fb in risposta ad un'infezione sperimentale da *Staphylococcus intermedius*, Fb raggiungeva il picco al 2° giorno post-infezione per poi decrescere i suoi livelli sierici nei giorni successivi divenendo più basso rispetto ai normali intervalli di riferimento al 14° giorno e durante questo arco di tempo CRP era sempre rimasta notevolmente elevata.

Nel presente studio non era stata prestata attenzione a questo risultato, poiché l'interesse verteva più sul confronto delle variazioni nella concentrazione di APPs in due diverse popolazioni di cani (cani obesi, che mostravano risposte delle APPs più marcate rispetto ai cani normopeso).

Ma appare evidente che il decremento delle concentrazioni di fibrinogeno dal 3° giorno post-infezione, associato a valori di CRP estremamente alti, riflettevano molto probabilmente un aumentato consumo del fibrinogeno associato alla patologia infettiva in corso, supportando un'ipotesi di CID.

Infatti in corso di un processo infiammatorio, che di per sé determina un aumento della produzione epatica di questa proteina, l'incremento può venir mascherato da un eventuale CID; come viceversa una condizione di CID (che di per sé determina una riduzione del fibrinogeno plasmatico) può essere mascherata da una sua aumentata produzione in risposta ad un processo infiammatorio.

Nel caso dello studio preso ad esempio, la valutazione del solo fibrinogeno non sarebbe stata utile a valutare l'evoluzione del processo infiammatorio/infettivo in atto (sarebbe anzi stata fuorviante), ma l'osservazione del suo decremento in associazione ai valori elevati di CRP aveva fornito un'importante informazione aggiuntiva, rispetto alla sola valutazione della CRP.

E' quindi fondamentale ricordarsi che la concentrazione di fibrinogeno nel plasma riflette sempre il bilancio tra produzione e consumo (Stocham & Scott 2008) e questo dev'essere tenuto ben presente nell'interpretazione clinica dei risultati.

2.4.5 APPs negative

Sono le proteine che riducono la loro concentrazione plasmatica per più del 25% durante la risposta di fase acuta di un processo infiammatorio e sono l'albumina, la transferrina, la transtiretina (TTR o prealbumina), l' α -lipoproteina (HDL) ed altre ancora di importanza minore.

La più conosciuta è indubbiamente l'albumina che si comporta come una proteina a lenta reazione, poichè avendo un'emivita relativamente lunga la sua concentrazione plasmatica scende in modo graduale e l'ipoalbuminemia si rende evidente diversi giorni dopo l'inizio del processo flogistico.

La transferrina è anch'essa descritta come APP negativa ma nella pratica clinica la sua determinazione viene sostanzialmente impiegata per valutare il metabolismo del ferro. Le altre proteine sono state oggetto di studio in altre specie dimostrando di avere una reazione più rapida e risultando quindi dei marker di flogosi più precoci dell'albumina e potenzialmente migliori. Ma la loro fisiopatologia e cinetica non è ancora stata completamente chiarita negli animali domestici e quindi attualmente non sono utilizzabili nella pratica clinica di queste specie.

2.4.6 Albumina

L'albumina è la proteina più abbondante nel plasma, è prodotta dal fegato ed ha un'emivita plasmatica di circa 10 giorni. E' responsabile del 75-80% della pressione colloidale oncologica e una riduzione di essa stimola gli epatociti alla produzione e liberazione di albumina.

La sua sintesi appare inoltre influenzata dall'azione di vari ormoni, come insulina, GH, ormoni tiroidei e glucocorticoidi sebbene il meccanismo con cui essi agiscono non sia ancora stato chiarito in medicina umana. (Prinsen & de Sain-van der Velden 2004)

2.4.6.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici

La concentrazione dell'albumina può essere misurata mediante test colorimetrici oppure successivamente all'elettroforesi delle proteine, dove però l'albumina viene spesso sottostimata. (Willard & Tvedten 2012)

Per quanto riguarda i metodi colorimetrici viene sfruttata la capacità dei coloranti di legarsi specificatamente all'albumina variandone l'assorbanza, così per mezzo di spettrofotometri, analizzatori automatici o sistemi di chimica secca viene analizzata la soluzione colorata che ne deriva, fornendo una misura quantitativa della concentrazione sierica di albumina.

Il colorante più comunemente utilizzato è il verde di bromocresolo, BCG (bromocresol green).

L'accuratezza di queste misurazioni è adeguata fin tanto che i valori della concentrazione di albumina rientrano nel range di riferimento, infatti quando essi si discostano l'accuratezza si riduce. (Kaneko et al. 2008)

Nel cane i livelli fisiologici di albumina nel plasma sono indicativamente compresi tra 2,5-3,5 g/dL (Sodikoff 1997) o tra 2,5-4,5 g/dL secondo altri autori (Meyer & Harvey 2007), di fatto poi ogni laboratorio stabilisce il proprio intervallo di riferimento.

2.4.6.2 Fattori che possono influenzare la misurazione dell'albumina

L'utilizzo di sieri lipemici, emolitici o itterici può potenzialmente interferire con i metodi colorimetrici utilizzati per la determinazione di vari analiti.

Per quanto concerne la misurazione dell'albumina, è stato appurato che la lipemia provoca una sovrastima di albumina (così come della misurazione delle proteine totali). Anche l'emolisi interferisce significativamente con la misurazione dell'albumina, tuttavia i valori riscontrati in un lavoro del 2013 rientravano nei limiti CLIA (limiti di tolleranza stabiliti dal Clinical Laboratory Improvement, per ritenere accettabile l'errore dato da un certo metodo di misurazione per un determinato analita). (Iacomini 2014)

2.4.6.3 Variazioni dell'albumina in corso di patologie infiammatorie

Durante un processo infiammatorio la sintesi epatica di albumina diminuisce, questo fa sì che si renda disponibile un'importante quota di amminoacidi per la sintesi delle APPs positive. (Paltrinieri 2007)

La riduzione della concentrazione plasmatica di albumina è generalmente lieve o moderata e si rileva a qualche giorno dall'inizio del processo infiammatorio (Meyer & Harvey 2007).

Tuttavia in base alla gravità del fenomeno flogistico locale, l'edema che si determina può essere tale da contribuire alla riduzione della concentrazione plasmatica di albumina (Kaneko et al. 2008) che si realizzerà in tempi più brevi.

Nel corso di un' infezione sperimentalmente indotta con iniezione sottocutanea di colture in brodo di *Staphylococcus aureus*, è stato misurato un profilo delle proteine plasmatiche in cui erano inclusi albumina e fibrinogeno nei soggetti infettati e in quelli del gruppo di controllo.

I prelievi sono stati eseguiti a 6 ore – 1 giorno – 2 gg – 3 gg – 7 gg – 14 gg – 21 gg post-infezione.

E' stato osservato che la riduzione dell'albumina diventava significativa al 3° giorno (mentre il fibrinogeno si era mosso già dalla 6° ora post-infezione) e si manteneva ridotta fino alla misurazione del 14° giorno.

I valori, a inizio esperimento, del gruppo infettato erano del tutto simili ai valori rilevati nel gruppo di controllo ed esprimevano una media di 36,8 +/- 1,5 g/L, mentre i valori medi in corso di ipoalbuminemia da APR sono stati:

3° giorno post-infezione	7° giorno post-infezione	14° giorno post-infezione
33,6 +/- 1,6 g/L	32,2 +/- 1,4 g/L	32,4 +/- 0,9 g/L

Tabella 2.2 – Valori di Albumina in cani infettati sperimentalmente con *Staphylococcus aureus* (Zapryanova et al. 2013, modificato)

In un lavoro precedente, in seguito ad iniezione intramuscolare di olio di trementina, è invece segnalato un decremento pari a circa il 50% dei valori basali di albumina e tali livelli di ipoalbuminemia erano stati raggiunti al 5° giorno post-iniezione. (Yamashita et al. 1994)

In un altro studio che indagava la risposta delle proteine sieriche in corso di babesiosi contratta naturalmente, sono stati suddivisi i vari casi clinici in tre gruppi caratterizzati da diversi gradi di gravità e complicazione della malattia, a cui corrispondevano livelli medi differenti nella concentrazione di albumina. Il valore medio del gruppo di controllo equivaleva a 36,72 g/L.

Gruppo 1: malattia moderata	Gruppo 2: malattia grave	Gruppo 3: malattia complicata
Anemia da lieve a moderata (Hct 20-30%). Nessun segno clinico né biochimico di altre malattie concomitanti.	Anemia grave (Hct < 15%). Nessun segno clinico né biochimico di altre malattie concomitanti.	Associazione di uno o più delle seguenti complicazioni: sintomi neurologici, insufficienza renale acuta, sindrome respiratoria acuta, shock ipotensivo, emocoagulazione, anemia emolitica immunomediata.
Albumina: 32,24 g/L	Albumina: 24,15 g/L	Albumina: 29,46 g/L

Tabella 2.3 – Valori di Albumina in cani infettati naturalmente con *Babesia canis* (Lobetti et al. 2000, modificato)

2.4.6.4 Condizioni che possono influenzare la concentrazione plasmatica di albumina

Le altre possibili cause di una riduzione patologica della concentrazione di albumina, oltre alla risposta di fase acuta di un processo infiammatorio, sono molte e si possono suddividere sulla base del meccanismo con cui essa si verifica:

- ridotta produzione
 - epatite o insufficienza epatica (atrofia, fibrosi, cirrosi, shunt porto-sistemico)
 - malnutrizione (dieta, endoparassiti)
 - mal-digestione/malassorbimento

- aumentata perdita
 - emorragie
 - sindrome nefrosica
 - enteropatie proteino-disperdenti
 - malattie cutanee essudative (ustioni, abrasioni)

- ridistribuzione
 - aumento della permeabilità capillare con passaggio di albumina nel terzo spazio (vasculite, peritonite, pleurite)

Da tener presente che talvolta queste situazioni si possono sovrapporre, quindi durante un processo patologico si può avere la riduzione della concentrazione plasmatica di albumina dovuta alla combinazione di più meccanismi diversi. Nell'infiammazione stessa, come già accennato, il meccanismo principale e costante è il decremento della sua produzione epatica, ma questo può essere associato ad una aumentata perdita se l'insulto flogistico ha causato fenomeni essudativi importanti, come anche nel caso in cui esso abbia provocato fenomeni emorragici.

Anche in corso di disordini endocrini si può determinare un abbassamento delle concentrazioni plasmatiche di albumina, sebbene i meccanismi alla base di questa riduzione non siano ancora stati chiariti e dipendono probabilmente sia da una minor produzione che da un'aumentata perdita.

Questo si verifica ad esempio nei cani affetti da ipoadrenocorticismo dove un'ipoalbuminemia da moderata a grave è riportata nel 17% - 39% dei pazienti. Le cause sembrano legate al deterioramento della sintesi sia per mancata assunzione di alimento (pazienti anoressici) che per problemi di assorbimento intestinale, oltre che a perdite gastro-intestinali e renali di albumina.

(Klein & Peterson 2010)

Per quanto riguarda l'iperadrenocorticismo invece sembra che, laddove non siano presenti concomitanti processi infiammatori (che in tal caso determinano una riduzione della concentrazione di albumina come risposta di fase acuta), i livelli di albumina non siano significativamente alterati.

(Caldin et al. 2009)

Le influenze fisiologiche sui livelli di albumina sono determinate da:

- età: i cuccioli hanno valori di proteine totali più basse con concentrazione di albumina più elevate rispetto agli adulti;
- gravidanza e lattazione: durante le quali l'albumina è tendenzialmente ridotta per fenomeni di emodiluzione fisiologica;
- stress fisici: come in corso di febbre, ipertermia o ipotermia che sono associate ad incremento dell'attività surrenalica con aumento del turnover delle proteine, che provoca una riduzione dei valori di proteine totali e di albumina.

(Kaneko et al. 2008)

Inoltre devono essere tenuti presenti altri fattori quali:

- Emodiluzione in seguito a terapie fluidiche, che può falsamente ridurre la concentrazione di albumina simulando un'ipoalbuminemia;
- Terapie corticosteroidi.

Il lavoro di Mitchell et al. del 2009 evidenzia come in pazienti affetti da anemia emolitica immunomediata, le concentrazioni di albumina siano più basse nei soggetti trattati con corticosteroidi (con valori medi di 31,8 +/- 5) rispetto a

quelli non trattati con corticosteroidi (che presentavano valori medi di 34,1 +/- 3,1)

Non esistono condizioni fisiologiche o patologiche conosciute che determinano un incremento reale della concentrazione plasmatica di albumina, quindi l'unico fattore che deve essere tenuto presente è l'emoconcentrazione (disidratazione) che se presente può mascherare una condizione di ipoalbuminemia.

2.4.6.5 Valutazione dell'albumina rispetto alle globuline

Le alterazioni della concentrazione di albumina si possono meglio interpretare se valutate parallelamente alla concentrazione delle globuline:

Ipoalbuminemia associata a

- *aumento delle globuline:*
infiammazione, mieloma multiplo, malattie linfoproliferative.
- *globuline normali:*
può dipendere da nefropatia proteino-disperdente, epatopatia, malnutrizione, perdita di albumina attraverso essudati o trasudati modificati, ipoadrenocorticismo;
- *riduzione delle globuline:*
è indicativa di emorragia grave o recente, iperidratazione, patologia proteino-disperdente;

Mentre se l'albumina risulta aumentata si tratta o di emoconcentrazione o di un errore di laboratorio.

Infine se l'albumina risulta normale, un aumento della concentrazione di globuline deve far sospettare la possibilità di un'ipoalbuminemia mascherata da emoconcentrazione.

2.5 Ferro

2.5.1 Metodi di misurazione e livelli plasmatici fisiologici

I metodi più comunemente impiegati per la misurazione del ferro sierico prevedono procedure colorimetriche basate sulla formazione di complessi colorati ferro-cromogeno, che vengono poi quantificati.

Il ferro viene rilasciato dalla transferrina grazie ad una forte acidificazione del campione (indotta con l'aggiunta di acido solforico, cloridrico o tricloroacetico (che contemporaneamente determina la precipitazione delle proteine).

Il Fe^{3+} è ridotto a Fe^{2+} per aggiunta di acido ascorbico, acido tioglicolico, idrazina o idrossilamina, e viene complessato con un cromogeno che contiene il gruppo reattivo $-N=C-C=N-$. I cationi metallici sono chelati tra i due atomi di azoto formando così un prodotto di reazione colorato.

L'assorbanza del cromogeno alla sua caratteristica lunghezza d'onda è proporzionale alla concentrazione di ferro.

Questo tipo di analisi può essere eseguita manualmente, attraverso kit commerciali o per mezzo di analizzatori automatizzati.

Esistono poi altri metodi per la misurazione del ferro sierico, quali radiometria e spettrofotometria di assorbimento atomico (ma sono scarsamente utilizzati nella pratica clinica) e la coulometria che è caduta in disuso poiché la strumentazione da tempo non viene più prodotta. (Douglas & Wardrop 2010)

I valori fisiologici della sideremia oscillano entro un range piuttosto ampio e gli intervalli di riferimento possono variare notevolmente da un laboratorio ad un altro. Alcuni autori riportano ad esempio un intervallo di 94-122 $\mu\text{g/dL}$ (Aguggini) mentre altri un intervallo di 33-147 $\mu\text{g/dL}$ (Kaneko et al. 2008), nella realtà dei fatti i valori stabiliti da ogni laboratorio possono esprimere differenze ancora più elevate.

2.5.2 Fattori che possono influenzare la misurazione del ferro sierico

Il ferro è un elemento ubiquitariamente presente nell'ambiente, motivo per cui è molto importante evitare ogni possibilità di contaminazione del campione da esaminare, prestando attenzione anche alla strumentazione utilizzata che deve essere costituita da materiale inerte e sterile.

Riguardo alla qualità del siero è segnalata la possibilità di interferenza in caso di marcata emolisi, non per il ferro contenuto nell'emoglobina libera (poiché i metodi di misurazione del ferro sierico non sono in grado di dissociare il ferro legato all'emoglobina mediante l'acidificazione del campione) ma per l'interferenza ottica, poiché il potere di assorbanza dell'emoglobina si sovrappone a quello del ferro legato al cromogeno.

2.5.3 Variazioni della sideremia in corso di patologie infiammatorie

In corso di infiammazione (sia di origine infettiva che non) la sideremia subisce un decremento.

Che l'abbassamento del ferro sierico nella specie canina si verifichi come conseguenza di infezioni batteriche è stato ampiamente confermato attraverso vari esperimenti condotti inoculando colture pure e miste di *E.coli* e *S.aureus*, e tossine batteriche purificate (che suscitavano però una risposta inferiore) e la riduzione della sideremia come conseguenza di condizioni infiammatorie di natura non infettiva è stata ripetutamente provata mediante iniezioni intramuscolari di olio di trementina che inducevano ascessi asettici ed in concomitanza di questo la concentrazione sierica di ferro calava bruscamente raggiungendo il livello minimo tra le 24 e le 48 ore dall'iniezione, dopo di che si assisteva ad una graduale risalita della sideremia. (Cartwright et al. 1945; Greenberg et al. 1946)

Facendo ancora riferimento a studi sperimentali eseguiti sui cani, il verificarsi di una transitoria iposideremia è stata riscontrata anche in seguito ad iniezioni intramuscolari di formalina (considerata uno stimolo infiammatorio moderato) e di istamina, all'induzione di shock anafilattico per somministrazione endovenosa ripetuta 2 volte di siero equino ed in seguito alla frattura di femore provocata sotto anestesia. L'iposideremia si verificava inoltre in risposta a iniezioni intramuscolari di adrenalina ed effetti simili erano stati riscontrati dopo somministrazione di ACTH e di un estratto di corteccia surrenalica. (Cartwright et al. 1950)

Il meccanismo con cui l'iposideremia si verifica è legato all'attività dell'epcidina, sintetizzata dal fegato, la cui espressione genica aumenta in modo considerevole sotto stimolazione delle citochine infiammatorie, in particolare dell'IL-6.

L'epcidina agisce limitando la fuoriuscita di ferro dalle cellule e favorendone invece l'immagazzinamento sotto forma di molecole di ferritina, soprattutto da parte degli epatociti e dei macrofagi coinvolti nell'emocateresi. Essa riduce inoltre l'assorbimento intestinale di ferro.

Diminuisce così la quota di ferro presente nel plasma legato alla transferrina e in generale la disponibilità di ferro per i processi metabolici dell'organismo, che in caso di infiammazione cronica si concretizza nella comparsa di anemia microcitica ipocromica, cosiddetta anemia infiammatoria.

Già nel 1946 era stato osservato che in corso di infiammazione cronica si trovavano maggiori quantità di ferro immagazzinate nel fegato e nella milza e che l'aumento di ferro in questi organi corrispondeva alla quantità di ferro non utilizzato per la sintesi dell'emoglobina. La somministrazione endovenosa di ferro radioattivo contribuiva solo in minima parte all'aumento dei depositi di ferro nel fegato e nella milza, mentre non aveva effetti sulla produzione di emoglobina.

(Greenberg et al. 1946)

Riguardo al comportamento biologico dell'epcidina e agli effetti dell'infiammazione sulla sideremia, sono presenti in letteratura diversi studi sperimentali sul topo e sull'uomo, dove i soggetti sottoposti ad insulto flogistico riportano in breve tempo un considerevole aumento dell'espressione genica di epcidina seguita da una significativa riduzione dei livelli sierici di ferro.

Ad esempio Nicolas et al. nel 2002, iniettando olio di trementina nel cuscinetto adiposo interscapolare di topi da laboratorio, hanno evidenziato che l'espressione genica dell'epcidina aumentava di 2 volte a 6 ore dall'insulto flogistico, raggiungendo un incremento di 6 volte a 16 ore. La riduzione dei livelli sierici di ferro veniva registrata a 16 ore dall'iniezione ed il suo decremento era di 2 volte rispetto ai valori basali. Gli stessi autori riferiscono di un drammatico incremento nell'espressione genica dell'epcidina in topi con reazione infiammatoria da adenovirus 1 giorno dopo l'infezione, ma i dati di questa osservazione non sono disponibili.

Nell'uomo, sia l'infusione diretta di IL-6 che quella di LPS di *Escherichia coli* (che provoca l'induzione di IL-6 endogena in 3 ore) sono in grado di determinare un marcato incremento dell'epcidina urinaria entro 6 ore, seguito dalla riduzione della sideremia del 34% nel primo caso e di 2,5 volte rispetto ai valori basali nel secondo. (Nemeth et al. 2004; Kemna et al. 2005)

Più recentemente è stato condotto un lavoro sulla specie canina, nel quale 5 cani sono stati sottoposti a ripetute iniezioni sottocutanee di olio di trementina (ogni 3 giorni per un periodo di 45 giorni) allo scopo di provocare uno stato di infiammazione cronica tale da indurre la comparsa di anemia infiammatoria.

Durante questo studio sono stati monitorati vari parametri, tra cui quelli eritrocitari, la CRP come marker infiammatorio che confermasse lo stato di infiammazione in atto, il ferro sierico e l'espressione di epcidina-mRNA.

E' risultato che l'espressione genica di epcidina era aumentata già dopo la prima iniezione di trementina e che anche la concentrazione di ferro aveva subito un forte decremento nei giorni immediatamente successivi, tuttavia la sideremia ha dimostrato un ritorno ai livelli normali al 4° giorno per poi riprendere a calare in modo più graduale nel successivo periodo di studio, raggiungendo livelli significativamente ridotti al 14° giorno. Le analisi hanno quindi dimostrato un trend negativo della concentrazione

sierica di ferro fino al 45° giorno, successivamente al quale il trend è tornato positivo. L'ultima misurazione fatta a 56 giorni dall'inizio dello studio (11 giorni dopo l'ultima iniezione di olio di trementina) mostra una sideremia di poco inferiore ai valori che erano presenti al giorno 0, con una differenza al di sotto dei livelli di significatività. I parametri eritrocitari misurati ogni 14 giorni hanno evidenziato l'effettiva comparsa di una moderata anemia caratterizzata dalla riduzione di MCV, Hb e MCHC che si è mantenuta non rigenerativa fino al 45° giorno, mentre alla misurazione del 56° ha dimostrato un miglioramento dei vari parametri unitamente alla comparsa di una risposta rigenerativa con il 2,6% di reticolociti. (Chikazawa, Nakazawa, et al. 2013)

2.5.4 Condizioni che possono influenzare la concentrazione plasmatica di ferro

- Variazioni circadiane della sideremia

E' stato osservato che i livelli sierici di ferro sono soggetti a fluttuazioni circadiane che, secondo un lavoro recente, determinano concentrazioni più elevate la mattina rispetto alla sera così come avviene nell'uomo. Il lavoro del 2013 di Chikazawa et al. ha infatti studiato le variazioni giornaliere della sideremia in 5 cani sani, eseguendo 4 misurazioni a orari prestabili della giornata.

