



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Facoltà di Medicina Veterinaria

Corso di Laurea Specialistica in Medicina Veterinaria

TESI DI LAUREA

**RELAZIONE TRA INFIAMMAZIONE E
COAGULAZIONE NEL CANE**

Relatore: Ch.mo Prof. Daniele Bernardini

Correlatore: Dott. Marco Caldin

Laureanda: Anna Virginia Pigato
558006/MV

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

*Alla mia famiglia, a Fabio
ed agli amici più cari*

Indice

INTRODUZIONE: proteine di fase acuta e test coagulativi	Pag. 7
1. PROCESSO INFIAMMATORIO	Pag. 9
2. BIOMARKER D'INFIAMMAZIONE	
• 2.1 Proteine di Fase Acuta (APPs)	Pag. 17
• 2.2 Proteina C reattiva (CRP)	Pag. 19
3. PROCESSO EMOSTATICO	Pag. 21
4. BIOMARKER COAGULATIVI	
• 4.1 Conta Piastrinica (PLT)	Pag. 29
• 4.2 Tempo di Protrombina (PT)	Pag. 31
• 4.3 Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT)	Pag. 32
• 4.4 Fibrinogeno (Fib)	Pag. 34
• 4.5 Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's)	Pag. 35
• 4.6 Dimeri D (DD)	Pag. 36
• 4.7 Antitrombina (AT)	Pag. 38
5. INTRODUZIONE ALLO STUDIO	
• 5.1 Scopo del lavoro	Pag. 41
• 5.2 Panoramica della letteratura esistente	Pag. 42
6. MATERIALI E METODI	
• 6.1 Strumentazione	Pag. 45
• 6.2 Reagenti e metodiche	Pag. 45
• 6.3 Raccolta dei campioni	Pag. 46
• 6.4 Database della Clinica Veterinaria Privata "San Marco"	Pag. 47
• 6.5 Metodi statistici	Pag. 50
7. RISULTATI	
• 7.1 Risultati	Pag. 51

• 7.2 Studio delle correlazioni	Pag. 58
8. DISCUSSIONE	Pag. 65
9. CONCLUSIONI	Pag. 67
10. BIBLIOGRAFIA	Pag. 69
11. RINGRAZIAMENTI	Pag. 73
12. ALLEGATI	Pag. 75

INTRODUZIONE: proteine di fase acuta e test coagulativi

Il processo infiammatorio è caratterizzato dalla variazione delle concentrazioni di alcune proteine plasmatiche, dette proteine di fase acuta (APPs), che in base al loro comportamento vengono schematicamente suddivise in proteine di fase acuta positive (proteine che incrementano la loro concentrazione sierica) e proteine di fase acuta negative (proteine che diminuiscono la loro concentrazione sierica).

Sono APPs positive la proteina C reattiva (CRP), l'amiloide sierica A (SAA), l'aptoglobina (Hp), l' α -1 glicoproteina acida (AGP), la ceruloplasmina (Cp) ed il fibrinogeno; mentre l'albumina e la transferrina sono APPs negative.

Queste proteine svolgono un ruolo fondamentale nella regolazione dell'infiammazione e la determinazione delle loro concentrazioni permette di identificare la presenza e la gravità di tale processo.

Il processo infiammatorio e coagulativo sono intimamente connessi, infatti l'attivazione della coagulazione ed il deposito di fibrina sono una conseguenza dell'infiammazione e fanno parte dei meccanismi di difesa dell'ospite. In particolare, l'espressione di materiale pro coagulante (Fattore Tissutale) da parte delle cellule infiammatorie dà l'avvio al processo emostatico. Viceversa, i fattori della coagulazione (Trombina) e gli anticoagulanti (proteina C attivata) possono attivare i recettori presenti sulle cellule mononucleate o endoteliali, influenzando così la produzione di citochine e l'apoptosi delle cellule infiammatorie.

Alla luce di tale legame è necessario modificare la tradizionale interpretazione del processo coagulativo, considerando la risposta emostatica come parte integrante del processo infiammatorio.

1. PROCESSO INFIAMMATORIO

L'infiammazione è una reazione protettiva e complessa che consiste nella risposta vascolare, nella migrazione e attivazione dei leucociti ed in una reazione sistemica. È rivolta contro gli agenti lesivi, come microbi e cellule danneggiate (in genere necrotiche) ed il suo obiettivo è distruggere, diluire o confinare questi elementi patogeni.

Inoltre, è strettamente intrecciata con il processo riparativo e mette in atto una serie di eventi che mirano alla guarigione ed alla ricostruzione del tessuto danneggiato. In particolare, la riparazione, inizia durante le fasi precoci dell'infiammazione ma si completa, in genere, dopo che lo stimolo nocivo è stato neutralizzato.

Tuttavia, infiammazione e riparazione possono essere potenzialmente dannose.

La risposta infiammatoria consta di due componenti principali, una reazione vascolare ed una reazione cellulare. Coinvolge molti tessuti e cellule, tra cui il plasma, le proteine plasmatiche, le cellule circolanti (neutrofili, monociti, eosinofili, linfociti, basofili e piastrine), i vasi sanguigni ed i costituenti cellulari (mastociti che circondano intimamente il connettivo, fibroblasti, macrofagi residenti e linfociti) ed extracellulari del tessuto connettivo. La matrice extracellulare è costituita da proteine strutturali fibrose (collagene, elastina), glicoproteine adesive (fibronectina, laminina, ecc.) e proteoglicani.

I segni cardinali dell'infiammazione sono: rossore, tumefazione, calore, dolore e perdita di funzione.

È caratterizzata da un esordio rapido (secondi o minuti) e da una durata relativamente breve (pochi minuti, al massimo alcuni giorni). Può essere scatenata da diversi stimoli tra cui: infezioni e tossine microbiche, traumi, agenti fisici e chimici, necrosi tissutale, corpi estranei e reazioni di ipersensibilità.

Le componenti principali di tale processo sono costituite da:

- 1) Alterazione del calibro vascolare che sfocia in una variazione del flusso ematico.

Più precisamente, ad una costrizione transitoria delle arteriole (pochi secondi) fa seguito la vasodilatazione, indotta dall'azione dell'istamina e dell'ossido nitrico, sulla muscolatura liscia dei vasi. Questo fenomeno interessa in una prima fase le arteriole e successivamente porta all'apertura di nuovi letti capillari regionali. L'aumento del flusso ematico conseguente è la causa del calore e dell'arrossamento che contraddistinguono il processo infiammatorio.

- 2) Aumento della permeabilità vascolare con fuoriuscita di essudato (liquido ricco di proteine) nel tessuto extravascolare, che porta alla formazione di edema.

Sono stati proposti diversi meccanismi per la regolazione della permeabilità endoteliale in corso d'infiammazione:

- Formazione di aperture nell'endotelio delle venule (Majno G., Palade GE, 1961; McDonald DM et al., 1999). Interessa le venule di 20-60 μm di diametro, senza coinvolgere i capillari e

le arteriole (Majno G. et al., 1961), ed avviene immediatamente dopo l'esposizione a differenti mediatori chimici (istamina, bradichinina, leucotrieni ed altri) e di solito è reversibile e di breve durata (15-30 minuti). Tale fenomeno è noto come risposta immediata transitoria.

- Lesione endoteliale diretta con necrosi e distacco delle cellule endoteliali (Lentsch AB, Ward PA, 2000). Sono interessati tutti i livelli del microcircolo (venule, capillari, arteriole). Si riscontra nelle lesioni necrotizzanti ed è dovuta ad un danno diretto all'endotelio da parte dello stimolo lesivo (es. ustioni