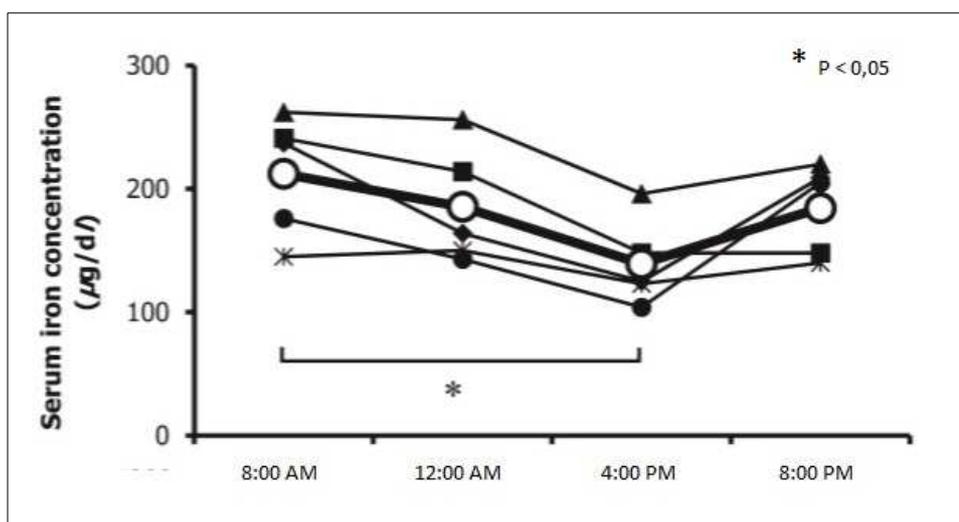


Figura 2 – Variazioni circadiane delle concentrazioni sieriche di ferro (Chikazawa, Hori, et al. 2013, modificato)

Le fluttuazioni delle concentrazioni sieriche di ferro nei diversi soggetti sono apparse concordi, dimostrando i massimi livelli di ferro alle 8:00 AM con una concentrazione media di 212,2 µg/dL e i minimi livelli di ferro alle 4:00 PM con una concentrazione media di 139,2 µg/dL.

A titolo di conferma, la valutazione della sideremia è stata poi ripetuta negli stessi soggetti un giorno diverso, agli orari 8:00 AM e 4:00 PM, riscontrando risultati simili. (Chikazawa, Hori, et al. 2013)

Tuttavia uno studio eseguito nel 1987 con lo scopo di verificare la correlazione tra i livelli sierici di ferro e quelli del cortisolo endogeno, aveva ottenuto risultati opposti rilevando le più basse concentrazioni di ferro al mattino (ore 7:00 AM) con una media

di 147 +/- 9 µg/dL e le più alte nel primo pomeriggio (ore 3:00 PM) con una media di 164 +/- 9 µg/dL. (Harvey 1987)

Pertanto, la valutazione delle fluttuazioni circadiane del ferro sierico sarebbe certamente un elemento da tenere in considerazione per una più accurata interpretazione dei dati nella pratica clinica, ma le informazioni disponibili in letteratura sono ancora troppo scarse e risultano discordanti.

- Età

I cuccioli possono avere livelli più bassi di ferro rispetto ai cani adulti.

L'influenza dell'età e del sesso su alcuni parametri del profilo biochimico è stata indagata nel 2006 con un lavoro su sieri ottenuti da cani doberman in età compresa tra 2 e 36 mesi. Per quanto riguarda il ferro non è stata riscontrata alcuna influenza del sesso sulle sue concentrazioni sieriche, mentre è stata rilevata una correlazione positiva tra età e sideremia.

Suddividendo i campioni di siero in 4 gruppi in base all'età dei soggetti è risultato quanto segue:

ETÀ'	Da 2 a 6 mesi	Da 7 a 12 mesi	Da 13 a 24 mesi	Da 25 a 35 mesi
CONCENTRAZIONE MEDIA DI FERRO SIERICO IN µg/dL	79,89	124,04	127,07	136,26

Tabella 2.4 – Concentrazioni sieriche di ferro in relazione all'età (Mundim et al. 2006, modificato)

- Glucocorticoidi

I glucocorticoidi sono capaci di determinare un rapido e significativo incremento del ferro sierico.

Dosaggi immunosoppressivi di prednisone (2 mg/kg bid) provocano un aumento dei livelli di ferro sierico in 24 ore. La somministrazione protratta per diversi giorni (da 3 a 7 giorni) è associata all'incremento progressivo delle concentrazioni plasmatiche di ferro, che in 48 ore generalmente risultano raddoppiate. Interrompendo la somministrazione di glucocorticoidi si assiste al ritorno della sideremia ai valori iniziali dopo circa 3 giorni. (Harvey 1987; Adamama-Moraitou et al. 2005)

Anche la somministrazione di glucocorticoidi a dosaggi antinfiammatori (0,5 mg/kg bid) provoca un aumento della sideremia rapido ed evidente, seppure i valori raggiunti giorno per giorno risultino inferiori rispetto a quelli ottenuti con dosaggi immunosoppressivi di glucocorticoidi.

(Adamama-Moraitou et al. 2005)

Alcuni autori ritengono che anche il cortisolo endogeno ai livelli fisiologici sia in grado di influenzare la sideremia provocandone fluttuazioni circadiane positivamente correlate con i livelli di glucocorticoidi. (Harvey 1987)

Non sono disponibili informazioni in merito all'effetto di eccessivi livelli di glucocorticoidi endogeni (come può avvenire in caso di stress o di morbo di Cushing) sulla sideremia.

PARTE SPERIMENTALE

3 INTRODUZIONE ALLA PARTE SPERIMENTALE

Per la parte sperimentale di questa tesi è stata svolta un'indagine retrospettiva su alcuni marker infiammatori della specie canina, attingendo ai dati delle analisi di laboratorio eseguite in un arco di tempo di circa 3 anni, presso il laboratorio di Patologia Clinica Veterinaria dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" del Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, e raccolti nel database del software OCIROE; questi dati sono stati analizzati da un punto di vista statistico.

I marker infiammatori che sono stati oggetto di studio sono:

- Proteina C Reattiva (CRP)
- Fibrinogeno (Fib)
- Albumina (Alb)
- Ferro (Fe)
- Numero totale dei leucociti (WBC)
- Neutrofili segmentati (NeuSeg)
- Neutrofili a banda (Band)

Inoltre, sono state considerate alcune alterazioni delle cellule leucocitarie osservabili al microscopio durante l'esecuzione della formula leucocitaria:

- Neutrofili tossici (Neu TOX)
- Monociti attivati (Mon ATT)
- Linfociti reattivi (Linf REA)

Premesso che la CRP nel cane, proteina di fase acuta principale estremamente sensibile e con emivita molto breve, può essere considerata il marker infiammatorio di elezione per diagnosticare la presenza di una patologia infiammatoria acuta, per lo svolgimento del presente lavoro è stata utilizzata come parametro discriminante per identificare la presenza o assenza di un processo infiammatorio acuto nei campioni presi in esame.

Lo scopo generale di questa tesi era quello di condurre un'indagine statistica su ampia scala, su tutti i marker ematobiochimici sopramenzionati.

Nello specifico, alcuni degli obiettivi prefissati sono stati:

- Valutare se sesso, razza o età influiscono sulla prevalenza di malattie infiammatorie;
- Analizzare la relazione esistente tra i diversi marker;
- Studiare come si comporta la CRP quando i suoi valori superano l'intervallo di riferimento, stabilendo con quale frequenza vengono raggiunti determinati livelli di incremento;
- Confrontare come Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band variano rispetto ai loro intervalli di riferimento, in relazione alla presenza di infiammazione e ai diversi valori di CRP;
- Stimare l'accuratezza di Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band come singoli marker di infiammazione e le loro rispettive sensibilità e specificità per valori che si discostano dai limiti di riferimento.

4 MATERIALI E METODI

4.1 Materiali

Il lavoro è stato svolto presso il laboratorio di Patologia Clinica Veterinaria (PCV) dell'Ospedale Didattico Veterinario "Mario Modenato" del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Pisa.

4.1.1 Strumenti e metodiche per la misurazione dei diversi parametri nel laboratorio di PCV

Il laboratorio dispone dello strumento "Liasys", fornito dalla ditta Assel[®] (Roma), un analizzatore da banco automatico a caricamento continuo per analisi cliniche di tipo chimico, controllato da un computer attraverso un suo specifico software di funzionamento. Esegue le analisi biochimiche basandosi su un principio di lettura spettrofotometrica, eseguendo reazioni End Point, reazioni Cinetiche, Fixed Time, differenziali e bicromatiche, ed utilizzando raggi di luce con una lunghezza d'onda variabile dai 340 nm ai 620 nm.

L'analizzatore "Liasys" è utilizzato per la misurazione di molti analiti, tra cui la CRP, l'Alb ed il Fe.

I reagenti con i rispettivi controlli e calibratori non sono necessariamente forniti dalla stessa ditta del macchinario.

(De Rienzo 2012)

- MISURAZIONE DELLA PROTEINA C REATTIVA

Per la determinazione della CRP viene utilizzato un metodo immunoturbidimetrico della ditta Aptec Diagnostics[®] per la CRP sierica umana che risulta adatto anche per la specie canina. Questo metodo di misurazione è stato validato con il lavoro di tesi di De Rienzo nel 2012.

Il reagente utilizzato contiene anticorpi policlonali di capra anti CRP umana. Quando questo reagente viene posto a contatto con un campione di siero canino contenente CRP, si formano complessi insolubili antigene/anticorpo che sono alla base della reazione immunoturbidimetrica.

La reazione è di tipo End Point con incubazione di 5' a temperatura ambiente e la lettura viene eseguita con una lunghezza d'onda di 340 nm contro acqua distillata.

- MISURAZIONE DELL' ALBUMINA

La misurazione dell'albumina viene eseguita attraverso un metodo colorimetrico con Bromocresolo della ditta Seac[®].

L'albumina in ambiente acido, tamponato a pH 3.8 si lega la verde bromo cresolo (BCG) formando un complesso di colore verde-blu. L'intensità di colore sviluppata, risulta direttamente proporzionale alla quantità di albumina presente nel campione. La reazione è di tipo End Point con un tempo di incubazione di 60" a temperatura ambiente. La lettura viene fatta utilizzando una lunghezza d'onda di 628 nm e contro bianco reattivo.

- MISURAZIONE DEL FERRO

Per determinare la concentrazione sierica di ferro viene utilizzato il metodo colorimetrico con Cromazurolo fornito dalla ditta Assel[®].

Il ferro presente nel campione da analizzare, a pH acido, viene liberato dalla transferrina. Il ferro trivalente e quello bivalente reagiscono con il cromazurolo B (*2,6-Dichloro-4-hydroxy-3,3dimethylfuchstone-5,5-dicarboxylicacid*) e il Cetiltrimetilammonio bromuro (CTMA), formando un complesso ternario colorato in blu. L'intensità di colore risulta direttamente proporzionale alla quantità di ferro presente nel campione. Il tempo di incubazione è di 2' a 37°C oppure 5' a temperatura ambiente, la reazione è di tipo End Point. L'assorbanza della soluzione viene letta ad una lunghezza d'onda di 623 nm.

I tipi di campione utilizzabili sono siero fresco non emolizzato o plasma con eparina.

- MISURAZIONE DEL FIBRINOGENO

Il Fib viene misurato mediante l'analizzatore automatico di coagulazione "DestinyPlus" fornito dalla ditta PRISMA[®] (Milano).

L'analizzatore utilizza il metodo Clauss (tempo di trombina modificato secondo Clauss) che si basa sulla velocità di formazione del coagulo quando nel campione di plasma citrato da analizzare viene aggiunta una soluzione ad alta concentrazione di trombina. La reazione dipende dalla concentrazione plasmatica di Fib e questa viene determinata utilizzando come riferimento la curva standard dell'analizzatore che mette in relazione i tempi di coagulazione (TT_{Clauss}) con le relative concentrazioni di Fib.

Da ottobre 2014 la curva di calibrazione dello strumento è stata allungata. Prima di questa data l'analizzatore non rilevava oltre il valore di 999 mg/dL, invece dopo tale intervento può misurare valori molto superiori a 1500 mg/dL.

- ESAME EMOCROMOCITOMETRICO STRUMENTALE

Il laboratorio PCV dispone dell'analizzatore ematologico "IDEXX ProCyte Dx[®]" della ditta IDEXX Laboratories[®] (Milano), che utilizza contemporaneamente tre diverse tecnologie per una maggiore accuratezza e completezza dell'esame. Nello specifico queste sono:

- la citometria a flusso laser, che fornisce una conta leucocitaria differenziale a cinque popolazioni,
- la fluorescenza ottica, che fornisce la conta assoluta dei reticolociti, una conta piastrinica accurata e un'ulteriore specificità nell'analisi dei componenti della conta leucocitaria,
- l'impedenza a flusso laminare, che esegue una conta eritrocitaria rapida e molto accurata poiché grazie al flusso laminare le cellule vengono allineate una ad una garantendo che ognuna di essa sia valutata in modo individuale.

Lo strumento è in grado di segnalare con elevata accuratezza la presenza di Band quando presenti in numero superiore a 500/ μL , ma non li comprende nella formula leucocitaria automatica. Quindi per avere la stima del loro valore assoluto è comunque necessario procedere alla valutazione microscopica dello striscio ematico di sangue.

(Lubas et al. 2014)

4.1.2 Intervalli di riferimento

Gli intervalli di riferimento utilizzati in questo lavoro di tesi sono i seguenti:

CRP:	0 – 0,30	mg/dL
Fib:	125 – 335	mg/dL
Alb:	2,5 – 4,1	g/dL
Fe:	90 – 180	µg/dL
WBC:	6 – 17	K/µL
NeuSeg:	3,69 – 11,9	K/µL
Band:	0 – 0,30	K/µL

4.1.3 Campioni

I campioni sono stati selezionati dal database del software OCIROE del laboratorio PCV:

- campioni di siero appartenenti alla specie canina con valori di CRP uguali o superiori a 0,30 mg/dL, che presentavano la contemporanea misurazione di Fib, Alb e Fe e che erano associati ad un campione ematico con lo stesso codice di laboratorio sul quale era stato eseguito un esame emocromocitometrico completo;
- campioni di siero appartenenti alla specie canina con valori di CRP uguali o inferiori a 0,29 mg/dL, che presentavano la contemporanea misurazione di Fib, Alb e Fe e che erano associati ad un campione ematico con lo stesso codice di laboratorio sul quale era stato eseguito un esame emocromocitometrico completo.

I campioni selezionati disponevano delle seguenti informazioni segnaletiche del rispettivo paziente: data di nascita, sesso e razza; e del numero di cartella clinica.

4.2 Metodi

4.2.1 Criteri per la selezione dei campioni

I dati utilizzati nel presente lavoro sono stati raccolti utilizzando il programma File Maker®, attraverso la ricerca con parole chiave (“CRP \geq 0,30” e “CRP \leq 0,29”) all'interno dell'archivio del sistema OCIROE e successivamente estratti ed elaborati con il programma Microsoft Excel®.

I dati ottenuti appartengono ad un periodo che va dal 22/05/2012 (data che corrisponde alla prima misurazione effettuata sulla CRP in questo laboratorio) al 05/08/2015 (data in cui è cominciata la parte sperimentale di questa tesi).

La ricerca è stata condotta su due gruppi paralleli.

Nel primo la ricerca su File Maker® è stata impostata per ricavare tutte le schede relative agli esami di chimica liquida, condotti su pazienti canini, in cui la CRP risultava uguale o maggiore di 0,30 mg/dL.

Sono emerse 1122 schede, corrispondenti quindi a 1122 campioni.

Estraendo i dati della ricerca su un file Excel si è provveduto alla selezione dei campioni che erano stati analizzati anche per Fib, Alb e Fe, eliminando tutti gli altri. Inoltre sono stati controllati i dati relativi al segnalamento dei pazienti, eliminando i campioni a cui erano associati dati incompleti con omissione della data di nascita del cane, del sesso o della razza.

Il passaggio successivo è consistito nella ricerca degli esami emocromocitometrici associati a quelli ematobiochimici. Poichè ciascun campione di un paziente, dal momento della sua accettazione in laboratorio fino al momento della validazione dei risultati, risulta associato allo stesso codice di laboratorio, sono stati utilizzati i codici associati ai campioni di questa ricerca per recuperare dall'archivio informatico OCIOE i corrispettivi emogrammi.

Quando la ricerca, eseguita digitando il codice di laboratorio nell'apposita casella del programma File Maker®, dava esito positivo e si apriva il file relativo all'esame emocromocitometrico, venivano annotati i dati relativi a WBC, numero assoluto di neutrofili segmentati, numero assoluto di neutrofili a banda e la segnalazione quantitativa delle seguenti alterazioni cellulari: neutrofili tossici, monociti attivati e linfociti reattivi.

Quando invece la ricerca dava esito negativo, il campione in oggetto veniva scartato. Inoltre sono stati scartati anche quei campioni in cui era associato un esame emocromocitometrico strumentale senza la valutazione microscopica dello striscio, poiché la formula leucocitaria che propone l'analizzatore ed il relativo calcolo dei valori assoluti delle diverse popolazioni leucocitarie non è sufficientemente attendibile. Infatti in caso di deviazione a sinistra lo strumento non è in grado di quantificare la presenza dei neutrofili a banda (è solo in grado di segnalarne la sospetta presenza) di conseguenza, oltre a mancare un dato importante, la stima del valore assoluto dei neutrofili segmentati risulta inattendibile; infine senza la valutazione microscopica dello striscio ematico vengono a mancare le informazioni relative alla presenza di alterazioni cellulari (tossicità neutrofilia, attivazione dei monociti e reattività linfocitaria). I campioni rimasti da questa selezione sono risultati essere 1080.

Per il secondo gruppo la ricerca su File Maker® è stata impostata per ricavare tutte le schede relative agli esami di chimica liquida condotti su pazienti canini, in cui la CRP risultava uguale o minore di 0,29 mg/dL, ottenendo come 784 schede, corrispondenti a 784 campioni. I passaggi successivi sono stati i medesimi affrontati con il gruppo precedente, ovvero lo scarto dei campioni che non disponevano delle analisi di Fib, Alb e Fe, il recupero dei dati relativi al leucogramma dagli esami emocromocitometrici completi corrispondenti allo stesso codice di laboratorio e l'eliminazione dei campioni che non erano associati a tale tipo di analisi.

Sono quindi rimasti 757 campioni.

4.2.2 Elaborazione dei dati e metodi statistici

Dopo la selezione dei campioni i dati raccolti sono stati elaborati mediante il programma Microsoft Excel® versione 2007 e successivamente analizzati con il programma statistico MedCalc® versione 14.8.

All'interno dei due gruppi di campioni è stato individuato il numero reale di pazienti presenti, tramite il numero di cartella clinica riportato tra i dati del paziente. Il numero reale dei pazienti differiva da quello dei campioni poiché in molti casi lo stesso paziente era stato sottoposto ad analisi ematobiochimiche più di una volta. Sul numero reale dei pazienti è stata calcolata la prevalenza di malattie infiammatorie all'interno della popolazione esaminata in questo studio. La parte del lavoro statistico riguardante sesso e razza è stata anch'essa eseguita sul numero reale dei pazienti, mentre la parte successiva dello studio è stata eseguita sulla totalità dei campioni.

I dati riguardanti il sesso sono stati organizzati in una tabella di confronto creata sul programma Microsoft Excel® e trasferiti nel programma statistico MedCalc® con cui è stato eseguito il test del Chi Quadrato per valutare se le distribuzioni messe a confronto tra i due gruppi (infiammatorio CRP $\geq 0,30$ mg/dL e non infiammatorio CRP $\leq 0,29$ mg/dL) presentassero differenze significative da un punto di vista statistico.

Lo stesso procedimento è stato utilizzato per le razze. Essendo presente un elevato numero di razze che includeva pochi soggetti, per l'esecuzione del test del Chi Quadrato sono state prese in considerazione soltanto quelle in cui, in almeno uno dei due gruppi (infiammatorio CRP $\geq 0,30$ mg/dL e non infiammatorio CRP $\leq 0,29$ mg/dL), era presente un numero minimo di 10 soggetti.

Sui dati relativi al numero totale di campioni inclusi in questo studio, è stata calcolata l'età di ogni soggetto rispetto alla data del campionamento, poiché per stabilire l'età dei pazienti era necessario relazionarsi alla data del prelievo e in molti casi lo stesso paziente era stato sottoposto ad analisi in età differenti.

Sono state stabilite 5 fasce di età: < 4 mesi, $4 \leq 12$ mesi, $> 1 \leq 3$ anni, $> 3 \leq 7$ anni, > 7 anni; in base alle età calcolate per ciascun campione di entrambi i gruppi sono state conteggiate le prevalenze di soggetti con CRP $\leq 0,29$ e CRP $\geq 0,30$ mg/dL nelle diverse fasce di età e i numeri ottenuti sono stati riportati in una tabella di confronto.

Anche in questo caso è stato eseguito il test del Chi Quadrato per valutare se le distribuzioni messe a confronto tra i due presentassero differenze significative da un punto di vista statistico.

Sulle prevalenze ottenute riguardo all'età dei soggetti inclusi nei due gruppi, è stato poi calcolato il rischio relativo di insorgenza di patologie infiammatorie per ciascuna fascia di età.

Per quanto riguarda lo studio dei parametri biochimici e leucocitari presi in esame, innanzitutto sono stati osservati i valori massimi e minimi di ciascun marker (CRP, Fib, Alb, WBC, NeuSeg, Band) tramite ordinazione dei dati sul programma Microsoft Excel®.

In alcuni casi erano presenti valori che risultavano essere inverosimili o poco probabili di essere reali, motivo per cui si è deciso di cancellarli.

Inoltre per quanto riguarda il Fib, sono stati cancellati i dati che presentavano il valore "999", poiché tale valore non esprime un dato numerico ma rappresenta un dato categorico (infatti era il valore massimo misurabile dall'analizzatore fino a ottobre 2014, periodo dopo il quale è stata allungata la curva di calibrazione)

I dati sono quindi stati riportati su MedCalc® ed è stata eseguita una statistica riepilogativa su ciascun marker di entrambi i gruppi, ottenendo per ognuno di essi: il

valore minimo, il valore massimo, la media aritmetica, la mediana, la deviazione standard, i percentili, il coefficiente di asimmetria, il coefficiente di curtosi e il risultato del test di Kolmogorov-Smirnov (che verifica la forma di distribuzione dei dati).

Sui dati di ciascun marker è stata indagata la correlazione esistente con ogni altro parametro, eseguendo un'analisi di correlazione non parametrica con il test dei ranghi di Spearman e ottenendo così il coefficiente di correlazione di Spearman ed il valore di significatività.

La forma della relazione funzionale tra la CRP e gli altri marker ematologici è stata analizzata con il test della regressione multipla, impostando la CRP come variabile indipendente e Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band come variabili dipendenti. Il test ha fornito il coefficiente di determinazione R^2 corretto e, per ogni variabile indipendente il relativo livello di significatività.

Successivamente i dati sono stati di nuovo elaborati con il programma Microsoft Excel®, creando diversi sottogruppi basati sugli intervalli di riferimento dei vari marker infiammatori a confronto.

Per la CRP sono state definite delle “fasce di incremento” basate sull'entità dell'innalzamento dei suoi valori all'interno del gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL):

- 2x = intervallo 0,30 - 0,60 mg/dL,
- 4x = intervallo 0,61 - 1,2 mg/dL,
- 8x = intervallo 1,21 - 2,4 mg/dL,
- 12x = intervallo 2,41 - 3,6 mg/dL,
- 30x = intervallo 3,61 - 9,1 mg/dL

Mediante il conteggio dei campioni ordinati in ordine crescente per i valori di CRP si sono ottenute le frequenze di distribuzione assolute dei campioni nelle diverse fasce di incremento.

Per studiare la distribuzione degli altri parametri, Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band, sono state definite le seguenti classi di distribuzione:

- “basso” : classe in cui sono stati raggruppati i campioni che presentavano valori del parametro in esame al di sotto del suo intervallo di riferimento,
- “normale”: classe in cui sono stati raggruppati i campioni con valori del parametro in esame all'interno del normale intervallo di riferimento,
- “alto”: classe in cui sono stati raggruppati i campioni con valori del parametro in esame al di sopra dell'intervallo di riferimento.

Studiando un parametro alla volta e procedendo come prima, sono state ricavate le frequenze assolute di distribuzione nelle 3 classi. Solo per quanto riguarda i Band le classi utilizzate sono state 2: “normale” e “alto”, dal momento che il limite inferiore dell'intervallo di riferimento è 0 e non esiste quindi la possibilità di avere valori “bassi”.

Nel dettaglio, l'indagine è stata condotta in due fasi.

- 1) La prima è stata eseguita sui due gruppi principali: infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) e non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL).

I dati delle frequenze assolute sono poi stati convertiti in valori percentuali per poter meglio confrontare i risultati. Nel confronto dei risultati è stato calcolato il rapporto tra i valori percentuali delle frequenze di distribuzione ricavate nei due gruppi: un rapporto maggiore corrisponde ad una maggior differenza tra le frequenze espresse nella classe di distribuzione in esame.

- 2) La seconda invece è stata eseguita sui sottogruppi creati in base alle fasce di incremento della CRP. Per ogni fascia di incremento si sono quindi osservate le frequenze di distribuzione degli altri parametri nelle classi “basso”/“normale”/“alto”, ottenendo uno studio più dettagliato delle distribuzioni dei vari parametri in relazione ai valori della CRP. Anche in questo caso le frequenze assolute sono state convertite in frequenze percentuali ed è stato calcolato il rapporto tra i valori delle frequenze messe a confronto.

Successivamente, è stata focalizzata l’attenzione sulle sole “classi infiammatorie”, ovvero sulle classi che, in corso di infiammazione, rappresentano l’alterazione tipica per ciascun parametro. Quindi per Fib, WBC, NeuSeg e Band è stata osservata la classe “alto”, mentre per Alb e Fe è stata osservata la classe “basso”.

Con questo criterio, rielaborando i dati con il programma Microsoft Excel®, sono stati selezionati diversi sottogruppi all’interno di quello infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) e non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL), provando a combinare la presenza di più alterazioni infiammatorie contemporaneamente e osservando il numero di campioni che presentava le alterazioni selezionate.

Nello specifico i sottogruppi indagati sono stati:

- | | | |
|----------------------------------|-------------------------------------|--|
| • Fib alto e Alb bassa | • Fib alto e Fe basso | • Alb bassa e Fe basso |
| • Fib alto, Alb bassa e Fe basso | • WBC alti e NeuSeg alti | • WBC alti e Band alti |
| • NeuSeg alti e Band alti | • WBC alti, NeuSeg alti e Band alti | • Fib alto, Alb bassa, Fe basso, WBC alti, NeuSeg alti e Band alti |

Dalla frequenza assoluta emersa per ciascun sottogruppo è stata calcolata quella percentuale rispetto al numero totale di campioni del gruppo principale di appartenenza. Infine i valori delle frequenze assolute di ciascun sottogruppo, emersi dai campioni del gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) e da quelli del gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL), sono stati messi a confronto calcolandone il rapporto.

Con procedimento analogo, dai due gruppi principali (infiammatorio $CRP \geq 0,30$ mg/dL e non infiammatorio $CRP \leq 0,29$ mg/dL) sono stati selezionati solo i campioni che non presentavano alcuna alterazione dei parametri Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band, quindi quelli in cui tali parametri rientravano tutti nella classe “normale”.

I campioni così estratti dai due gruppi principali (infiammatorio $CRP \geq 0,30$ mg/dL e non infiammatorio $CRP \leq 0,29$ mg/dL) sono stati conteggiati ottenendo la frequenza assoluta, poi è stata calcolata quella percentuale rispetto al numero totale di campioni del gruppo principale di appartenenza.

Infine, nei campioni estratti dal gruppo infiammatorio, è stata indagata la distribuzione all’interno delle fasce di incremento della CRP, ottenendo per ciascuna di esse i valori di frequenza assoluta.

Per una valutazione statistica di accuratezza, sensibilità e specificità diagnostica dei marker infiammatori Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band rispetto alla CRP, i dati sono stati prima organizzati sul programma Microsoft Excel® nel modo necessario a eseguire

l'analisi statistica con curva ROC (Receiver-Operating Characteristic) sul programma MedCalc®.

Al file relativo ai campioni del gruppo infiammatorio e a quello del gruppo non infiammatorio è stata aggiunta una colonna titolata "diagnosi". Per tutti i campioni del gruppo infiammatorio (con $CRP \geq 0,30$ mg/dL) nelle celle della colonna "diagnosi" è stato inserito il valore 1, indicativo di diagnosi positiva di malattia infiammatoria. Per tutti i campioni del gruppo non infiammatorio (con $CRP \leq 0,29$ mg/dL) nelle celle della stessa colonna è stato inserito il valore 0, indicativo di diagnosi negativa e quindi assenza di malattia infiammatoria.

Quindi i dati sono stati riuniti in un unico file e trasferiti sul programma MedCalc® con il quale è stato eseguito il test della curva ROC.

Il test ha fornito la stima di sensibilità e specificità diagnostica per tutti i valori dei parametri confrontati con la CRP per la diagnosi di patologia infiammatoria e i valori di AUC come indice di accuratezza del test.

La presenza di alterazioni cellulari (Neu TOX, Mon ATT e Linf REA) era segnalata nei dati di ciascun campione con i simboli -/+, +, ++, +++, +++++, indicativi dell'intensità con cui tale alterazione era stata osservata al microscopio. I simboli sono stati convertiti in valori numerici da 1 a 5. L'assenza di alterazioni è stata indicata con il valore 0.

Sul programma Microsoft Excel®, mediante l'ordinazione dei dati per valore crescente delle colonne corrispondenti ai diversi tipi di alterazione, è stato così possibile contare il numero di campioni (sia nel gruppo infiammatorio $CRP \geq 0,30$ mg/dL che in quello non infiammatorio $CRP \leq 0,29$ mg/dL) che presentava Neu TOX, Mon ATT o Linf REA, ottenendo così la frequenza assoluta di tali alterazioni nei due gruppi principali a confronto (infiammatorio $CRP \geq 0,30$ mg/dL e non infiammatorio $CRP \leq 0,29$ mg/dL). Nel dettaglio, è stata osservata anche la frequenza assoluta dei diversi gradi di intensità con cui le alterazioni erano state segnalate.

Sulla frequenza assoluta totale di ciascuna alterazione è stata poi calcolata la frequenza percentuale rispetto al numero totale dei campioni del gruppo di appartenenza.

Su questi valori è stato fatto un confronto calcolando il rapporto delle frequenze percentuali espresse nei due gruppi a confronto per ciascuna alterazione cellulare.

Sui dati delle alterazioni cellulari associati ai dati della CRP, è stata infine eseguita l'analisi di correlazione per ranghi di Spearman che ha fornito per ciascun tipo di alterazione cellulare il coefficiente di correlazione con la CRP ed il relativo valore di significatività.

5 RISULTATI

Nel gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) sono stati inclusi 1080 campioni, identificando 980 pazienti. Nel gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL) sono stati inclusi 757 campioni, identificando 668 pazienti.

91 cani sono risultati presenti sia nel gruppo infiammatorio che in quello non infiammatorio.

La prevalenza apparente di malattie infiammatorie acute sulla popolazione studiata è del 59%.

5.1 Distribuzione della popolazione in base al sesso

Sulla base del numero di pazienti sono stati contati i soggetti appartenenti alle seguenti categorie di sesso: femmina intera (FI), femmina sterilizzata (FS), maschio intero (MI), maschio castrato (MC) (vedi Tabella 5.1).

Gruppo	FI	FS	MI	MC
Infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL)	263	187	493	37
Non Infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL)	203	119	333	13

Tabella 5.1 – Distribuzione della popolazione dei due gruppi in base al sesso (frequenze assolute), nelle categorie FI (femmina intera) FS (femmina sterilizzata) MI (maschio intero) e MC (maschio castrato).

Di seguito il grafico in Figura 5.1 con le relative percentuali.

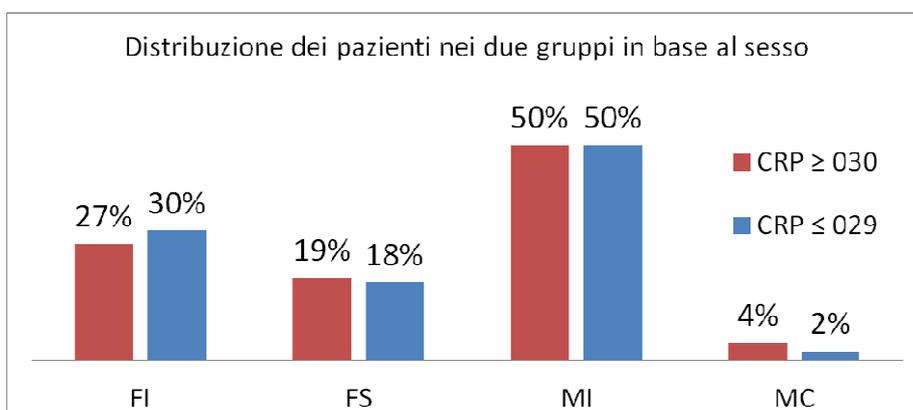


Figura 5.1 – Distribuzione della popolazione dei due gruppi in base al sesso (frequenze percentuali), nelle categorie FI (femmina intera) FS (femmina sterilizzata) MI (maschio intero) e MC (maschio castrato).

La distribuzione dei soggetti all'interno dei due gruppi è risultata essere omogenea, ciò esclude la presenza di *selection bias*, ovvero di un errore sistematico dell'indagine statistica dovuto alla scelta di una popolazione sistematicamente deviata.

Sui dati relativi al sesso è stato eseguito il test del Chi Quadrato ed il livello di significatività è risultato $P > 0,05$ (ns).

5.2 Distribuzione della popolazione in base alle razze

Sulla base del numero di pazienti sono state individuate 94 razze, oltre alla categoria “**Meticcio**” che è risultata essere quella più rappresentata con 328 soggetti nel gruppo infiammatorio (CRP \geq 0,30 mg/dL) e 178 soggetti in quello non infiammatorio (CRP \leq 0,29 mg/dL).

In ordine decrescente le razze rappresentate in entrambi i gruppi sono:

Labrador (73/55), Pastore Tedesco (52/28), Setter (45/27), Boxer (32/32), Golden Retriever (26/23), Bassotto (22/20), Cocker Spaniel (22/18), Rottweiler (21/9), Dobermann (17/11), Barboncino (16/14), Beagle (14/14), Bracco (14/6), Border Collie (13/15), Springer Spaniel (13/7), Jack Russel Terrier (12/15), Breton (12/9), Corso (12/4), Bovaro del Bernese (11/8), Shih Tzu (9/11), Pincher (9/5), Carlino (9/4), Segugio (9/3), Maltese (8/5), Lagotto (8/4), Levriero (8/4), Weimaraner (8/4), Pointer (7/6), Chihuahua (7/2), Yorkshire (6/6), Terranova (6/5), West Highland White Terrier (6/5), American Staffordshire (6/4), Pechinese (6/1), Cavalier King Charles Spaniel (5/9), Bolognese (5/6), Pitt Bull (5/5), Akita Inu (5/3), Dogue de Bordeaux (5/3), Schnautzer (4/4), Alano (4/2), Pastore Belga (4/2), Scotch Collie (4/1), Bulldog Francese (3/7), Dogo Argentino (3/4), Pastore Maremmano (3/3), Schnautzer Gigante (3/3), Spitz (3/3), Basset Hound (3/2), Bulldog Inglese (5/3), Pastore Australiano (3/2), Welsh Terrier (3/2), Pastore della Brie (3/1), Siberian Husky (2/3), Chow Chow (2/2), Barbone (2/1), Drahtaar (2/1), Leonberger (2/1), Lupo Cecoslovacco (1/4), Montagna dei Pirenei (1/2), Terrier (1/2), Bichon Frisee (1/1), Bobtail (1/1), Kelpie (1/1), Mastino Napoletano (1/1), Parson Jack Russel Terrier (1/1), San Bernardo (1/1).

Le seguenti razze erano rappresentate solo nel gruppo infiammatorio (CRP \geq 0,30 mg/dL): **Scottish Terrier (3), Bichon Avaneese (2), Dalmata (2), Kurzhaar (2), Shar Pei (2), Spinone Italiano (2), Australian Cattle (1), Boston Terrier (1), Briard (1), Hovaward (1), Mastiff (1), Mastino Francese (1), Petit Basset Griffon Vendeen (1), Samoiedo (1).**

Queste razze invece erano rappresentate solo nel gruppo non infiammatorio (CRP \leq 0,29 mg/dL): **Alaskan Malamute (4), Volpino (3), Pastore dell'Asia Centrale (2), Basset de Gascogne (1), Bearded Collie (1), Bull Mastiff (1), Bull Terrier (1), Bulldog Americano (1), Cane da ferma a pelo duro (1), Grifone (1), Manchester Terrier (1), Mastino dei Pirenei (1), Pastore delle Alpi Apuane (1).**

Per la valutazione dell'omogeneità di distribuzione e per l'esecuzione del test del Chi Quadrato sono state scartate le razze in cui la rappresentanza era inferiore a 10 cani per entrambi i gruppi.

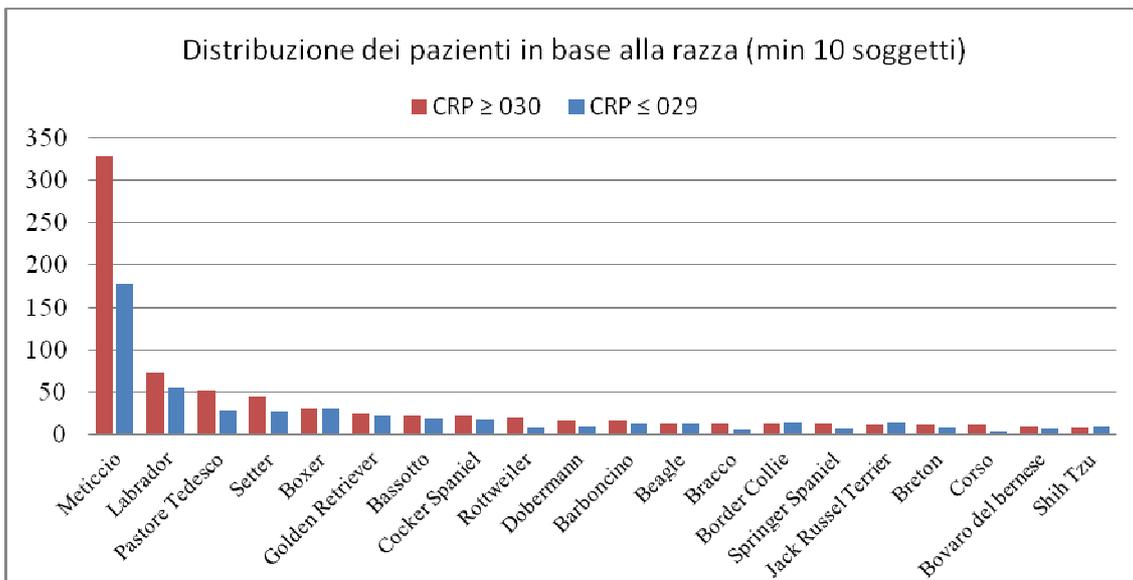


Figura 5.2 – Distribuzione della popolazione dei due gruppi in base alla razza (frequenze assolute), per razze con minimo 10 soggetti in almeno uno dei due gruppi.

Il livello di significatività è risultato essere $P > 0,05$ (ns).

5.3 Distribuzione della popolazione in base all'età

Lavorando sui dati relativi al numero di campioni, con le “età” calcolate sulla data di nascita del paziente rispetto alla data di ogni campionamento e la creazione di 5 classi di distribuzione corrispondenti a 5 diverse fasce di età, sono emersi i seguenti dati (vedi Tabella 5.3.1)

ETA'	Infiamm. CRP ≥ 0,30 mg/dL	Non Inf. CRP ≤ 0,29 mg/dL
< 4 mesi	8	7
≥ 4 ≤ 12 mesi	45	54
> 1 ≤ 3 anni	78	106
> 3 ≤ 7 anni	242	232
> 7 anni	707	358

Tabella 5.3.1 – Distribuzione della popolazione dei due gruppi in base all'età (frequenze assolute).

Di seguito il grafico con le relative percentuali.

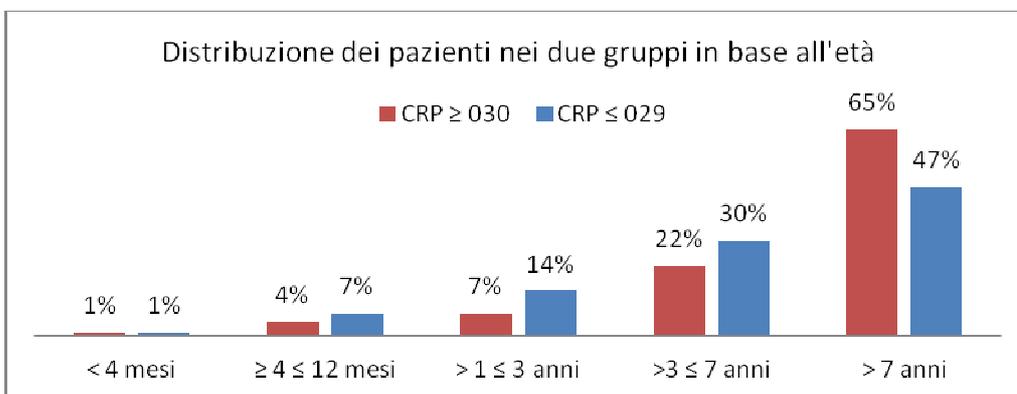


Figura 5.3 – Distribuzione della popolazione dei due gruppi in base all'età (frequenze percentuali). Eseguendo il test del Chi Quadrato è stato ottenuto un livello di significatività

P < 0,0001.

Lo studio del rischio relativo di insorgenza di patologie infiammatorie rispetto all'età ha fornito i risultati riportati nella Tabella 5.3.2.

Età	< 4 mesi	≥ 4 ≤ 12 mesi	> 1 ≤ 3 anni	> 3 ≤ 7 anni	> 7 anni
Rischio relat.	0,80	0,58	0,52	0,73	1,38
P	> 0,05 (ns)	0,006	< 0,0001	0,0001	< 0,0001

Tabella 5.3.2 – Rischio relativo di insorgenza di patologie infiammatorie rispetto all'età e significatività (P).

5.4 Dati della statistica riepilogativa

Nella Tabella 5.4 sono riassunti i risultati della statistica riepilogativa.

Gruppo	Valore minimo	Valore massimo	Media Aritm.	Mediana	Dev. Stand.	2,5° Pctl	97,5° Pctl	Coeff. Asimm.	Coeff. Curtosi
CRP (mg/dL)									
Infiamm.	0,4	9,1	1,4	1,1	0,4	0,4	3,9	2,49	10,50
Non Inf.	0,0	0,2	0,1	0,1	0,0	0,0	0,2	0,25	- 1,28
Fib (mg/dL)									
Infiamm.	10	2737	512	430	374	53	1404	2,23	8,40
Non Inf.	40	2648	331	271	224	92	900	3,42	24,36
Alb (g/dL)									
Infiamm.	1,07	4,59	3,01	3,06	0,61	1,74	4,15	- 0,24	- 0,10
Non Inf.	0,88	4,74	3,30	3,34	0,53	2,12	4,31	- 0,50	1,18
Fe (µg/dL)									
Infiamm.	31	409	131	116	63	49	294	1,41	2,45
Non Inf.	25	434	151	140	56	67	311	1,58	4,10
WBC (K/µL)									
Infiamm.	0,23	116,83	15,83	12,70	11,50	3,89	48,42	2,75	12,77
Non Inf.	0,34	159,52	10,42	8,78	8,85	4,39	26,75	9,54	131,55
NeuSeg (K/µL)									
Infiamm.	0,06	68,12	12,16	9,77	8,84	2,25	37,05	1,99	5,44
Non Inf.	0,18	132,39	7,56	6,04	7,41	2,63	22,17	9,25	127,57
Band (K/µL)									
Infiamm.	0,00	38,54	0,32	0,00	1,57	0,00	2,27	16,17	350,50
Non Inf.	0,00	16,42	0,07	0,00	0,82	0,00	0,35	17,77	332,82

Tabella 5.4 – Risultati della statistica riepilogativa per Proteina C Reattiva (CRP), Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), Leucociti (WBC), Neutrofilo Segmentati (NeuSeg) e Neutrofilo Banda (Band).

Per tutti i parametri il test di Kolmogorov-Smirnov definisce la distribuzione non normale.

5.5 Correlazione tra i marker infiammatori

Nella Tabella 5.5 sono riportati i risultati dell'analisi di correlazione non parametrica eseguita mediante il test dei ranghi di Spearman.

R\P	CRP	Fib	Alb	Fe	WBC	NeuSeg	Band
CRP		3,66 ⁻²³	2,14 ⁻¹⁵	2,44 ⁻³	4,85 ⁻²⁰	3,06 ⁻²³	8,06 ⁻⁸
Fib	0,26		5,52 ⁻⁶	1,59 ⁻³	1,22 ⁻⁸	8,64 ⁻¹⁰	1,02 ⁻⁴
Alb	-0,21	-0,12		7,92 ⁻¹²	1,74 ⁻¹⁷	8,7 ⁻¹⁴	2,64 ⁻⁸
Fe	-0,08	-0,08	0,18		0,57	0,75	0,54
WBC	0,24	0,15	-0,22	0,01		0	5,76 ⁻¹⁰⁷
NeuSeg	0,26	0,16	-0,20	-0,01	0,92		1,14 ⁻⁷³
Band	0,14	0,10	-0,15	-0,01	0,54	0,45	

Tabella 5.5 – Correlazione tra i parametri infiammatori Proteina C Reattiva (CRP), Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), Leucociti (WBC), Neutrofil Segmentati (NeuSeg) e Neutrofil Banda (Band): coefficiente di correlazione per ranghi di Spearman (R) e livello di significatività (P).

5.6 Rapporto tra CRP e gli altri marker infiammatori

Con il test della regressione multipla è stato analizzato il rapporto tra la variabile dipendente CRP e le variabili indipendenti Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg, Band, in entrambi i gruppi.

La Tabella 5.6 riporta:

- il valore R^2 corretto, quando risulta prossimo a 1 significa che le variabili indipendenti sono buoni indicatori della variabile dipendente,
- il valore di significatività P di ciascuna variabile indipendente, che indica quale di queste variabili possiede valore predittivo rispetto alla variabile dipendente.

Gruppo	R^2 corretto	Fib	Alb	Fe	WBC	NeuSeg	Band
Infiamm.	0,05	P = 0,0001	P > 0,05 (ns)	P = 0,003			
Non Inf.	0,02	P = 0,0013	P > 0,05 (ns)				

Tabella 5.6 – Rapporto tra la variabile dipendente Proteina C Reattiva e le variabili indipendenti Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), Leucociti (WBC), Neutrofil Segmentati (NeuSeg) e Neutrofil Banda (Band): coefficiente di determinazione (R^2 corretto) e livelli di significatività (P)

5.7 Fasce di incremento della CRP

Il gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) è stato suddiviso in 5 sottogruppi, ognuno rappresentante una specifica fascia di incremento, ed il numero totale di campioni (1080) risulta distribuito come illustrato in Tabella 5.7.

Incremento	Intervallo dei valori (mg/dL)	Frequenza assoluta
2x	0,30 - 0,60	266
4x	0,61 - 1,20	326
8x	1,21 - 2,40	347
12x	2,41 - 3,60	105
30x	3,61 - 9,10	36

Tabella 5.7 – Distribuzione dei campioni del gruppo infiammatorio in base a diverse fasce di incremento dei valori di Proteina C Reattiva (CRP).

Gli stessi risultati rappresentati in grafico:

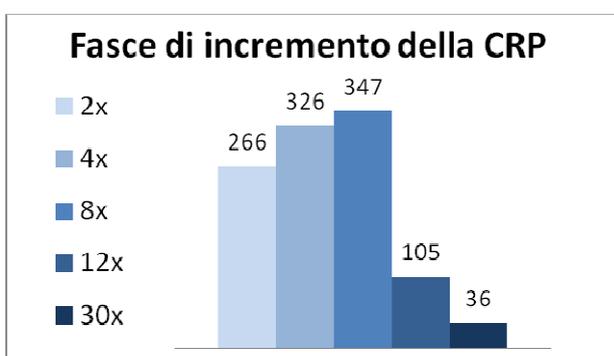


Figura 5.7 - Frequenze assolute per le diverse fasce di incremento della CRP.

5.8 Distribuzioni dei marker infiammatori

5.8.1 Tra gruppo infiammatorio e gruppo non infiammatorio

La distribuzione dei marker infiammatori Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg, Band all'interno delle classi di frequenza "basso" / "normale" / "alto" (stabilite in base ai limiti di riferimento utilizzati in laboratorio per ciascun parametro analitico) è risultata significativamente diversa nei due gruppi principali infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) e non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL).

➤ Frequenze di distribuzione del gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL)

CLASSE di FREQUENZA:	Fib	Alb	Fe	WBC	NeuSeg	Band
Basso	48	215	292	82	78	x
Normale	225	830	600	658	567	899
Alto	701	32	186	337	427	181

Tabella 5.8.1 - Distribuzione dei marker infiammatori nelle classi di frequenza basso/normale/alto, per il gruppo infiammatorio (frequenze assolute)

- Frequenze di distribuzione del gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL)

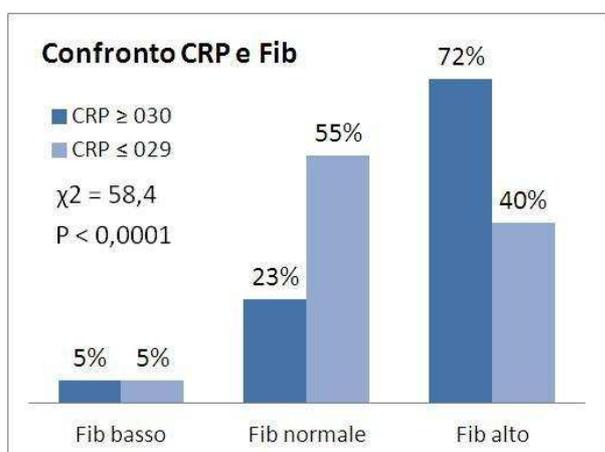
CLASSE di FREQUENZA:	Fib	Alb	Fe	WBC	NeuSeg	Band
Basso	38	57	61	99	79	x
Normale	417	661	539	608	604	736
Alto	301	39	157	50	74	21

Tabella 5.8.2 - Distribuzione dei marker infiammatori nelle classi di frequenza basso/normale/alto, per il gruppo non infiammatorio (frequenze assolute)

Le frequenze assolute sopra riportate sono state convertite in frequenze percentuali per poter meglio confrontare i dati.

Si riportano di seguito i grafici ottenuti dalle frequenze percentuali con i valori del Chi Quadrato e del livello di significatività ottenuto mediante tale test statistico.

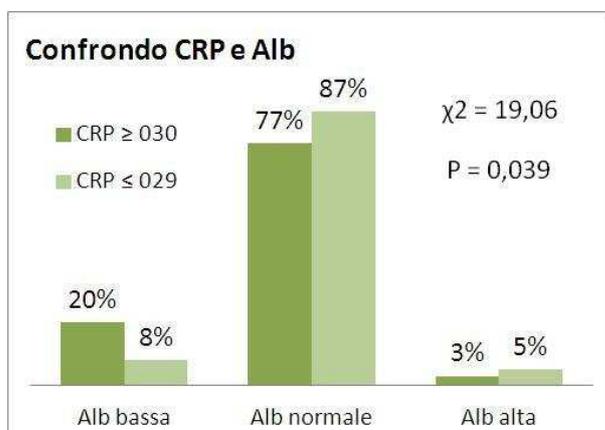
➤ Fibrinogeno



La classe di distribuzione in cui la differenza nelle frequenze percentuali tra i due gruppi è maggiore è quella del “Fib normale” con un rapporto di 2,3 a favore del gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL), seguita dalla classe “Fib alto” la cui differenza tra i due gruppi è espressa da un rapporto di 1,8 a favore del gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL). La classe “Fib basso” è invece egualmente rappresentata nei due gruppi.

Figura 5.8.1 - Distribuzione del Fibrinogeno nelle classi basso/normale/alto per i due gruppi ($CRP \geq 0,30$ e $CRP \leq 0,29$), frequenze percentuali, valore di Chi Quadrato (χ^2) e livello di significatività (P).

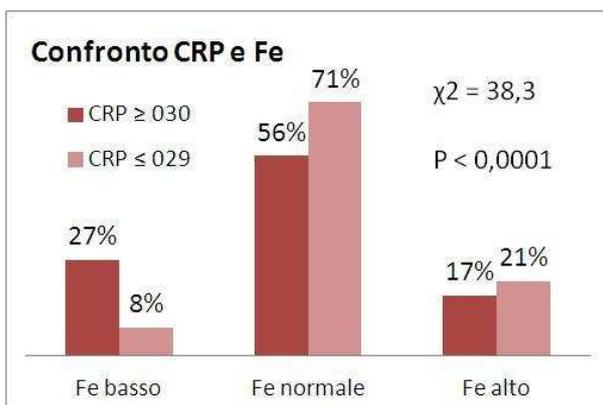
➤ Albumina



La classe in cui la differenza di distribuzione tra i due gruppi è maggiore è “Alb bassa” con un rapporto di 2,5 a favore del gruppo infiammatorio. La classe “Alb alta” presenta una differenza di distribuzione che si esprime con un rapporto di 1,7 a favore del gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL), mentre la classe “Alb normale” è pressoché egualmente distribuita nei due gruppi a confronto, poiché il rapporto dei due valori percentuali è di 1,1.

Figura 5.8.2 - Distribuzione dell' Albumina nelle classi bassa/normale/alta per i due gruppi ($CRP \geq 0,30$ e $CRP \leq 0,29$), frequenze percentuali, valore di Chi Quadrato (χ^2) e livello di significatività (P).

➤ Ferro

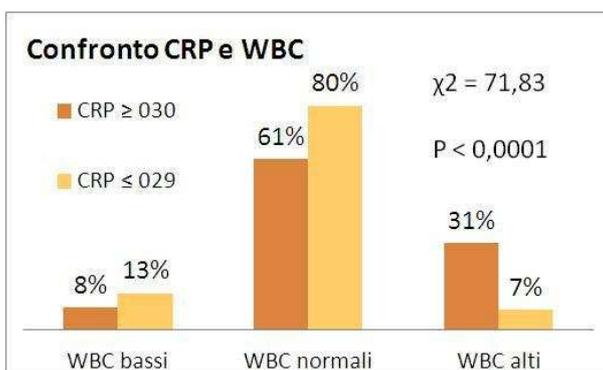


La classe di distribuzione con la maggiore differenza nelle frequenze percentuali tra i due gruppi è “Fe basso” con un rapporto di 3,4 a favore del gruppo infiammatorio (CRP ≥ 0,30 mg/dL).

Le classi “Fe normale” e “Fe alto” esprimono invece una differenza molto più bassa rispettivamente di 1,3 e 1,2 a favore del gruppo non infiammatorio.

Figura 5.8.3 - Distribuzione del Ferro nelle classi basso/normale/alto per i due gruppi (CRP ≥ 0,30 e CRP ≤ 0,29), frequenze percentuali, valore di Chi Quadrato (χ^2) e livello di significatività (P).

➤ Leucociti

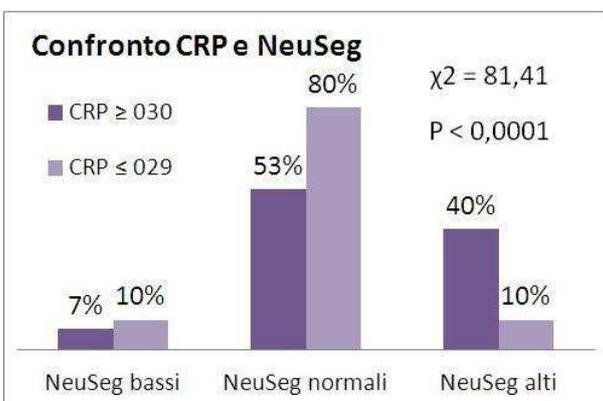


La classe che mostra la maggiore differenza tra i due gruppi è quella dei “WBC alti” con un rapporto di 4,4 a favore del gruppo infiammatorio (CRP ≥ 0,30 mg/dL).

La classe “WBC bassi” esprime invece un rapporto di 1,6 tra le distribuzioni dei due gruppi e quella dei “WBC normali” un rapporto di 1,3 entrambi a favore del gruppo non infiammatorio (CRP ≤ 0,29 mg/dL).

Figura 5.8.4 - Distribuzione dei Leucociti nelle classi bassi/normali/alti per i due gruppi (CRP ≥ 0,30 e CRP ≤ 0,29), frequenze percentuali, valore di Chi Quadrato (χ^2) e livello di significatività (P).

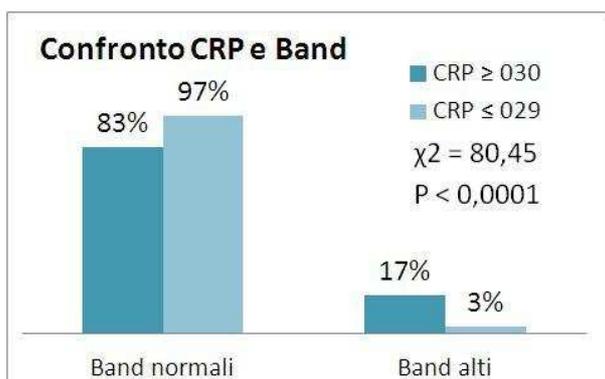
➤ Neutrofili Segmentati



La classe di distribuzione con maggiore differenza delle frequenze percentuali dei due gruppi è quella dei “NeuSeg alti” con un rapporto di 4 a favore del gruppo infiammatorio (CRP ≥ 0,30 mg/dL). Invece le classi “NeuSeg bassi” e “NeuSeg normali” presentano rispettivamente una differenza di 1,6 e 1,5 a favore del gruppo non infiammatorio (CRP ≤ 0,29 mg/dL).

Figura 5.8.5 - Distribuzione dei Neutrofili Segmentati nelle classi bassi/normali/alti per i due gruppi (CRP ≥ 0,30 e CRP ≤ 0,29), frequenze percentuali, valore di Chi Quadrato (χ^2) e livello di significatività (P).

➤ Neutrofili Banda



La classe “Band alti” esprime un rapporto di 5,7 a favore del gruppo infiammatorio (CRP ≥ 0,30 mg/dL), mentre la classe “Band normali” presenta una differenza minima di 1,2 a favore del gruppo non infiammatorio (CRP ≤ 0,29 mg/dL).

Figura 5.8.6 - Distribuzione dei Neutrofili Banda nelle classi bassi/normali/alti per i due gruppi (CRP ≥ 0,30 e CRP ≤ 0,29), frequenze percentuali, valore di Chi Quadrato (χ^2) e livello di significatività (P).

5.8.2 Tra fasce di incremento della CRP

Per studiare in modo più approfondito come si muovono le distribuzioni dei diversi marker, in relazione ai valori della proteina c reattiva, lo stesso tipo di indagine è stato ripetuto utilizzando i livelli di incremento della proteina c reattiva.

Per fare un confronto che comprendesse tutti i valori della CRP sono stati riportati anche i dati relativi al gruppo non infiammatorio (CRP ≤ 0,29 mg/dL), qui indicato come “< 0,30”, già osservati nel precedente sottocapitolo.

➤ Fibrinogeno

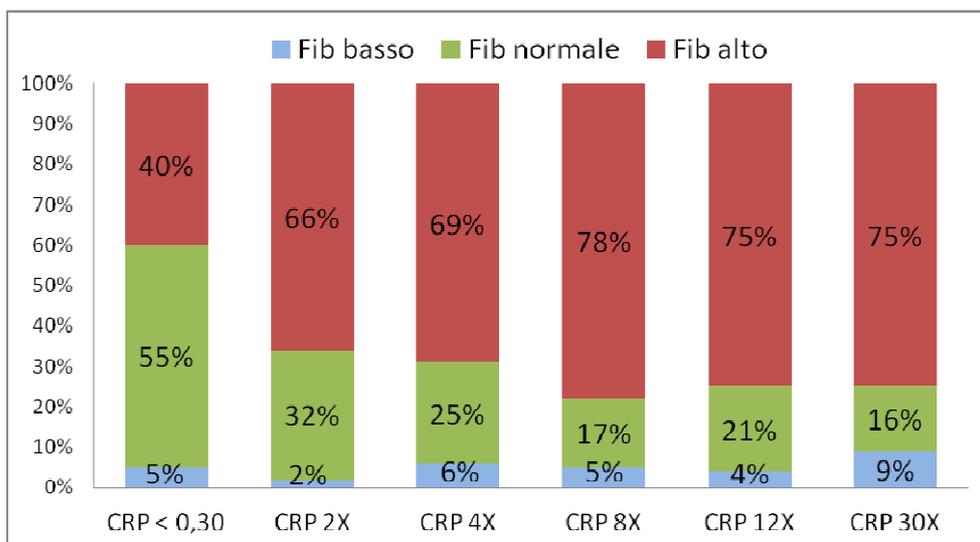


Figura 5.8.7 - Distribuzione del Fibrinogeno nelle classi basso/normale/alto per le varie fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP), frequenze percentuali.

La classe “Fib alto”, che nella fascia CRP < 0,30 mostra una frequenza percentuale inferiore di quella della classe “Fib normale”, subisce un progressivo aumento della sua prevalenza rispetto alle altre due classi, nelle varie fasce di incremento della CRP. Il valore massimo di distribuzione del “Fib alto” rispetto a “Fib normale” e “Fib basso” è

78% e si registra nella fascia 8x di CRP, mentre nelle due fasce successive (12x e 30x) si mantiene costante al 75%.

➤ Albumina

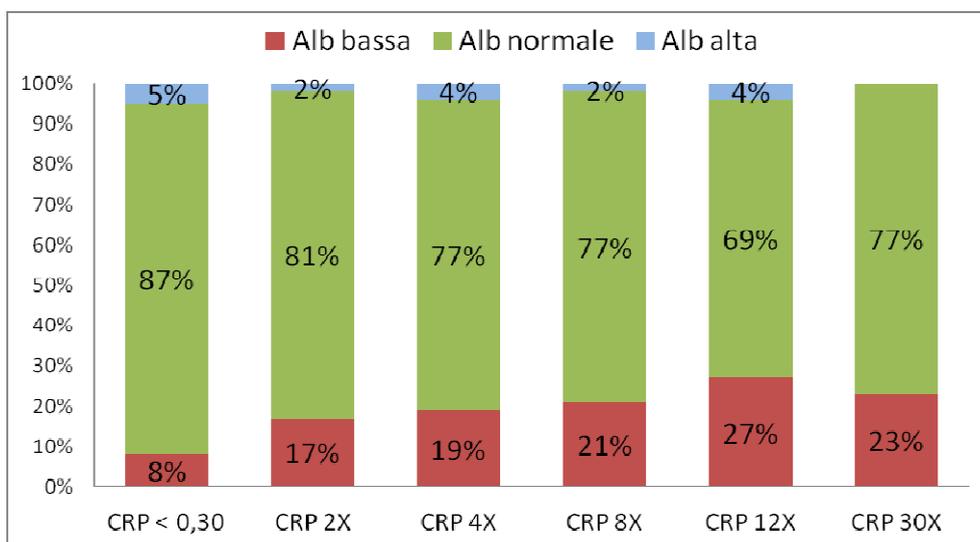


Figura 5.8.8 - Distribuzione dell'Albumina nelle classi bassa/normale/alta per le varie fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP), frequenze percentuali.

La classe di distribuzione più rappresentata rimane sempre la “Alb normale”. Tuttavia essa subisce un decremento significativo per l’aumento della classe “Alb bassa” nelle varie fasce di incremento della CRP e raggiunge il suo valore massimo alla fascia CRP 12x con il 27% di frequenza percentuale.

➤ Ferro

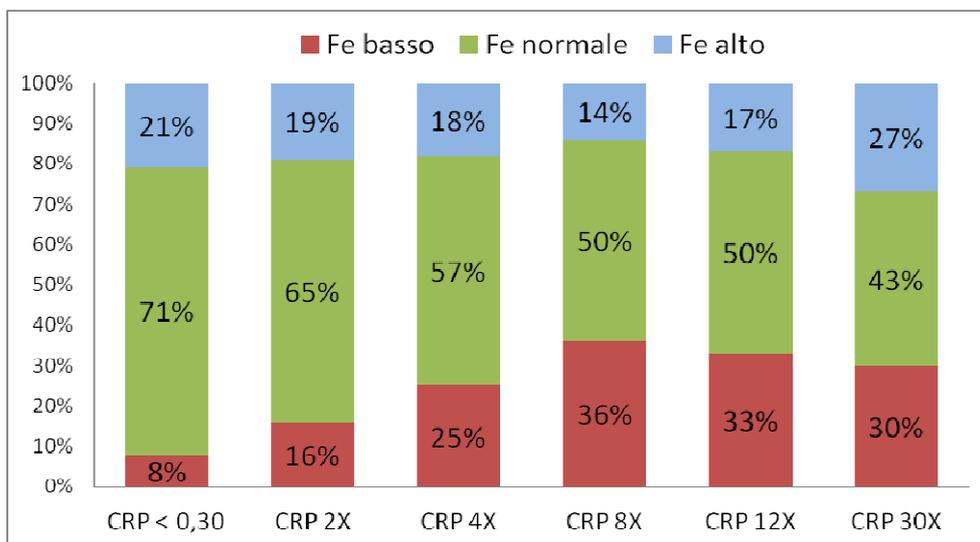


Figura 5.8.9 - Distribuzione del Ferro nelle classi basso/normale/alto per le varie fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP), frequenze percentuali.

La classe di distribuzione che si muove di più è “Fe basso” che raggiunge la sua massima frequenza percentuale nella fascia CRP 8x con un valore di 36%. Al confronto con l’8% della fascia CRP<0,30, la differenza tra i due valori è di 4,5, mentre (nelle stesse fasce a confronto) il rapporto per le classi “Fe normale” e “Fe alto” è rispettivamente di 1,4 e 1,5 a favore della fascia CRP<0,30. Nelle ultime due fasce di

incremento della CRP la frequenza di distribuzione della classe “Fe basso” subisce un lieve decremento per aumento della classe “Fe alto”, che nell’ultima fascia raggiunge il 27%.

➤ **Leucociti**

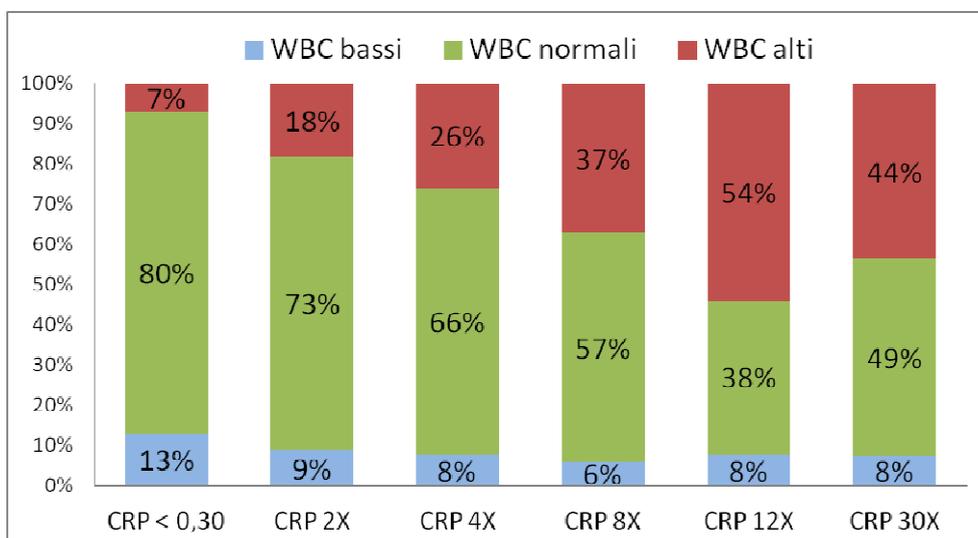


Figura 5.8.10 - Distribuzione dei Leucociti nelle classi bassi/normali/alti per le varie fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP), frequenze percentuali.

La classe “WBC alti” che nella fascia CRP<0,30 è la meno rappresentata (7%), mostra un aumento progressivo e significativo nelle successive fasce di incremento della CRP, raggiungendo il suo massimo valore di frequenza percentuale rispetto alle altre classi nella fascia CRP 12x (con il 54%) che è anche l’unica fascia in cui la classe “WBC alti” prevale sulla classe “WBC normali”.

Infatti nella fascia CRP 30x la classe “WBC alti” torna a contare una frequenza di distribuzione minore rispetto ai “WBC normali”, pur mantenendo una rappresentanza del 44%.

La classe “WBC bassi” non presenta variazioni di distribuzione rilevanti.

➤ **Neutrofili Segmentati**

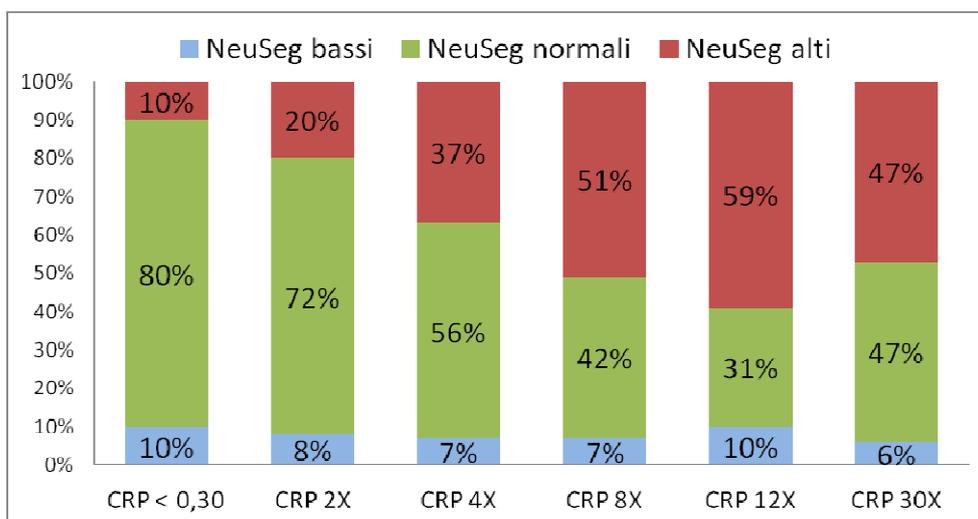


Figura 5.8.11- Distribuzione dei Neutrofili Segmentati nelle classi bassi/normali/alti per le varie fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP), frequenze percentuali.

L'andamento delle frequenze nelle classi di distribuzione dei NeuSeg in relazione alle fasce di CRP somiglia a quello dei WBC, in questo caso però la classe "NeuSeg alti" risulta prevalente sulle altre già nella fascia CRP 8x (con il 51%) e poi CRP 12x (con il 59%), nell'ultima fascia (CRP 30x) torna a diminuire, ma la sua frequenza percentuale risulta identica a quella della classe "NeuSeg normali" (47%). Anche per questo marker la classe "NeuSeg bassi" non subisce variazioni rilevanti.

➤ Neutrofili Banda

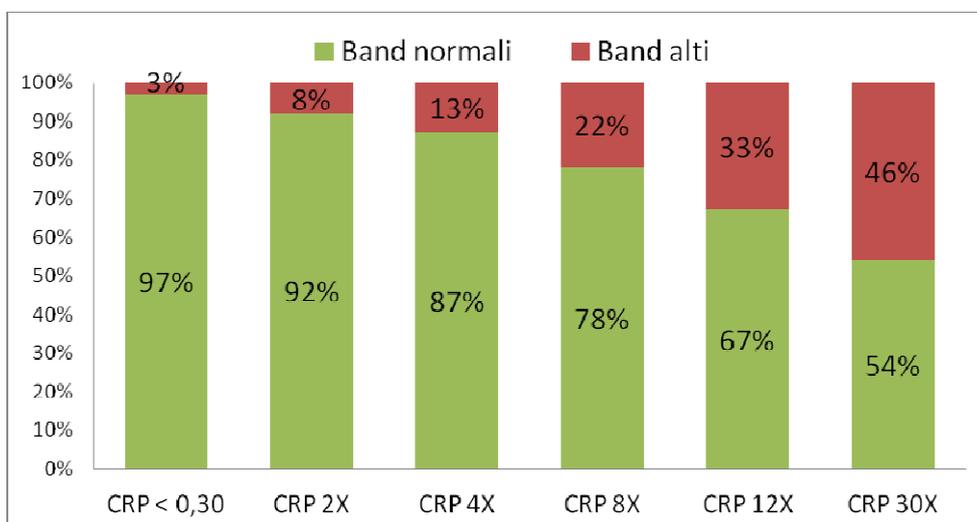


Figura 5.8.12 - Distribuzione dei Neutrofili Banda nelle classi bassi/normali/alti per le varie fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP), frequenze percentuali.

La classe di distribuzione più rappresentata rimane quella dei "Band normali" ma la sua frequenza percentuale subisce una evidente e progressiva riduzione per l'aumento di quella della classe "Band alti", che dal 3% della fascia CRP<0,30 raggiunge il 46% nella fascia CRP 30x, il rapporto tra i due valori è di 15,3.

5.9 Presenza o assenza di alterazioni nei diversi marker a confronto con la CRP

5.9.1 Presenza di alterazioni infiammatorie*

Sui 1080 campioni appartenenti al gruppo infiammatorio (CRP \geq 0,30 mg/dL) queste erano le frequenze assolute rilevate precedentemente nelle 3 classi di distribuzione (vedi Tabella 5.8.1 modificata)

CLASSE di FREQUENZA:	Fib	Alb	Fe	WBC	NeuSeg	Band
Basso	48	<u>215</u>	<u>292</u>	82	78	x
Normale	225	830	600	658	567	899
Alto	<u>701</u>	32	186	<u>337</u>	<u>427</u>	<u>181</u>

Tabella 5.8.1 modificata - Distribuzione dei marker infiammatori nelle classi di frequenza basso/normale/alto, per il gruppo infiammatorio (frequenze assolute), evidenziate le frequenze di distribuzioni nelle classi infiammatorie* di ciascun parametro.

Focalizzando l'attenzione sulle classi che rappresentano l'alterazione tipica della risposta infiammatoria per ciascun parametro e selezionando i campioni con diverse possibili associazioni di tali alterazioni, abbiamo osservato le frequenze che seguono:

- Fib alto e Alb bassa: 137 (13%)
- Fib alto e Fe basso: 210 (19%)
- Alb bassa e Fe basso: 62 (6%)
- Fib alto, Alb bassa e Fe basso: 58 (5%)

- WBC alti e NeuSeg alti: 286 (26%)
- WBC alti e Band alti: 118 (11%)
- NeuSeg alti e Band alti: 128 (12%)
- WBC alti, NeuSeg alti e Band alti: 111 (10%)

- Associazione di tutti i 6 parametri alterati*: 9 (0,8%)

La stessa indagine è stata eseguita nel gruppo non infiammatorio (CRP ≤ 0,29 mg/dL) (vedi Tabella 5.8.2 modificata)

CLASSE di DISTR.	Fib	Alb	Fe	WBC	NeuSeg	Band
Basso	38	<u>57</u>	<u>61</u>	99	79	x
Normale	417	661	539	608	604	736
Alto	<u>301</u>	39	157	<u>50</u>	<u>74</u>	<u>21</u>

Tabella 5.8.2 modificata - Distribuzione dei marker infiammatori nelle classi di frequenza basso/normale/alto, per il gruppo non infiammatorio (frequenze assolute), evidenziate le frequenze di distribuzioni nelle classi infiammatorie* di ciascun parametro.

e ha prodotto i seguenti risultati:

- Fib alto e Alb bassa: 31 (4%)
- Fib alto e Fe basso: 32 (4%)
- Alb bassa e Fe basso: 15 (1%)
- Fib alto, Alb bassa e Fe basso: 9 (1%)

- WBC alti e NeuSeg alti: 46 (6%)
- WBC alti e Band alti: 14 (2%)
- NeuSeg alti e Band alti: 14 (2%)
- WBC alti, NeuSeg alti e Band alti: 13 (2%)

- Associazione di tutti i 6 parametri alterati*: 2 (0,2%)

E' stato calcolato il rapporto tra le frequenze dei due gruppi a confronto (infiammatorio e non infiammatorio) in tutti i sottogruppi valutati.

Nella Tabella 5.9 i risultati sono disposti in ordine decrescente in base al valore del rapporto tra le frequenze.

Alterazioni infiammatorie	CRP $\geq 0,30$	CRP $\leq 0,29$	rapporto delle frequenze
NeuSeg > Band >	128	14	9,1
Band >	179	21	8,5
WBC > NeuSeg > Band >	111	13	8,5
WBC > Band >	118	14	8,4
Fib > Fe <	210	32	6,6
Fib > Alb < Fe <	58	9	6,4
WBC > NeuSeg >	286	46	6,2
WBC >	302	50	6
NeuSeg >	390	74	5,3
Fe <	292	61	4,8
Fib > Alb <	133	31	4,3
Alb < Fe <	62	15	4,1
Alb <	215	57	3,8
Fib >	701	301	2,3

Tabella 5.9.1 – Distribuzione dei campioni del gruppo infiammatorio e non infiammatorio rispetto alla presenza di una o più alterazioni infiammatorie* e confronto delle frequenze con stima del loro rapporto matematico.

5.9.2 Totale assenza di alterazioni

Nel gruppo infiammatorio (CRP $\geq 0,30$ mg/dL) i campioni che presentavano valori di Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band all'interno dei rispettivi intervalli di riferimento sono **58/1080** (5%).

Le frequenze di distribuzione di questi campioni, tra le fasce di incremento di CRP, sono riportate nella tabella 5.9.2.

CRP 2x	CRP 4x	CRP 8x	CRP 12x	CRP 30x
32	14	9	3	0

Tabella 5.9.2 – Distribuzione dei campioni senza alterazione di Fibrinogeno, Albumina, Ferro, Leucociti, Neutrofili Segmentati e Neutrofili Banda, rispetto alle fasce di incremento della Proteina C Reattiva (CRP).

Nel gruppo non infiammatorio (CRP $\leq 0,29$ mg/dL) i campioni che presentavano i valori degli stessi parametri all'interno degli intervalli di riferimento sono **229/757** (30%).

5.10 Accuratezza, sensibilità e specificità dei diversi marker infiammatori rispetto alla CRP

L'analisi della curva ROC ha fornito per ciascun parametro l'AUC (Area Under the ROC Curve), il livello di significatività P, la sensibilità e la specificità per ciascun valore analizzato (è dalla determinazione di sensibilità e specificità per tutti questi valori che viene creata la curva ROC), con rappresentazione grafica della curva.

In merito alle stime di sensibilità e specificità sono state scelte quelle associate ai valori al di sopra o al di sotto dei limiti di riferimento, per ciascun parametro, che risultano modesti ma significativi.

L'AUC rappresenta una misura di accuratezza diagnostica, che secondo la classificazione di Swets andrebbe interpretata come indicato nella Tabella 5.10.1.

AUC = 0,5	Test non informativo
$0,5 < AUC \leq 0,7$	Test poco accurato
$0,7 < AUC \leq 0,9$	Test moderatamente accurato
$0,9 < AUC < 1$	Test altamente accurato
AUC = 1	Test perfetto

Tabella 5.10.1 – Classificazione di Swets per l'interpretazione dei valori di Area Under the ROC Curve (AUC).

I risultati ottenuti in questo studio sono i seguenti:

Fibrinogeno

AUC = 0,67

P < 0,0001

Sensibilità a 400 mg/dL = 52,5

Specificità a 400 mg/dL = 77,5

All'aumentare dei valori di Fib, diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità.

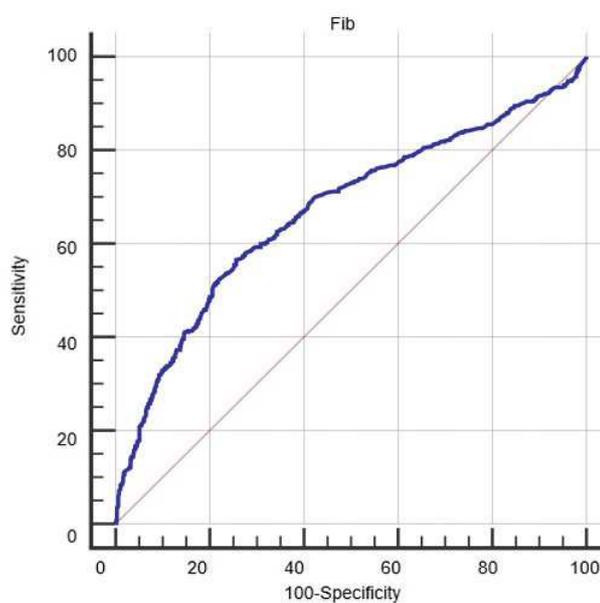


Figura 5.10.1 – Curva ROC del Fibrinogeno (Fib)

Albumina

AUC = 0,64

P < 0,0001

Sensibilità a 2,45 g/dL = 18,3

Specificità a 2,45 g/dL = 93,4

Al diminuire dei valori di Alb, diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità.

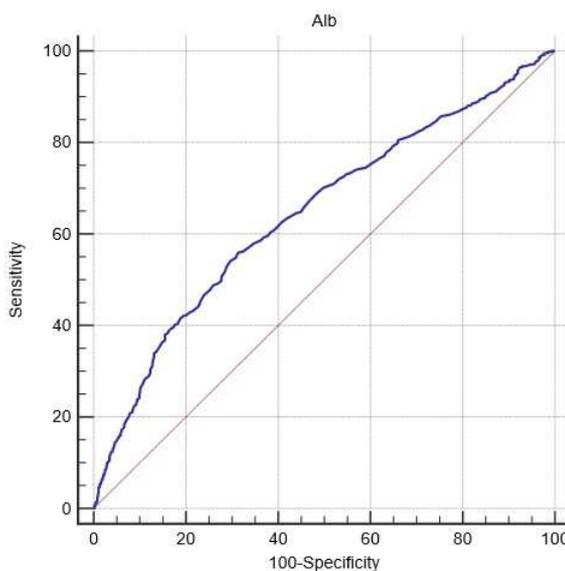


Figura 5.10.2 – Curva ROC dell'Albumina (Alb)

Ferro

AUC = 0,64

P < 0,0001

Sensibilità a 80 µg/dL = 19,4

Specificità a 80 µg/dL = 95,4

Al diminuire dei valori di Fe, diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità.

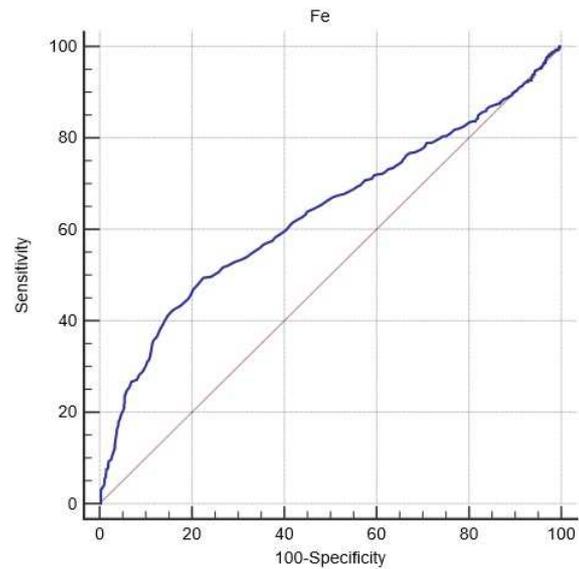


Figura 5.10.3 – Curva ROC del Ferro (Fe)

Leucociti

AUC = 0,70

P < 0,0001

Sensibilità a 18 K/µL = 27,8

Specificità a 18 K/µL = 94,2

All'aumentare dei valori dei WBC diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità.

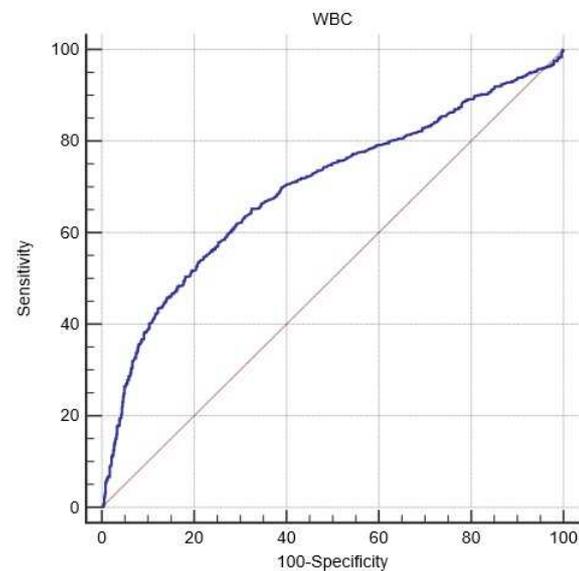


Figura 5.10.4 – Curva ROC dei Leucociti (WBC)

Neutrofili Segmentati

AUC = 0,71

P < 0,0001

Sensibilità a 12 K/µL = 38,8

Specificità a 12 K/µL = 90,2

All'aumentare dei valori dei NeuSeg diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità.

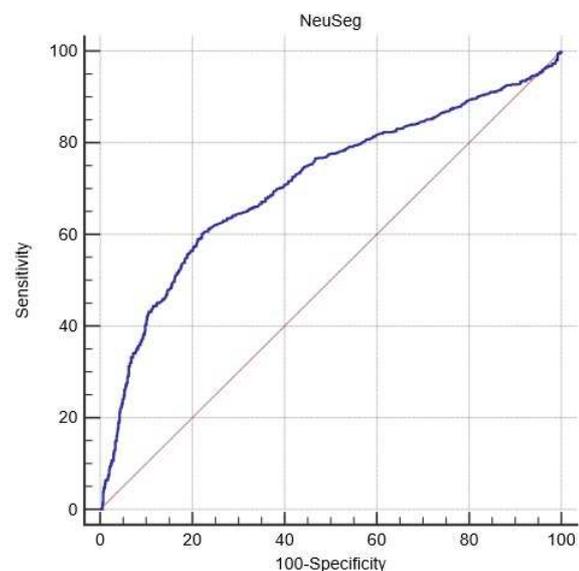


Figura 5.10.5 – Curva ROC dei Neutrofili Segmentati (NeuSeg)

Neutrofilì Banda

AUC = 0,59

P < 0,0001

Sensibilità a 0,31 K/ μ L = 17,6

Specificità a 0,31 K/ μ L = 98

All'aumentare dei valori dei Band diminuisce la sensibilità e aumenta la specificità.

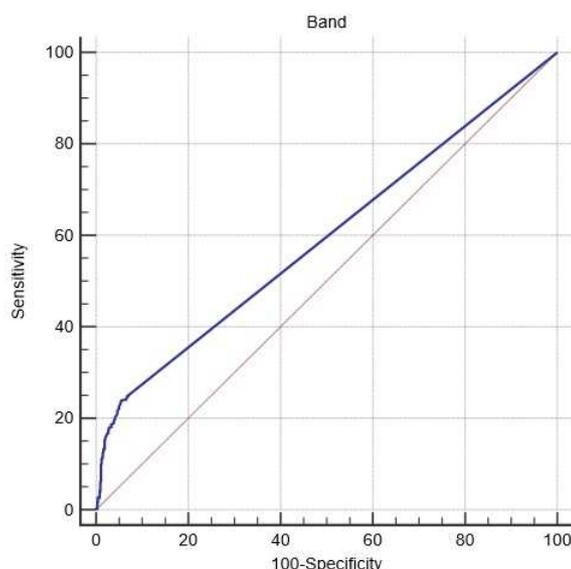


Figura 5.10.6 – Curva ROC dei Neutrofilì Banda (Band)

I risultati sono riassunti nella Tabella 5.10.2.

Marker Infiammat.	Sensibilità	Specificità	AUC
Fib	52,7	77,5	0,67
Alb	18,3	93,4	0,64
Fe	19,4	95,4	0,64
WBC	27,9	94,2	0,70
NeuSeg	38,8	90,2	0,71
Band	17,6	98	0,59

Tabella 5.10.2 – Risultati delle analisi delle curve ROC per i marker infiammatori Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), Leucociti (WBC), Neutrofilì Segmentati (NeuSeg) e Neutrofilì Banda (Band): sensibilità, specificità e Area Under the ROC Curve (AUC).

I valori di AUC interpretati secondo la classificazione di Swets, permettono di classificare i diversi marker infiammatori come segue:

- Test moderatamente accurato: NeuSeg
- Test poco accurati: WBC, Fib, Alb, Fe, Band

5.11 Presenza di alterazioni leucocitarie e correlazione con i valori di CRP

La presenza delle seguenti alterazioni cellulari: Neutrofilì Tossici, Monociti Attivati e Linfociti Reattivi, è stata osservata durante la valutazione microscopica dello striscio di sangue periferico, sia nel gruppo infiammatorio (CRP \geq 0,30 mg/dL) che nel gruppo non infiammatorio (CRP \leq 0,29 mg/dL). Nella Tabella 5.11 sono riportate le frequenze assolute ricavate dal presente studio.

Categorie di presenza	CRP $\geq 0,30$ mg/dL (1080 campioni)			CRP $\leq 0,29$ mg/dL (757 campioni)		
	Neu TOX	Mon ATT	Linf REA	Neu TOX	Mon ATT	Linf REA
-/+	13	7	4	2	10	25
+	18	130	134	0	52	111
++	2	106	73	0	30	42
+++	0	15	14	0	0	2
++++	0	1	0	0	0	0
tot	33	259	225	2	92	180

Tabella 5.11 – Distribuzione dei campioni dei due gruppi in base alla presenza di alterazioni leucocitarie: Neutrofili Tossici (Neu TOX), Monociti Attivati (Mon ATT) e Linfociti Reattivi (Linf REA), frequenze assolute per ciascuna categoria di presenza (-/+, +, ++, +++, +++) e totali.

Nei grafici che seguono sono rappresentate le frequenze percentuali totali delle 3 tipologie di alterazione nei due gruppi a confronto.

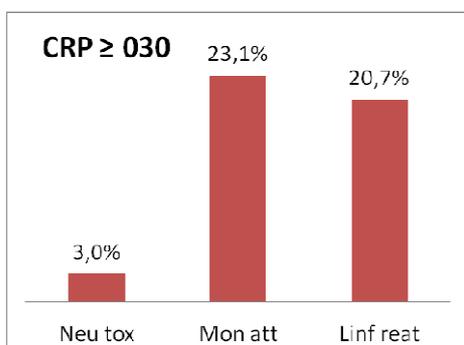


Figura 5.11.1 – Distribuzione dei campioni del gruppo infiammatorio (CRP ≥ 030) in base alla presenza delle alterazioni leucocitarie Neutrofili Tossici (Neu tox), Monociti Attivati (Mon att) e Linfociti Reattivi (Linf reat), frequenze percentuali.

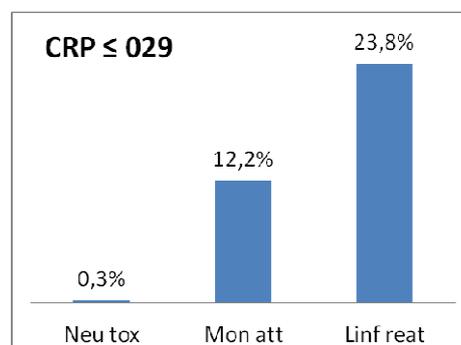


Figura 5.11.2 – Distribuzione dei campioni del gruppo non infiammatorio (CRP ≤ 029) in base alla presenza delle alterazioni leucocitarie Neutrofili Tossici (Neu tox), Monociti Attivati (Mon att) e Linfociti Reattivi (Linf reat), frequenze percentuali.

Per quanto riguarda i Neu TOX, sebbene la rappresentanza sia estremamente bassa in entrambi i gruppi, mettendo a confronto i risultati si osserva che la loro presenza incrementa di 10 volte nel gruppo infiammatorio (CRP $\geq 0,30$ mg/dL).

I Mon ATT, nel gruppo infiammatorio (CRP $\geq 0,30$ mg/dL), sono l'alterazione più rappresentata con una frequenza percentuale del 23,13%.

Nel gruppo non infiammatorio (CRP $\leq 0,29$ mg/dL) la loro presenza si osserva nel 12,20% dei campioni, quindi l'incremento di tale manifestazione nel gruppo infiammatorio è di 1,9 volte.

I Linf REA risultano presenti in entrambi i gruppi con una frequenza pressoché sovrapponibile, la differenza è infatti di 1,1 a favore del gruppo non infiammatorio (CRP $\leq 0,29$ mg/dL).

La relazione tra alterazioni cellulari e CRP è stata analizzata con l'analisi di correlazione di Spearman.

I risultati evidenziano l'esistenza di una modesta correlazione positiva tra Neu TOX, Mon ATT e CRP, con valori di 0,23 e 0,22 rispettivamente, tale correlazione risulta comunque altamente significativa, con $P = 7,08^{-23}$ per i Neu TOX e $P = 1,44^{-20}$ per Mon ATT.

Invece i Linf REA hanno mostrato una apparente correlazione negativa che però non è risultata significativa ($P > 0,05$).

6 DISCUSSIONE

6.1 Distribuzione della popolazione in base a sesso, razza ed età

Le distribuzioni delle due popolazioni prese in esame, ovvero quella del gruppo infiammatorio (CRP \geq 0,30 mg/dL) e quella del gruppo non infiammatorio (CRP \leq 0,29 mg/dL), sono risultate sufficientemente omogenee per sesso, razza (considerando le razze con rappresentanza numericamente significativa) ed età, da escludere la presenza di un *selection bias*.

Non sono emerse differenze statisticamente significative tra i due gruppi per quanto riguarda il sesso (P=0,0891) e le razze (P=0,2515) includendo nel test del Chi Quadro le razze con una rappresentanza minima di 10 soggetti in almeno uno dei due gruppi.

Secondo vari studi riportati in letteratura, la risposta della CRP non risulta influenzata da sesso e razza. Si ricordano a tal proposito Kuribayashi (2003) che nel suo studio su Beagle sani aveva osservato l'assenza di correlazione tra i valori di CRP ed il sesso dei soggetti; Mitchell (2009) che in casi di anemia emolitica immunomediata, per quanto riguarda il sesso aveva ottenuto un valore P=0,95, per quanto riguarda le razze un valore P=1,00; e Galezowski (2010) che ha escluso la presenza di un'associazione significativa tra età e valori di CRP nei pazienti con addome acuto.

Tornando sui risultati emersi nel presente studio, è invece stata osservata la presenza di una differenza statisticamente significativa (P< 0,0001) per quanto riguarda l'età. Osservando i dati della Tabella 5.3.1, che riporta le frequenze assolute, si nota nell'ultima fascia di età (>7 anni) una forte divergenza della distribuzione dei pazienti nel gruppo infiammatorio e in quello non infiammatorio (**707/358**), ma valutando le frequenze percentuali (Figura 5.3) si può notare che esistono differenze significative già dai 4 mesi di età.

In particolare si osserva che dai 4 mesi ai 7 anni di età la popolazione è maggiormente distribuita nel gruppo non infiammatorio (CRP \leq 0,29 mg/dL), mentre dai 7 anni in poi si assiste ad una netta inversione di tendenza, con aumento della distribuzione nel gruppo infiammatorio (CRP \geq 0,30 mg/dL).

Secondo il lavoro di Hayashi et al. (2001), che indagava la risposta della CRP in seguito a iniezione di olio di trementina e, successivamente, a infezione sperimentalmente indotta con inoculazione di *S.aureus*, la CRP risponde in maniera significativamente ridotta nei cuccioli di età < 1 mese.

Una ridotta risposta della CRP nel primo mese di vita dei pazienti canini, potenzialmente potrebbe aver determinato in questo studio una riduzione della prevalenza di patologie infiammatorie nella prima fascia di età (dal momento che la presenza di patologie infiammatorie è stata determinata soltanto sulla base dei valori di CRP).

A tal proposito, si fa notare che la prima fascia di età comprende soggetti di età < 4 mesi (quindi abbraccia un intervallo di età più ampio) e si segnala che in realtà nel nostro studio era presente un solo paziente di età < 1 mese, oltretutto incluso nel gruppo infiammatorio con un valore di CRP di 3,4 mg/dL.

Studi successivi, non specifici per l'età, hanno valutato l'eventuale presenza di un'associazione tra valori di CRP ed età in diverse patologie, senza rilevare differenze significative (a titolo di esempio: Kuribayashi 2003; Galezowski 2010) a dimostrazione che la risposta della CRP non appare influenzata dall'età e che quindi le differenze di distribuzione rilevate in questo studio sono effettivamente legate ad una diversa prevalenza delle patologie infiammatorie nelle varie fasce di età.

In particolare, l'evidente scostamento dei dati nell'ultima fascia di età (>7 anni), indica un aumento della prevalenza di patologie infiammatorie acute nei soggetti anziani (>7 anni).

Il successivo studio del rischio relativo, ha messo in evidenza il progressivo aumento dei valori di CRP in relazione all'età dei soggetti, con un incremento del rischio relativo pari al doppio tra la fascia di età $3 \leq 7$ anni (r.r. **0,7**) e quella > 7 anni (r.r. **1,4**).

6.2 Dati della statistica riepilogativa

6.2.1 Valori massimi e minimi

Dai risultati dell'analisi statistica riepilogativa dei dati, l'osservazione dei valori minimi e massimi non offre informazioni particolarmente utili poiché non evidenzia differenze caratteristiche e/o significative tra il gruppo infiammatorio (CRP $\geq 0,30$ mg/dL) e quello non infiammatorio (CRP $\leq 0,29$ mg/dL), ad eccezione della CRP che ovviamente mostra valori minimi e massimi nettamente differenti, essendo il parametro che è stato utilizzato come riferimento per la selezione del gruppo infiammatorio e non infiammatorio.

Il Fib ad esempio (proteina di fase acuta positiva) presenta valori massimi pressoché sovrapponibili nei due gruppi a confronto (**2737/2648** mg/dL), l'Alb (proteina di fase acuta negativa) addirittura presenta un valore minimo inferiore nel gruppo non infiammatorio (**1,07/0,88** g/dL), così come il Fe (**31/25** μ g/dL). Anche WBC e NeuSeg mostrano valori massimi più alti nei gruppi non infiammatori.

Alcune di queste osservazioni possono essere spiegate dal fatto che le stesse alterazioni possono essere indotte da cause non infiammatorie, come ad esempio trattamenti cortisonici per Fib, Alb e NeuSeg, linfomi o leucemie per WBC, nefropatie proteino-disperdenti per Alb.

I Band invece sono gli unici che, come ci si attenderebbe dal confronto tra un gruppo infiammatorio e uno non infiammatorio, presentano un valore massimo nettamente superiore nel gruppo infiammatorio rispetto a quello del gruppo non infiammatorio (**38,54/16,42** K/ μ L) con un rapporto di 2,3.

Un'altra osservazione è che Fib, WBC e NeuSeg del gruppo infiammatorio hanno dei valori minimi più bassi rispetto al gruppo non infiammatorio: Fib (**10/40** mg/dL), WBC (**0,23/0,34** K/ μ L), NeuSeg (**0,06/0,18** K/ μ L).

Il Fib così basso è indubbiamente legato ad un suo consumo, che nel gruppo infiammatorio può dipendere da patologie molto gravi, come ad esempio condizioni di shock settico, situazione in cui la cascata citochinica sfugge ai meccanismi di modulazione dell'infiammazione e la liberazione massiva di TNF- α promuove la coagulabilità del sangue, conducendo allo sviluppo di coagulazione intravasale disseminata che consuma il Fib plasmatico.

Valori di Fib molto bassi sono tuttavia presenti anche nel gruppo non infiammatorio e possono essere legate a patologie della coagulazione o insufficienza epatica, quindi

cause che determinano un aumentato consumo o una ridotta produzione, ma non legate ad un processo infiammatorio acuto.

Per quanto riguarda WBC e NeuSeg, valori così ridotti possono essere legati a infezioni virali (ad es. Parvovirus) o protozoarie (ad es. Ehrlichia o Leishmania) che sopprimono l'emopoiesi, o a stati setticemici con consumo di cellule e inappropriata risposta midollare, legata sia all'esaurimento del pool di riserva midollare che si verifica in corso di processi infettivi iperacuti, che a stati tossiemici.

Anche in questo caso i valori minimi del gruppo non infiammatorio sono bassi quasi quanto quelli del gruppo infiammatorio e le cause non infiammatorie di tali leucopenie sono attribuibili a sindromi mielodisplastiche, soppressione midollare da farmaci citotossici o altri tipi di sostanze tossiche, o linfomi in stadi non associati a danno tissutale (e quindi senza reazione infiammatoria da parte dell'organismo).

In base a queste osservazioni risulta evidente che il range dei valori espressi dai vari parametri è molto ampio e non cambia in modo significativo con la presenza o assenza di un processo infiammatorio, dato che esistono diversi fattori che sono in grado di alterare le concentrazioni ematiche di ciascuno di essi.

Perciò osservare il singolo risultato di uno di questi marker può essere estremamente fuorviante.

- In merito alle considerazioni sopra esposte si sono sorvolati i possibili errori analitici, che i tecnici di laboratorio e gli stessi medici di veterinari devono sempre escludere prima di procedere con l'interpretazione dei risultati.

6.2.2 Mediana e percentili

Osservando la mediana del Fib nel gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) si nota che il valore che delimita la prima metà dei dati è già un valore che supera i limiti di riferimento del Fib, mentre la mediana del Fib nel gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL) rappresenta un valore compreso nei limiti di riferimento del Fib (**430/271** mg/dL). Ciò indica che almeno la metà dei campioni appartenenti al gruppo infiammatorio presenta valori di Fib superiori al suo intervallo di riferimento.

Al 2,5° Pctl, i valori di entrambi i gruppi risultano al di sotto dei limiti di riferimento della normalità, con il 2,5° Pctl del gruppo infiammatorio che appare leggermente più basso di quello del gruppo non infiammatorio (**53/92** mg/dL). Le considerazioni su questi dati sono sovrapponibili alle osservazioni precedentemente fatte per i valori minimi di questo parametro. Il 97,5° Pctl cade su valori al di sopra dei limiti di riferimento per entrambi i gruppi, con quello del gruppo infiammatorio più elevato del 97,5° Pctl del gruppo non infiammatorio di 1,6 volte (**1404/900** mg/dL), quindi anche se i valori massimi rilevati nei due gruppi sono molto vicini, in realtà i dati si distribuiscono diversamente, con una tendenza ad esprimere valori di Fib più elevati nel gruppo infiammatorio.

I WBC di entrambi i gruppi hanno una mediana che rientra nell'intervallo di riferimento sebbene quella del gruppo infiammatorio sia più elevata di 1,4 volte rispetto alla mediana del gruppo non infiammatorio (**12,7/8,78** K/ μ L). Il 2,5° Pctl di entrambi esprime un valore al di sotto dei limiti di riferimento e quello del gruppo infiammatorio risulta più basso di quello del gruppo non infiammatorio, mentre il 97,5° Pctl è per entrambi un valore al di sopra dei limiti di riferimento, ma quello del gruppo infiammatorio supera l'altro di 1,8. Quindi, nel gruppo infiammatorio la prevalenza di campioni con valori estremi (sia verso l'alto che verso il basso) appare moderatamente più alta.

Osservazioni analoghe si riscontrano nei NeuSeg, dove i rapporti tra le mediane e tra i 97,5° Pctl dei due gruppi sono rispettivamente 1,6 e 1,7.

Per i Band, in entrambi i gruppi a confronto la mediana esprime il valore 0 (che rientra nel normale intervallo di riferimento) mentre al 97,5° Pctl si assiste ad uno scostamento dei dati importante (**2,27/0,37 K/ μ L**) con un rapporto di 6/1.

Ciò indica che, anche se almeno la metà dei campioni di entrambi i gruppi non presenta Band, nel 97,5° Pctl i campioni del gruppo infiammatorio mostrano la comparsa di un numero di Band molto elevato ($\geq 2,27$ K/ μ L), valore fortemente superiore a quello espresso sul 97,5° Pctl del gruppo non infiammatorio (0,37 K/ μ L) che invece è relativamente vicino all'intervallo di riferimento di questo parametro.

Tuttavia va ricordato che, nella pratica clinica, per valutare i Band è necessario metterli a confronto con il valore dei NeuSeg e dei WBC, per stabilire se una loro presenza sia indicativa di deviazione a sinistra rigenerativa o degenerativa.

Per quanto riguarda Alb e Fe le rispettive mediane di entrambi i gruppi corrispondono a valori considerati normali ed i valori di Alb sono pressoché sovrapponibili (**3,06/3,34 g/dL**) mentre quelli di Fe esprimono un leggero scostamento (**116/140 μ g/dL**) con valore più basso nel gruppo infiammatorio. Valutando anche i Pctl si osserva che sostanzialmente le distribuzioni di questi parametri nei due gruppi hanno un andamento sovrapponibile, anche se i dati del gruppo infiammatorio (CRP $\geq 0,30$ mg/dL) più per Fe che per Alb, presentano valori tendenzialmente più bassi.

6.2.3 Coefficienti di asimmetria e curtosi

La curva di distribuzione dei dati della CRP, nel gruppo infiammatorio risulta leptocurtica (curtosi 10,5) e con asimmetria positiva (coda più lunga a destra) di 2,5, mentre nel gruppo non infiammatorio appare platicurtica (curtosi -1,3) con asimmetria positiva di 0,25.

I dati del Fib formano una curva di distribuzione leptocurtica e con asimmetria positiva in entrambi i gruppi. La curva del gruppo non infiammatorio risulta comunque più appuntita e con una coda a destra più lunga.

Per la Alb le curve di distribuzione dei due gruppi mostrano entrambe una asimmetria negativa, con coda a sinistra più lunga nel gruppo non infiammatorio (-0,2/-0,5). I coefficienti di curtosi descrivono una curva platicurtica nel gruppo infiammatorio (-0,1) e leptocurtica nel gruppo non infiammatorio (1,2).

I dati di Fe, WBC, NeuSeg e Band formano curve di distribuzione leptocurtiche e asimmetriche a destra in entrambi i gruppi.

Tuttavia nei WBC e NeuSeg la curtosi presenta una forte differenza tra i due gruppi essendo rispettivamente 12,8 e 5,4 nel gruppo infiammatorio, 131,5 e 127,6 nel gruppo non infiammatorio. Le curve di distribuzione presentano inoltre code a destra nettamente più lunghe nei gruppi non infiammatori.

Mentre i Band sono il parametro che presenta il coefficiente di curtosi più elevato, con 350,5 nel gruppo infiammatorio e 332,8 nel gruppo non infiammatorio), con una forte asimmetria a destra in entrambi i casi.

Le forme di distribuzione sopra descritte evidenziano che i dati raccolti in questa tesi non formano una curva gaussiana, tipica della distribuzione normale dei dati.

E' per questo motivo che, per confrontare i dati del gruppo infiammatorio con quelli del gruppo non infiammatorio, non sono stati presi in considerazione la media aritmetica e la deviazione standard, ma sono stati utilizzati mediana e percentili.

6.2.4 Distribuzione dei dati

Il tipo di distribuzione verificata con il test Kolmogorov-Smirnov è risultata non normale per tutti i parametri studiati in entrambi i gruppi (questo risultato non fa che confermare ciò che era stato evidenziato in precedenza).

La presenza di una distribuzione non normale dei dati, anche se non offre un contributo all'interpretazione pratica dei dati raccolti in questa tesi, è un dato molto importante perchè ha influenzato la successiva scelta dei metodi statistici utilizzati per analizzare il rapporto tra la CRP e gli altri marker infiammatori.

6.3 Correlazione tra i marker infiammatori

I coefficienti di correlazione per ranghi di Spearman, mostrano che la CRP è positivamente correlata con Fib, WBC, NeuSeg e Band, e negativamente correlata con Alb e Fe. Il grado con cui la CRP si correla con tutti i parametri è piuttosto basso, tuttavia la significatività di queste correlazioni è molto elevata.

I coefficienti di correlazione più alti tra la CRP e gli altri parametri, sono con il Fib e con i NeuSeg, dove R risulta per entrambi **0,26**.

Seguono poi i WBC (R = **0,24**), l'Alb (R = **- 0,21**) ed i Band (R = **0,14**), da ultimo il Fe che esprime un coefficiente di correlazione estremamente basso, con R pari a **- 0,08**.

La correlazione espressa tra Fib e NeuSeg è soltanto **0,16**.

Ciò significa che, anche se entrambi presentano lo stesso coefficiente di correlazione con la CRP, le informazioni da cui tale correlazione deriva sono differenti e ben distinte (infatti grado di correlazione tra loro è molto più basso).

In letteratura esistono altri lavori che hanno valutato la correlazione della CRP con altri marker infiammatori, ma il confronto del presente studio con i loro risultati è piuttosto difficile per varie ragioni:

- nessun lavoro ha mai preso in considerazione gli stessi marker valutati in questa tesi, contemporaneamente;
- nella maggioranza dei casi si tratta di studi clinici, con un minor numero di pazienti che però sono seguiti nell'evoluzione di una determinata patologia (indotta o spontanea);
- alcuni lavori presentano metodi di misurazione della CRP che offrono risultati dicotomici;
- non sempre i risultati statistici sono riportati in modo esaustivo e in qualche caso contengono delle imprecisioni;
- spesso i metodi statistici utilizzati sono differenti.

Si ricordano Ohno et al. (2006) e Galezowski et al. (2010) che hanno valutato la correlazione presente tra CRP e WBC, rispettivamente in 38 cani con poliartrite idiopatica e 32 cani con sindrome da addome acuto. In entrambi i casi la correlazione rilevata al momento della presentazione dei pazienti era nulla o molto bassa, poi nel follow up entrambi segnalano un netto aumento della correlazione tra i due parametri, che corrisponde ad una riduzione sia dei valori di CRP che del numero di WBC nei pazienti sottoposti a trattamento. Nello studio di Ohno (che ha utilizzato la correlazione di Pearson) in relazione al controllo effettuato a circa 2 settimane dall'inizio del

trattamento è riportata la correlazione $R=0,6$ mentre lo studio di Galezowski non fornisce questo dato.

Risultati analoghi, ovvero con un aumento progressivo della correlazione tra CRP ed altri parametri, sono riportati anche da Mitchell (2009) nei pazienti affetti da anemia emolitica immunomediata. In questo caso però il coefficiente di correlazione (di Spearman) per i WBC risulta più basso ($R=0,25$) rispetto a quello riportato nello studio descritto sopra. Nel lavoro di Mitchell è riferito anche il coefficiente di correlazione tra WBC e Alb ($R= -0,24$) in linea con quello ottenuto in questa tesi ($R= -0,22$).

Il coefficiente di correlazione tra CRP e WBC emerso in questa tesi è nettamente inferiore ($R=0,24$) rispetto a quanto riportato nel lavoro di Ohno ($R=0,6$), mentre appare concorde con il risultato di Mitchell ($R=0,25$).

Va sottolineato comunque che questi autori hanno eseguito le analisi di correlazione tra i vari marker su pazienti con patologia conclamata in corso (valutando la correlazione di volta in volta nei diversi momenti della sua evoluzione e della sua remissione) e che le correlazioni sopra riportate sono quelle più alte, ottenute dopo un certo periodo di tempo dalla iniziale presentazione degli animali.

Nel nostro studio invece l'indagine è stata fatta utilizzando tutti i campioni selezionati dal database, senza far riferimento ad una specifica patologia, nè al momento in cui il controllo ematico era stato fatto rispetto all'insorgenza della patologia stessa o all'inizio del trattamento.

Un altro lavoro che evidenzia la correlazione esistente tra CRP e altri parametri è quello di Nakamura et al. (2008) che hanno condotto un'indagine retrospettiva su 928 cani con varie patologie, sia infiammatorie che non infiammatorie. Secondo gli autori, in questo studio la CRP non sarebbe correlata a NeuSeg e Band, ma risulta correlata a WBC e, dopo aver escluso i casi di sindrome nefrosica e patologia intestinale cronica, con Alb; infatti ad una prima valutazione della correlazione tra Alb e CRP il risultato emerso non era significativo, mentre dopo aver eliminato dall'indagine statistica i casi in cui l'ipoalbuminemia dipendeva da un'aumentata perdita, i valori di Alb e CRP hanno mostrato un coefficiente di correlazione significativo ($R = -0,40$).

Prendendo spunto da questo dettaglio dell'indagine di Nakamura, si puntualizza che nel nostro lavoro, avendo utilizzato tutti i campioni selezionati dal database, sono certamente presenti casi che mostrano alterazioni dei parametri infiammatori provocati in realtà da cause non infiammatorie e che questo spiega i bassi valori dei coefficienti di correlazione.

Tuttavia il livello di significatività che è emerso risulta estremamente elevato e ciò significa che quando queste alterazioni sono legate a cause infiammatorie l'associazione tra i dati è molto forte.

Contemplando anche le altre correlazioni analizzate tra i vari marker, se si osservano i coefficienti di correlazione espressi fra i tre parametri leucocitari, si nota che sono quelli che mostrano (ovviamente) tra loro i più alti valori di correlazione: WBC e NeuSeg ($R=0,92$), WBC e Band ($R=0,54$), NeuSeg e Band ($R=0,45$) e la significatività di queste correlazioni è elevatissima.

E' da precisare, comunque, che WBC e NeuSeg non sono tra loro perfettamente correlati e che i coefficienti di correlazione con i Band sono nettamente più bassi.

E' proprio in queste differenze che risiede l'importanza di avere a disposizione tutti e tre i parametri leucocitari, specialmente NeuSeg e Band, perchè non sempre i risultati di un parametro leucocitario "corrispondono" con quelli forniti dagli altri.

In particolare, avere a disposizione il valore dei Band può fare una enorme differenza nell'interpretazione di WBC e NeuSeg, visto che è proprio sulla base del rapporto NeuSeg e Band che si differenziano una deviazione a sinistra rigenerativa o degenerativa della formula leucocitaria (elemento estremamente significativo nel caratterizzare la gravità del processo infiammatorio in atto) e per avere la stima dei Band è indispensabile la valutazione microscopica dello striscio ematico, poiché la maggior parte degli analizzatori emocromocitometrici non sono in grado di discriminare questa categoria cellulare.

In un lavoro condotto da Lubas et al. nel 2012, sull'analizzatore impiegato in questo studio (Procyte®) era risultata una buona concordanza tra la segnalazione della presenza di Band da parte dello strumento e dell'operatore microscopista. Tuttavia lo strumento non offre la valutazione numerica di queste cellule e quindi la valutazione microscopica resta un passaggio necessario e importante.

Il Fe è un parametro che presenta risultati particolari, infatti il grado di correlazione con la CRP era già estremamente basso e lo stesso coefficiente è espresso per il Fib (- **0,08**). Presenta il suo più alto grado di correlazione con l'Alb (**0,18**), mentre con i parametri leucocitari non mostra alcuna correlazione significativa.

In linea generale sembra quindi il marker più indipendente rispetto agli altri, ma anche il meno correlato con la presenza o assenza di un processo infiammatorio.

E' da considerare che il Fe è il parametro che più degli altri subisce l'influenza delle variazioni circadiane (Chikazawa, Hori et al. 2013; Harvey et al. 1987) sebbene, nel cane, il modo in cui la sideremia cambia durante il corso della giornata sia un elemento che dev'essere ancora studiato meglio, poiché i dati presenti in letteratura sono fortemente contrastanti. Ciò non toglie che l'entità delle variazioni rilevate è significativa e che questo, potenzialmente, può creare problemi nell'interpretazione dei risultati.

Se ad esempio, in un soggetto con patologia infiammatoria lieve o moderata e sideremia tendenzialmente bassa, il prelievo viene eseguito nel momento in cui la sideremia raggiunge il suo picco giornaliero si potrebbe osservare un valore di Fe che risulta all'interno del suo intervallo di riferimento. Questo potrebbe in parte giustificare la bassissima correlazione riscontrata in questo studio.

Oltre a questo, in diversi casi il Fe valutato nel corso di processi infiammatori sperimentalmente indotti e capaci di provocare incrementi superiori a 12x della CRP in un solo giorno, ha mostrato un comportamento particolare, con una repentina riduzione dei suoi livelli sierici immediatamente dopo l'induzione del processo infiammatorio ed un suo successivo rapido ritorno ai livelli fisiologici, seguito poi (nel caso di stimoli infiammatori ripetuti) ad un progressivo declino della sideremia.

(Chikazawa, Nakazawa et al. 2013; Otabe et al. 2000)

Il fenomeno sembra legato ad una massiva espressione di epcidina indotta da stimoli infiammatori molto efficaci, questo porta ad un abbassamento della sideremia tale da far subentrare dei meccanismi di controllo che riportano, provvisoriamente, i livelli sierici a valori fisiologici nonostante il processo infiammatorio ancora in atto. Se poi l'infiammazione persiste, il meccanismo di regolazione infiammatorio torna a prevalere, determinando una riduzione più graduale dei livelli sierici di Fe.

Tale comportamento bifasico della sideremia contribuisce ulteriormente a giustificare la scarsa correlazione rilevata tra Fe e gli altri marker.

6.4 Rapporto tra CRP e gli altri marker infiammatori

Con l'analisi della regressione multipla è stata studiata la relazione di dipendenza tra CRP e gli altri marker infiammatori. Ciò significa osservare, con un test specifico, se statisticamente i valori della CRP siano dipendenti da quelli espressi da uno o più marker a confronto (le variabili indipendenti).

Il valore di R^2 corretto (che è il coefficiente di determinazione aggiustato sul numero di variabili indipendenti) è risultato prossimo allo 0 in entrambi i gruppi (infiammatorio = R^2 corr. **0,05**; non infiammatorio = R^2 corr. **0,02**)

Questo permette di affermare che le informazioni fornite dalla CRP non possono essere predette dalle informazioni degli altri parametri.

Osservando i risultati relativi alla significatività di ciascuna variabile indipendente, il Fib nel gruppo infiammatorio mostra $P=0,0001$ e nel gruppo non infiammatorio $P=0,0013$, i Band presentano un $P=0,003$ solo nel gruppo infiammatorio. Se i valori di R^2 corretto fossero stati prossimi a 1, il P avrebbe indicato quali sono le variabili che esercitano valore predittivo sulla CRP, ma in questo caso l'informazione è irrilevante.

6.5 Fasce di incremento della CRP

Nel gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) il numero di campioni inclusi nelle varie fasce parte da **266** della fascia di incremento 2x e tende a salire (**326** nella fascia 4x) raggiungendo il massimo con **347** nella fascia 8x, che è quindi quella più rappresentata (32%).

Con le fasce di incremento più alte si assiste ad una netta e progressiva riduzione del numero di campioni, infatti la fascia 12x ne conta **105**, mentre la fascia 30x (nonostante l'intervallo dei valori sia più largo) ne conta solo **36**.

Questo indica che le malattie infiammatorie si esprimono più comunemente con valori compresi tra 0,3 e 2,4 mg/dL (2x, 4x e 8x) di CRP, mentre quelle che presentano valori superiori sono meno frequenti e tale frequenza appare inversamente proporzionale ai valori di CRP.

6.6 Distribuzioni dei marker infiammatori

Osservando come variano le frequenze di distribuzione dei diversi parametri all'interno delle classi "basso"/"normale"/"alto" in relazione ai valori di CRP, risulta evidente che la presenza di infiammazione (con $CRP \geq 0,30$) influenza in modo significativo tali distribuzioni, con un aumento percentuale delle classi che rappresentano l'alterazione infiammatoria tipica per ciascun parametro ("basso" per Alb e Fe, "alto" per Fib, WBC, NeuSeg e Band)*.

Queste osservazioni si basano solo sulle frequenze con cui i vari parametri esprimono valori bassi o alti rispetto ai relativi intervalli di riferimento. Quindi l'aumento del valore di distribuzione di un parametro significa semplicemente che c'è un maggior numero di campioni che mostra valori alterati*. Ciò non fornisce una valutazione rispetto all'entità di tali alterazioni (cioè se il parametro è più o meno lontano dall'intervallo di riferimento).

Osservando la Tabella 6.6.1 dove dove i marker infiammatori del gruppo infiammatorio ($CRP \geq 0,30$ mg/dL) sono stati ordinati in base al valore di frequenza espresso nella

rispettiva “classe infiammatoria”^{**} si può notare che il Fib è il primo parametro, mentre i Band sono gli ultimi.

Marker infiammatori	Frequenze Assolute	Frequenze Percentuali
Fib	701	72%
NeuSeg	427	40%
WBC	337	31%
Fe	292	27%
Alb	215	20%
Band	181	17%

Tabella 6.6.1 – Frequenze assolute e percentuali di distribuzione dei campioni del gruppo infiammatorio nella classe infiammatoria* per i marker: Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), Leucociti (WBC), Neutrofilii Segmentati (NeuSeg) e Neutrofilii Banda (Band).

Quindi il Fib è il parametro che più frequentemente mostra alterazione infiammatoria* (aumentando i suoi valori) in presenza di una infiammazione di qualsiasi entità (CRP \geq 0,30 mg/dL), mentre i Band sono quelli che, nella medesima situazione, aumentano con minore frequenza.

Se invece si osservano i risultati ottenuti nelle diverse fasce di incremento della CRP, prendendo in considerazione il massimo valore di frequenza espresso per la “classe infiammatoria” di ciascun parametro, si può notare che il Fib rimane il marker la cui “classe infiammatoria” raggiunge i valori percentuali più elevati, seguono i NeuSeg ed i WBC, poi i Band, infine Fe e Alb (vedi Tabella 6.6.2).

Marker infiammatori	Frequenze Percentuali	Incremento della CRP
Fib	78%	8x
NeuSeg	59%	12x
WBC	54%	12x
Band	46%	30x
Fe	36%	8x
Alb	27%	12x

Tabella 6.6.2 – Massime frequenze percentuali di distribuzione dei campioni del gruppo infiammatorio nella classe infiammatoria* per i marker: Fibrinogeno (Fib), Albumina (Alb), Ferro (Fe), Leucociti (WBC), Neutrofilii Segmentati (NeuSeg) e Neutrofilii Banda (Band) e corrispondente fascia di incremento della Proteina C Reattiva (CRP).

Questi dati mostrano quindi che, suddividendo i campioni in base all’intensità del processo infiammatorio (espresso dai valori di CRP), i vari marker esprimono risposte diverse e l’ordine ed i valori delle massime frequenze di distribuzione espresse nelle rispettive classi infiammatorie cambia.

Osservando i grafici dei risultati (Figure 5.8.7 – 5.8.8 – 5.8.9 – 5.8.10 – 5.8.11 – 5.8.12) si può notare che il Fib è anche l’unico parametro in cui, in una delle fasce di incremento della CRP, si rileva l’aumento della classe con alterazione opposta (Fib basso) rispetto a quanto rilevato nel gruppo non infiammatorio. Tale incremento è lieve ma interessante, si osserva nella fascia di incremento più alta (CRP 30x).

Si ricorda che quando l’infiammazione è accompagnata da fenomeni di coagulazione e fibrinolisi, l’aumento della sua produzione viene controbilanciata dall’aumento del suo consumo e quando i due processi si bilanciano, la presenza di uno maschera la presenza dell’altro, perciò i valori di Fib appaiono “normali”. Quando invece il consumo supera la produzione (emorragia acuta e grave, coagulazione intravasale disseminata, o

concomitante insufficienza epatica) la concentrazione plasmatica di Fib scende al di sotto dei valori di riferimento.

Sempre osservando i grafici, i Band rappresentano il parametro che, in relazione ai valori di CRP, varia con maggiore intensità le proprie frequenze di distribuzione nella “classe infiammatoria”. I “Band alti” infatti aumentano progressivamente dal 3% del gruppo non infiammatorio ($CRP \leq 0,29$ mg/dL) al 46% della fascia di incremento 30x ($CRP 3,61 - 9,10$ mg/dL) del gruppo infiammatorio. E’ da precisare che la fascia di incremento 30x è anche quella meno rappresentata, con soli 36 campioni, tuttavia osservando la fascia 12x si può notare che la frequenza percentuale dei “Band alti” è del 33%, quindi comunque più elevata dell’ “Alb bassa”, che raggiunge il picco nella stessa fascia di incremento mostrando una differenza minore rispetto alla distribuzione nel gruppo non infiammatorio.

Nella fascia 30x, i Band sono l’unico parametro che continua ad aumentare la frequenza di distribuzione nella “classe infiammatoria” mentre tutte le altre hanno già raggiunto il picco nelle due fasce precedenti.

Il Fib ed il Fe raggiungono il picco a 8x di CRP ($CRP 1,21 - 2,40$ mg/dL).

Alb, WBC e NeuSeg raggiungono il picco a 12x ($CRP 2,41 - 3,60$ mg/dL).

Queste informazioni ci forniscono già delle indicazioni in merito ai tempi di risposta, alla sensibilità e specificità dei diversi marker infiammatori rispetto alla CRP.

- Il Fibrinogeno già alla prima fascia di incremento della CRP mostra che il 66% dei campioni presenta Fib alto, dimostrando quindi una sensibilità maggiore rispetto a tutti gli altri marker infiammatori. La prevalenza dei campioni con Fib alto raggiunge il massimo a 8x di CRP, ciò suggerisce una certa *lentezza* di risposta del Fib rispetto alla CRP.
La specificità appare bassa, dato che la massima differenza dei “Fib alti” tra gruppi infiammatori e gruppo non infiammatorio è di 1,9.
- Il Fe presenta andamento simile al Fib, ma con valori percentuali nettamente più bassi che non raggiungono neanche il 40%. Risulta pertanto un marker che apparentemente presenta stessa *velocità* di reazione rispetto alla CRP, ma minore sensibilità del Fib. Tuttavia la maggiore differenza tra i valori di “Fe basso” espressi nei gruppi infiammatori e nel gruppo non infiammatorio (il rapporto più alto è di 4,5) suggerisce una specificità significativamente più alta del Fe rispetto al Fib.
- L’Alb appare invece scarsamente sensibile e moderatamente specifica, poiché i suoi valori di frequenza percentuale nella classe “Alb bassa” rimangono sempre bassi, ed il confronto con i valori del gruppo non infiammatorio evidenzia che la massima differenza rilevata è un incremento di 3,4. Inoltre i *tempi* di reazione rispetto alla CRP appaiono più lunghi di quelli di Fib e Fe visto che la classe “Alb bassa” raggiunge il picco di frequenza nella fascia CRP 12x.
- WBC e NeuSeg raggiungono, come l’Alb, la massima frequenza percentuale delle “classi infiammatorie” nella fascia 12x. La sensibilità appare moderata e più alta nei NeuSeg, che raggiungono il 51% di “NeuSeg alti” già nella fascia 8x mentre i WBC restano al 37%. La specificità è elevata, dato che la massima differenza con il gruppo non infiammatorio è 5,9 per i NeuSeg e 7,7 per i WBC.
- I Band sono il parametro che mostra la maggiore *lentezza* di reazione rispetto alla CRP e i valori suggeriscono che la sua sensibilità sia molto bassa per le

infiammazioni di moderata entità, mentre diventa più elevata nelle infiammazioni più gravi.

Sicuramente la specificità è altissima, già nella fascia di incremento 2x, dove la percentuale di “Band alti” è solo 8% si osserva una differenza di 2,7 volte rispetto al gruppo non infiammatorio (differenza maggiore di quella massima osservata per il Fib), la massima differenza risulta addirittura 15,3.

Non sono presenti studi paragonabili in letteratura scientifica, poiché (come accennato prima) i molti lavori che studiano il comportamento dei marker infiammatori nel cane, si basano sui casi clinici o seguono l'evoluzione di processi infiammatori sperimentalmente indotti, in un numero più ristretto di soggetti e con un'organizzazione dei dati basata sul tempo, mentre questa rappresenta un'indagine puramente statistica sui dati a disposizione per ciascun parametro.

6.7 Presenza o assenza di alterazioni nei diversi marker a confronto con la CRP

6.7.1 Presenza di alterazioni infiammatorie*

Se, invece di indagare un parametro alla volta, si combinano insieme più parametri, il numero di campioni che presenta le relative alterazioni infiammatorie diminuisce. Questo mette in evidenza che i marker tra loro sono indipendenti e che le analisi ematobiochimiche di pazienti con patologie infiammatorie non presentano tutte le alterazioni tipiche di infiammazione.

L'utilizzo di più marker di flogosi permette quindi di disporre di un maggior numero di dati e, laddove un parametro non presenti alterazioni, magari un altro può dare indicazione di flogosi. Ovviamente i risultati devono poi essere interpretati dal medico, alla luce dei rilievi clinici e delle conoscenze relative a tutti i fattori che possono alterare le misurazioni di tali parametri.

Inoltre ci sono delle differenze tra i due gruppi. Il calcolo del rapporto tra la frequenza espressa nel gruppo infiammatorio e quella espressa nel gruppo non infiammatorio per varie combinazioni di parametri, ha permesso di quantificarle.

Un rapporto maggiore è espressione della maggiore differenza tra i risultati del gruppo infiammatorio e di quello non infiammatorio e, quindi, di una maggiore specificità.

Ad esempio il Fib da solo presenta il rapporto più basso (2,3) mentre combinato con l'Alb o il Fe i valori aumentano a 4,3 e 6,6 rispettivamente, perciò la combinazione di parametri biochimici che offre la specificità (apparentemente) maggiore è quella di Fib e Fe. L'associazione di tutti e tre i parametri biochimici non solo presenta un rapporto leggermente inferiore (6,4), ma comporta una forte riduzione delle frequenze (e quindi del numero di campioni) in entrambi i gruppi.

Ciò significa che l'Alb bassa è meno frequentemente associata alle alterazioni infiammatorie degli altri parametri e che la presenza di ipoalbuminemia non contribuisce ad aumentare la specificità di questi rilievi per quanto riguarda le patologie infiammatorie.

Riguardo alla prima osservazione va ricordato che l'emoconcentrazione che si verifica in caso di disidratazione può facilmente mascherare un'ipoalbuminemia e questa è una situazione che non dev'essere sottovalutata; inoltre le variazioni che l'Alb esprime in corso di infiammazione sono talvolta limitate e possono rimanere all'interno del range di riferimento, motivo per cui la sua valutazione potrebbe acquistare un maggior valore se eseguita in serie per monitorarne il trend.

In merito alla scarsa specificità, ciò è dovuto all'elevato numero di fattori che influiscono sulle concentrazioni plasmatiche di Alb con meccanismi diversi (produzione, perdita, redistribuzione); perciò nel valutare l'Alb come marker infiammatorio è ancor più importante valutare lo stato generale del paziente (stato di nutrizione e di idratazione) e conoscere o individuare le eventuali patologie sottostanti basandosi anche sui dati del segnalamento per indagare quelle più probabili (ad esempio nefropatie proteino-disperdenti nei cani anziani)

NeuSeg e Band insieme presentano il rapporto più elevato (9,1) tra tutte le combinazioni provate, indicando che neutrofilia associata a deviazione a sinistra della formula leucocitaria è un rilievo fortemente associato alla presenza di infiammazione. Il secondo rapporto più elevato è rappresentato dai soli Band, che rappresentano quindi un marker che, anche se preso singolarmente, risulta estremamente specifico. Fra l'altro le frequenze riportate per i Band sono maggiori di quelle riportate per NeuSeg e Band contemporaneamente aumentati, questo perchè nei campioni che presentano soltanto un aumento dei Band sono evidentemente presenti valori normali o diminuiti di NeuSeg.

6.7.2 Totale assenza di alterazioni

La totale assenza di alterazioni dei parametri Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg, Band risulta un attendibile indicatore di assenza di flogosi, anche se si registra un 5% di campioni nel gruppo infiammatorio che presenta questa situazione (57 campioni su 1080).

Tuttavia, osservando come questi campioni sono distribuiti rispetto alle fasce di incremento della CRP, si osserva che oltre la metà di questi campioni (32 su 57) appartiene alla prima fascia (2x).

Nelle altre fasce si nota che maggiore è il livello di incremento della CRP minore è il numero di frequenza riportata.

La presenza di campioni con valori di CRP compresi tra 0,30 e 0,60 mg/dL (fascia 2x) o tra 0,61 e 1,20 mg/dL (fascia 4x) e con tutti gli altri parametri nella norma è verosimile, poiché, tra questi, la CRP rappresenta il marker di flogosi acuta più precoce.

Basti pensare ai numerosi studi sperimentali dove, in seguito all'induzione di un processo infiammatorio, prima si assiste all'innalzamento dei valori di CRP e solo successivamente appare l'alterazione degli altri marker presi in considerazione.

A titolo di esempio, si ricordano i lavori riguardanti CRP e Fib (Slavov et al. 2011), CRP e Alb (Yamashita et al. 2005), CRP e WBC (Anziliero et al. 2013; Parra et al. 2005; Shimada et al. 2002; Yamamoto et al. 1994).

Inoltre, essendo la CRP un marker infiammatorio tanto sensibile quanto aspecifico, la presenza di valori moderatamente alti di questa proteina in assenza di altre alterazioni infiammatorie può dipendere dalla presenza di condizioni infiammatorie subcliniche, quindi di lieve entità. Una situazione spesso non presa in considerazione è, ad esempio, l'obesità. (Eisele et al. 2005; German et al. 2009)

La presenza di valori di CRP molto elevati (8x e 12x), con gli altri parametri nella norma, può ancora essere giustificata dalla possibile presenza di un processo infiammatorio acuto e grave in cui la CRP reagisce intensamente e in breve tempo, prima che gli altri parametri reagiscano uscendo dai limiti di riferimento.

E' anche plausibile che in questi casi l'unico marker che in realtà ha già subito delle variazioni sia il Fe, ma come spiegato precedentemente questo parametro può manifestare comportamento bifasico e quindi se la misurazione è stata effettuata ad 1 giorno circa dallo stimolo infiammatorio si può osservare una sideremia nella norma. Questi ipotetici casi sono tuttavia in numero limitato e statisticamente irrilevanti (8 campioni su 1080 nella fascia 8x; 3 campioni su 1080 nella fascia 12x).

La totale assenza di alterazioni dei parametri Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg, Band nel gruppo non infiammatorio riscontra invece una frequenza del 30% (229 campioni su 757).

Ci si sarebbe potuti aspettare una percentuale maggiore, ma va ricordato che anche in cani sani spesso si riscontra la presenza di uno o più parametri lievemente "alterati" (al di sotto o al di sopra dell'intervallo di riferimento). Inoltre molte patologie non infiammatorie possono causare alterazioni di vario tipo, così come alcune terapie farmacologiche, perciò l'assenza di un processo infiammatorio non è una condizione sufficiente a determinare valori di tutti i marker infiammatori all'interno dei rispettivi intervalli di riferimento.

6.8 Accuratezza, sensibilità e specificità dei diversi marker infiammatori rispetto alla CRP

In letteratura la CRP è stata più volte studiata mediante l'analisi della curva ROC per valutarne accuratezza, sensibilità e specificità diagnostiche.

Seo et al. nel 2012 hanno eseguito questo tipo di analisi in cani con cistite indotta sperimentalmente, riferendo un valore di AUC = 0,955, una sensibilità di 92,3% ed una specificità di 86,4% su valori di 12,2 mg/L di CRP.

Hanno inoltre calcolato il valore predittivo positivo, pari a 80%, e valore predittivo negativo, pari al 94%.

Christensen et al. in uno studio più recente (2014) hanno eseguito l'analisi della curva ROC valutando l'accuratezza diagnostica della CRP nei confronti di patologie infiammatorie sistemiche di vario tipo. Viene riportato solo il valore AUC = 0,976.

Sulla base dell'elevata accuratezza diagnostica della CRP nei confronti della presenza di infiammazione, lo stesso tipo di valutazione è stato eseguito sugli altri marker, utilizzando la CRP come indicatore di positività o negatività rispetto alla presenza di infiammazione.

L'analisi delle curve ROC esegue, per ogni parametro, una valutazione sugli specifici valori ottenuti in ogni campione e fornisce per ciascuno di essi la stima di sensibilità e specificità diagnostica.

I risultati ottenuti confermano alcune delle osservazioni tratte nelle precedenti indagini (che invece analizzavano i vari parametri in modo categorico).

La curva ROC offre inoltre una stima dell'accuratezza di ciascun marker come test diagnostico per le patologie infiammatorie, mediante il valore di AUC.

Con questo tipo di analisi il marker infiammatorio più sensibile risulta essere il Fib (52,7), seguono i NeuSeg (38,8) poi WBC (27,9), Fe (19,4), Alb (18,3) e per ultimi i Band (17,6).

Invece osservando la specificità il parametro con il valore più alto risulta essere quello dei Band (**98**), seguito da Fe (**95,4**), WBC (**94,2**), Alb (**93,4**), NeuSeg (**90,2**) e Fib (**77,5**).

Nel complesso tutti i parametri si presentano tendenzialmente poco sensibili e molto specifici, ad eccezione del Fib dove sensibilità e specificità hanno valori simili.

I risultati sopra menzionati, per ogni parametro, fanno riferimento ad uno specifico valore del parametro stesso, scelto moderatamente al sopra/sotto del suo normale intervallo di riferimento. Scegliendo un valore diverso la stima di sensibilità e specificità cambia, quindi il valore si allontana dal limite di riferimento minore è la sensibilità e maggiore è la specificità.

L'AUC invece prende in considerazione tutti i valori rappresentanti la curva ROC e, valutando l'estensione dell'area sotto alla curva, fornisce una stima complessiva dell'accuratezza del test.

Sulla base di questo, l'unico parametro risultato essere un "test moderatamente accurato" è quello dei NeuSeg, con valore AUC = **0,71**.

I WBC rientrano nella categoria inferiore "test poco accurato", ma di fatto il loro valore AUC = **0,70** indica un livello di accuratezza molto vicino a quello dei NeuSeg.

Nella stessa categoria sono presenti anche gli altri parametri, Fib, con AUC = **0,67**, Alb e Fe che presentano lo stesso valore AUC = **0,64**, mentre i Band con AUC **0,59** sono quelli con minore accuratezza.

All'atto pratico, questi risultati indicano che per diagnosticare una malattia infiammatoria non si dovrebbe prendere in considerazione uno solo di questi parametri, poiché sono tutti poco accurati o al limite inferiore della categoria moderatamente accurato.

6.9 Presenza di alterazioni leucocitarie e correlazione con i valori di CRP

Sebbene la presenza di alterazioni morfologiche dei leucociti, in particolare di neutrofili tossici, sia comunemente ritenuta indicativa di processi infiammatori, non esistono studi nel cane che riportano la correlazione tra queste alterazioni e valori di CRP.

Tuttavia è presente un interessante lavoro del 2005 dove gli autori, conducendo un'indagine retrospettiva su 248 cani con tossicità neutrofilica e 248 cani senza tale alterazione (gruppo di controllo), avevano osservato nel gruppo con tossicità neutrofilica una maggiore e significativa prevalenza di leucocitosi e leucopenia, neutrofilia e neutropenia, ed altre alterazioni ematobiochimiche. Il gruppo con neutrofili tossici presentava infatti una prevalenza significativamente maggiore di varie patologie infiammatorie gravi (piometra, infezioni da parvovirus, setticemie ecc..) oltre che una maggiore prevalenza di decessi. In particolare era stata osservata una significativa correlazione tra la severità delle alterazioni tossiche osservate nel citoplasma dei neutrofili e la presenza di leucopenia e i cani con tali anomalie rappresentavano il sottogruppo con la più alta incidenza di decessi. (Aroch et al. 2005)

Facendo invece riferimento alla medicina umana, è presente un lavoro del 2010 di Van de Vyer et al. dove gli autori hanno cercato di valutare la relazione tra presenza di neutrofili tossici e intensità delle granulazioni tossiche ed i livelli di CRP. I dati ottenuti

su 357 campioni di sangue hanno dimostrato che, nell'uomo, la presenza e l'intensità delle granulazioni tossiche nei neutrofili è positivamente correlata ai valori di CRP.

In questa tesi, la correlazione di Neu TOX e Mon ATT con la CRP, calcolata con il test di correlazione per ranghi di Spearman, è risultata bassa ma altamente significativa. Ciò vuol dire che tali parametri sono indipendenti dalla CRP ma la loro presenza è fortemente associata al suo comportamento (e quindi alla presenza di infiammazione). Già osservando i risultati dello studio sulle relative distribuzioni, appariva evidente l'incremento dei Neu TOX del gruppo infiammatorio (con frequenza 10 volte maggiore del gruppo non infiammatorio), come anche quello dei Mon ATT, numericamente più rappresentati ma con incremento di minore intensità (rapporto delle frequenze 1,9). Questo permette di indicare tali alterazioni cellulari come attendibili marker di flogosi. I Neu TOX presentano una sensibilità molto bassa ma un'elevatissima specificità. I Mon ATT sono invece più sensibili ma meno specifici.

I Linf REA risultano invece non significativi, pertanto la loro presenza non può essere ritenuta indicativa di flogosi.

7 CONCLUSIONI

Tutto lo studio si basa sul postulato che valori di CRP $\geq 0,30$ mg/dL corrispondessero sistematicamente alla presenza di patologia infiammatoria, e che valori di CRP $\leq 0,29$ mg/dL corrispondessero all'assenza di patologia infiammatoria.

Sebbene la CRP sia il parametro d'elezione per la diagnosi di patologia infiammatoria, non ha una sensibilità ed una specificità del 100% (come di fatto nessun test è realmente in grado di avere). Quindi all'interno di questa indagine sono sicuramente presenti degli errori relativi alla presenza di infiammazione, ma l'elevato numero di campioni rende tali errori meno influenti.

Per quanto è emerso dai risultati e dalla discussione si può riassumere che:

- Fib, Alb, Fe, WBC, NeuSeg e Band sono dei marker di flogosi che se considerati singolarmente hanno un potere diagnostico scarso;
- Fib, Alb, Fe e i parametri leucocitari risultano tra loro statisticamente indipendenti, soprattutto il Fe che non ha mostrato alcuna correlazione significativa con i parametri leucocitari e che presentava una correlazione estremamente bassa sia con CRP che con Fib;
- Le sensibilità e specificità di ciascun marker rispetto alla diagnosi di infiammazione è diversa, il Fib è quello risultato il più sensibile e i Band i più specifici.

Per queste ragioni, le informazioni che ogni marker può fornire assumono un diverso valore se sono associate a quelle di tutti gli altri.

La combinazione di più parametri contemporaneamente aumenta la possibilità di rilevare alterazioni infiammatorie e la rilevazione di più alterazioni contemporaneamente aumenta la specificità della diagnosi di infiammazione.

Inoltre, si devono tenere in considerazione i vari fattori che sono in grado di condizionare la concentrazione ematica di questi parametri per poter dare la corretta interpretazione alla lettura dei risultati, intravedendo anche nel valore "normale" o con alterazione opposta un campanello d'allarme (come WBC, NeuSeg o Fib) o viceversa per distinguere una patologia infiammatoria da altre condizioni (che inducono alterazioni simili in alcuni parametri ma diverse in altri).

La CRP sarebbe sempre da includere per quei pazienti in cui dev'essere indagata la presenza di infiammazione, tuttavia questo parametro è meno diffuso nella comune pratica clinica veterinaria. A maggior ragione l'assenza di un marker così significativo deve essere compensata dall'accurato studio degli altri parametri a disposizione, a cominciare da quelli leucocitari che devono essere completi e derivanti da una competente lettura microscopica dello striscio ematico, per il riconoscimento dei Band e delle possibili alterazioni leucocitarie Neu TOX e Mon ATT, che si sono rivelate significativamente correlate alla presenza di infiammazione.

Bibliografia

- Abbas A.K., Lichtman A.H., Pober J.S., 2000. Cellular and molecular immunology. 4th edition by W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania.
- Adamama-Moraitou, K.K. et al., 2005. Short-term exogenous glucocorticosteroidal effect on iron and copper status in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *Canadian Journal of Veterinary Research*, 69(4), pp.287–292.
- Aguggini G., Beghelli V., Giulio L.F. 2006. *Fisiologia degli Animali Domestici con elementi di Etologia* 2th ed., Torino: UTET S.p.A. Divisione Scienze Mediche.
- Anraku, M. et al., 2001. Effect of oxidative stress on the structure and function of human serum albumin. *Pharmaceutical research*, 18(5), pp.632–639.
- Anziliero, D. et al., 2013. SERUM C-REACTIVE PROTEIN (CRP) MEASUREMENT IN DOGS WITH ALTERED HEMATOLOGICAL PARAMETERS. *Ciência Animal Brasileira*, 14, pp.265–272.
- Aroch, I. et al., 2005. Clinical, biochemical, and hematological characteristics, disease prevalence, and prognosis of dogs presenting with neutrophil cytoplasmic toxicity. *Journal of Veterinary Internal Medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 19, pp.64–73.
- Biffi, W.L. et al., 1996. Interleukin-6 in the injured patient. Marker of injury or mediator of inflammation? *Annals of surgery*, 224(5), pp.647–64.
- Black, S., Kushner, I. & Samols, D., 2004. C-reactive Protein. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), pp.48487–48490.
- Calabro, P. et al., 2005. Release of C-Reactive Protein in Response to Inflammatory Cytokines by Human Adipocytes: Linking Obesity to Vascular Inflammation. *Journal of the American College of Cardiology*, 46(6), pp.1112–1113.
- Caldin, M. et al., 2009. Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions. *Veterinary Clinical Pathology*, 38, pp.63–68.
- Cartwright, G.E. et al., 1945. The anemia of infection II. The experimental production of hypoferrremia and anemia in dogs. *The Journal of clinical investigation*, 25(1), pp.81–86.
- Cartwright, G.E., Gubler, C.J. & Wintrobe, M.M., 1950. The anemia of infection XII the effect of turpentine and colloidal thorium dioxide on the plasma iron and plasma copper of dogs. *The Journal of biological chemistry*, 184(13), pp.579–587.
- Caspi, D. et al., 1987. C-reactive protein in dogs. *American journal of veterinary research*, 48(6), pp.919–21.
- Cerón, J.J., Eckersall, P.D. & Martýnez-Subiela, S., 2005. Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives. *Veterinary clinical pathology / American Society for Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), pp.85–99.
- Chaprazov, T.S. & Borissov, I., 2009. Time Course of Blood C-Reactive Protein and Fibrinogen Concentrations After Experimental *Pseudomonas* Infection in Dogs. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, 12(4), pp.240–245.
- Chen, W. et al., 2012. Atrial natriuretic peptide enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway. *Cardiovascular research*, 93(1), pp.141–51.
- Cheville, Norman F., 2003. *Patologia generale veterinaria*. Edizione italiana a cura di Enzo Cornaglia e Federico Valenza, Torino: UTET (Unione Tipografico-Editrice Torinese).
- Chikazawa, S., Nakazawa, T., et al., 2013. Change in Serum Ferritin Concentration in Experimentally Induced Anemia of Chronic Inflammation in Dogs. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 75, pp.1419–1426.
- Chikazawa, S., Hori, Y., et al., 2013. Factors Influencing Measurement of Serum Iron Concentration in Dogs: Diurnal Variation and Hyperferritinemia. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 75, pp.1615–1618.
- Christensen, M.B. et al., 2014. Comparison of serum amyloid A and C-reactive protein as diagnostic markers of systemic inflammation in dogs. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 55(February), pp.161–168.
- Crane, L.J. & Miller, D.L., 1977. Plasma protein synthesis by isolated rat hepatocytes. *The Journal of Cell Biology*, 72 (1), pp.11–25.
- Curry, F.-R.E. et al., 2010. Atrial natriuretic peptide modulation of albumin clearance and contrast agent permeability in mouse skeletal muscle and skin: role in regulation of plasma volume. *The Journal of physiology*, 588(Pt 2), pp.325–39.

- Dąbrowski, R. et al., 2009. Usefulness of C-reactive protein, serum amyloid A component, and haptoglobin determinations in bitches with pyometra for monitoring early postovariohysterectomy complications. *Theriogenology*, 72(4), pp.471–476.
- Dale, D.C., 2009. Neutrophil biology and the next generation of myeloid growth factors. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 7(1), pp.92–98.
- Dale, D.C., Boxer, L. & Liles, W.C., 2008. The phagocytes: neutrophils and monocytes. *Blood*, 112(4), pp.935–946.
- De Rienzo, V., 2012. Studio degli intervalli di riferimento nella Biochimica clinica del cane . Revisione e applicazione pratica. Università di Pisa.
- DeSouza B., 1993. *Neurobiology of Cytokines*, Vol 16 part A, New York: Academic Press.
- Douglas, J.W. & Wardrop, K.J., 2010. *Schalm's veterinary hematology*. 6th ed. J. W. Douglas & K. J. Wardrop, eds., Blackwell Publishing.
- Eckersall, P., Conner, J. & Harvie, J., 1991. An immunoturbidimetric assay for canine C-reactive protein. *Veterinary Research Communications*, 15(1), pp.17–24.
- Eckersall, P.D. et al., 1993. Acute phase proteins in canine pregnancy (*Canis familiaris*). *Journal of reproduction and fertility. Supplement*, 47, pp.159–64.
- Eisele, I. et al., 2005. Adipokine gene expression in dog adipose tissues and dog white adipocytes differentiated in primary culture. *Hormone and Metabolic Research*, 37(8), pp.474–481.
- Ettinger, S.J., Feldman, E.C., 2000. *Trattato di Clinica Medica Veterinaria*. Vol 1. 2th ed. italiana della 5th ed. americana, Roma: Antonio Delfino Editore / Medicina-Scienze.
- Evans, T.W., 2002. Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, 16 Suppl 5, pp.6–11.
- Festa, R. et al., 2012. Glycated albumin. Re-evaluation of an index of glycaemic control. *La Rivista Italiana della Medicina di Laboratorio - Italian Journal of Laboratory Medicine*, 8(2), pp.71–83.
- Fournier, T., Medjoubi, N. & Porquet, D., 2000. Alpha-1-acid glycoprotein 1. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1482, pp.157–171.
- Furlanello, T. et al., 2006. Stability of stored canine plasma for hemostasis testing. *Veterinary Clinical Pathology*, 35(2), pp.204–207.
- Furlanello, T. 2012. Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco, Proteine della Fase Acuta, Studio delle proteine di fase acuta. <http://www.sanmarcovet.it/pagina.asp?m1=172&m2=674>
- Gahmberg, B.Y.C.G. & Andersson, L.C., 1978. Leukocyte surface origin of human alpha1-acid glycoprotein (orosomucoid)*. *The Journal of Experimental Medicine*, 148(2), pp.507–521.
- German, a. J. et al., 2009. Improvement in insulin resistance and reduction in plasma inflammatory adipokines after weight loss in obese dogs. *Domestic Animal Endocrinology*, 37(4), pp.214–226.
- Gómez-laguna, J. et al., 2010. Acute Phase Proteins as Biomarkers in Animal Health and Welfare. In *Acute Phase Proteins as Early Non-Specific Biomarkers of Human and Veterinary Diseases*. pp. 259–298.
- Greenberg, B.G.R. et al., 1946. The anemia of infection V Fate of Injected radio-active iron in the presence of inflammation. *The Journal of clinical investigation*, 26, pp.121–125.
- Gruys, E., Toussaint, M.J.M. & Niewold, T. A., E.A., 2005. Acute phase reaction and acute phase proteins. *Journal of Zhejiang University.*, 6B(11), pp.1045–1056.
- Harvey, J.W., Levin, D.E., Chen, C.L., 1987. Potential effects of glucocorticoids on serum iron concentration in dogs. *Veterinary clinical pathology / American Society of Veterinary Clinical Pathology*, Volume 16, Issue 2, pp 46-50.
- Hayashi, S. et al., 2001. A comparison of the concentrations of C-reactive protein and alpha1-acid glycoprotein in the serum of young and adult dogs with acute inflammation. *Veterinary research communications*, 25(2), pp.117–26.
- Iacomini, A., 2014. Gli errori preanalitici in Medicina Veterinaria: interferenza dell'emolisi , della lipemia e dell'ittero nelle analisi di laboratorio del cane e del gatto. Università di Pisa.
- Jabs, W.J. et al., 2003. The kidney as a second site of human C-reactive protein formation in vivo. *European journal of immunology*, 33(1), pp.152–61.
- Jennewein, C. et al., 2011. Novel aspects of fibrin(ogen) fragments during inflammation. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 17(5-6), pp.568–73.
- Jensen, L.E. & Whitehead, A.S. 1998. Regulation of serum amyloid A protein expression during the acute-phase response. *The Biochemical journal*, 334, Pt 3, pp.489–503.
- Jergens, A.E. et al., 2003. A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 17(3), pp.291–297.

- Jurado, R.L., 1997. Iron, infections, and anemia of inflammation. *Clinical infectious diseases* □: an official publication of the Infectious Diseases Society of America, 25(4), pp.888–95.
- Kaneko, J.J., Harvey, J. & Bruss, M., 2008. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 6th ed. J. J. Kaneko, J. Harvey, & M. Bruss, eds., San Diego.
- Kemna, E. et al., 2005. Time-course analysis of hepcidin, serum iron, and plasma cytokine levels in humans injected with LPS. *Blood*, 106(5), pp.1864–1866.
- Kittrell, D. & Berkwitz, L., 2012. Hypercoagulability in Dogs □: Pathophysiology. *Compendium* (Yardley, PA), 34(April), pp.1–5.
- Kjelgaard-hansen, M. et al., 2013. Canine serum C-reactive protein as a quantitative marker of the inflammatory stimulus of aseptic elective soft tissue surgery. *Veterinary Clinical Pathology*, 3, pp.342–345.
- Klein, S.C. & Peterson, M.E., 2010. Canine hypoadrenocorticism: Part I. *Canadian Veterinary Journal*, 51(2), pp.179–184.
- Kocaturk, M. et al., 2010. Prognostic value of serum acute-phase proteins in dogs with parvoviral enteritis. *Journal of Small Animal Practice*, 51(9), pp.478–483.
- Kuribayashi, T. et al., 2003. Determination of serum C-reactive protein (CRP) in healthy beagle dogs of various ages and pregnant beagle dogs. *Experimental animals / Japanese Association for Laboratory Animal Science*, 52(May), pp.387–390.
- Lobetti, R.G. et al., 2000. A preliminary study on the serum protein response in canine babesiosis. *Journal of the South African Veterinary Association*, 71(1), pp.38–42.
- Lubas, G. et al., 2014. Lubas et al CBC procyte SISVet 2014.pdf. In *Clinical evaluation of CBC parameters obtained by laser cell counter in the dog*.
- Martinez-Subiela, S. et al., 2011. Acute phase protein response in experimental canine leishmaniosis. *Veterinary Parasitology*, 180(3-4), pp.197–202.
- Martínez-Subiela, S. et al., 2001. Proteínas De Fase Aguda: Conceptos Básicos Y Principa-. *Anales Veterinaria*, 4, pp.97–113.
- Martinez-Subiela, S. & Ceron, J.J., 2005. Evaluation of acute phase protein indexes in dogs with leishmaniasis at diagnosis, during and after short-term treatment. *Veterinárni Medicína - Czech*, 50(1), pp.39–46.
- Martínez-Subiela, S. & Cerón, J.J., 2005. Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia, and anticoagulants in canine C-reactive protein, serum amyloid A, and ceruloplasmin assays. *The Canadian veterinary journal. La revue vétérinaire canadienne*, 46(7), pp.625–9.
- Martínez-Subiela, S., Ginel, P.J. & Cerón, J.J., 2004. Effects of different glucocorticoid treatments on serum acute phase proteins in dogs. *The Veterinary Record*, 154(26), pp.814–817.
- Martínez-Subiela, S., Tecles, F. & Cerón, J.J., 2003. Critical differences of acute phase proteins in canine serum samples. *Veterinary Journal*, 166(3), pp.233–237.
- McClure, V. et al., 2013. Evaluation of the use of serum C-reactive protein concentration to predict outcome in puppies infected with canine parvovirus. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(3), pp.361–6.
- McCown, J.L. & Specht, A.J., 2011. Iron Homeostasis and Disorders in Dogs and Cats: A Review. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 47(3), pp.151–160.
- Merlo, A. et al., 2007. Serum C-reactive protein concentrations in dogs with multicentric lymphoma undergoing chemotherapy. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 230(4), pp.522–526.
- Meyer, D.J., Harvey, J.W., 2007. *Medicina di Laboratorio Veterinaria - Interpretazione e diagnosi*. 3th ed. italiana a cura di Battarin V. e DiFabio V. Roma: Antonio Delfino Editore / MedicinaScienze
- Mirici Cappa, F., 2012. Studio delle proprietà oncotiche e non oncotiche dell'albumina nel paziente con cirrosi epatica e ascite. Università di Bologna.
- Mitchell, K.D. et al., 2009. Serum acute phase protein concentrations in dogs with autoimmune hemolytic anemia. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 23(3), pp.585–91.
- Moshage, H., 1997. Cytokines and the Hepatic Acute Phase Response. *Journal of Pathology*, 181, pp.257–266.
- Mukorera, V. et al., 2011. Serum C-reactive protein concentration in benign and malignant canine spirocercosis. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 25(4), pp.963–6.
- Mundim, A.V. et al., 2006. Influence of age and sex on the serum biochemical profile of Doberman dogs in the growth phase. *Comparative Clinical Pathology*, 16(1), pp.41–46.

- Murata, H., Shimada, N. & Yoshioka, M., 2004. Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *The Veterinary Journal*, 168(1), pp.28–40.
- Murphy, K., 2011. *Janeway's Immunology*. 8th ed., New York: Garland Science, Taylor & Francis Group.
- Nakamura, M. et al., 2008. C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 70(2), pp.127–131.
- Ndung'u, J.M., Eckersall, P.D. & Jennings, F.W., 1991. Elevation of the concentration of acute phase proteins in dogs infected with *Trypanosoma brucei*. *Acta tropica*, 49(2), pp.77–86.
- Nemeth, E. et al., 2004. IL-6 mediates hypoferrremia of inflammation by inducing the synthesis of the iron regulatory hormone hepcidin. *The Journal of clinical investigation*, 113(9), pp.1271–1276.
- Ohno, K. et al., 2006. C-reactive protein concentration in canine idiopathic polyarthritis. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 68(12), pp.1275–9.
- Otabe, K. et al., 2000. C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury. *Laboratory animals*, 34(4), pp.434–8.
- Paltrinieri, S., 2007. Early biomarkers of inflammation in dogs and cats: The acute phase proteins. *Veterinary Research Communications*, 31(SUPPL. 1), pp.125–129.
- Parra, M.D., Tuomola, M., Cabezas-Herrera, J., Cerón, J.J., 2006. Analytical and clinical validation of a time-resolved immunofluorometric assay (TR-IFMA) for canine C-reactive protein in serum. *Veterinary research communications*, 30(2), pp 113–26.
- Pasceri, V., Willerson, J.T. & Yeh, E.T.H., 2000. Direct Proinflammatory Effect of C-Reactive Protein on Human Endothelial Cells. *Circulation*, 102(18), pp.2165–2168.
- Petersen, H.H., Nielsen, J.P. & Heegaard, P.M.H., 2004. Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 34(1), pp.27–45.
- Poland, D.C.W., et al., 2002. High level of alpha 1-acid glycoprotein in human seminal plasma is associated with high branching and expression of Lewis groups on its glycans: supporting evidence for a prostatic origin – The prostate. Volume 52, Issue 1, pages 34–42.
- Pontieri, Russo & Frati eds., 2004. *Patologia Generale II* volume. 3th ed., Padova: Piccin Nuova Libreria S.p.A.
- Princen, H.M. et al., 1984. The influence of glucocorticoid on the fibrinogen messenger RNA content of rat liver in vivo and in hepatocyte suspension culture. *The Biochemical journal*, 220(3), pp.631–637.
- Prinsen, B.H.C.M.T. & de Sain-van der Velden, M.G.M., 2004. Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 347(1-2), pp.1–14.
- Rikihisa, Y. et al., 1994. C-reactive protein and alpha 1-acid glycoprotein levels in dogs infected with *Ehrlichia canis*. *Journal of clinical microbiology*, 32(4), pp.912–7.
- Robbins, S.L. et al., 2005. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease* 7th ed., Unites States - Philadelphia: Elsevier/Saunders.
- Sala Gutierrez, E., 2010. Vautazione prognostica di indicatori clinici e marker di flogosi in corso di parvovirosi canina. Università di Bologna.
- Scheller, J. et al., 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1813(5), pp.878–888.
- Seo, K.W. et al., 2012. C-reactive protein as an indicator of inflammatory responses to experimentally induced cystitis in dogs. *Journal of Veterinary Science*, 13, pp.179–185.
- Sheafor, S.E. & Couto, C.G., 1999. Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs. *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(1), pp.38–46.
- Shimada, T. et al., 2002. Monitoring C-reactive protein in beagle dogs experimentally inoculated with *Ehrlichia canis*. *Veterinary Research Communications*, 26(3), pp.171–177.
- Silverstein D., Hopper K., 2014. *Small Animal Critical Care Medicine*, United States, Philadelphia: Elviers/Saunders.
- Slavov, E. et al., 2011. Blood C reactive protein (CRP) and fibrinogen concentrations during staphylococcal ex-perimental infection in obese dogs. *Revue Méd. Vét*, 162(12), pp.599–603.
- Smith, J.A., 1994. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *Journal of leukocyte biology*, 56(6), pp.672–686.
- Sodikoff, C.H., 1997. *Medicina di Laboratorio del cane e del gatto - Guida pratica alle diagnosi di laboratorio*. 1° ed. italiana alla 2° ed. americana, Cremona: Edizioni Veterinarie S.r.l.

- Solter, P.F., Hoffmann, W.E., Hungerford, L.L., et al. (1991) – Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs. *American Journal of Veterinary Research*; 52, pp 1738- 1742.
- Strimbu, K. & Tavel, J. a, 2011. What are Biomarkers? *Current Opinion in HIV and AIDS*, 5(6), pp.463–466.
- Stocham, S.L. & Scott, M.A., 2008. *Fundamentals of veterinary clinical pathology*. 2th ed., Blackwell Publishing.
- Streez, K.L. et al., 2001. Mediators of inflammation and acute phase response in the liver. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 47(4), pp.661–73.
- Tagata, K., Yokoyama, S., Ginbo, T., Honda, M., et al., 1996. Quantitative capillary reversed passive latex agglutination test for C-reactive protein (CRP) in the dog. *Veterinary research communications*, 20(1), pp 21.30.
- Tecles, F. et al., 2005. Preliminary studies of serum acute-phase protein concentrations in hematologic and neoplastic diseases of the dog. *Journal of veterinary internal medicine / American College of Veterinary Internal Medicine*, 19(6), pp.865–870.
- Tecles, F. et al., 2009. Serum Acute Phase Protein Concentrations in Female Dogs with Mammary Tumors. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(2), pp.214–219.
- Tedeschi, S., 2010. Ruolo della proteina C-reattiva come marker prognostico in cani affetti da insufficienza renale. *Università di Pisa*.
- Thrall, M. anna et al., 2012. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry* 2th ed., John Wiley & Sons.
- Tisoncik, J.R. et al., 2012. Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, pp.16–32.
- Tizard Ian R., 2009. *Veterinary Immunology: an introduction* 8th edition, Pennsylvania, Philadelphia: Saunders/Elsevier Company
- Ulutas, P.A. et al., 2008. Acute phase protein levels in pregnancy and oestrus cycle in bitches. *Research in Veterinary Science*, 86(3), pp.373–376.
- Valentini, F. & Melis, C., 2009. Andamento Della Proteina C-Reattiva E Dell’aptoglobina In Cani Affetti Da Linfoma Prima E Durante Chemioterapia “Chop-Based” pp. 1–10.
- Van Gool, J. et al., 1984. Glucocorticoids and catecholamines as mediators of acute-phase proteins, especially rat a-macrofetoprotein. *Biochemical Journal*, 220, pp.125–132.
- Veiga, A.P.M. et al., 2008. Association of canine obesity with reduced serum levels of C-reactive protein. *Journal of veterinary diagnostic investigation: official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, Inc*, 20, pp.224–228.
- Vella L., 1992. *Enciclopedia Medica Italiana, Volume III dell'aggiornamento I*, Firenze: USES Edizioni Scientifiche S.r.l.
- Villiers, E., Blackwood, L., 2006. *Gli Esami di Laboratorio - Indicazioni Esecuzione Interpretazione - Cane e Gatto*. Torino: UTET S.p.A. Divisione Scienze Mediche.
- Willard, M.D. & Tvedten, H., 2012. *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, Elsevier/Saunders.
- Yamamoto, S. et al., 1994. Serum C-reactive protein and immune responses in dogs inoculated with *Bordetella bronchiseptica* (phase I cells). *Veterinary research communications*, 18(5), pp.347– 57.
- Yamashita, K. et al., 1994. Canine acute phase response: relationship between serum cytokine activity and acute phase protein in dogs. *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science*, 56(3), pp.487–92.
- Zapryanova, D., Mircheva, T. & Denev, S.A., 2013. Plasma protein profiles and fibrinogen concentrations in dogs with experimentally induced *Staphylococcus aureus* infection. *Revue Méd. Vét*, 164(3), pp.150–155.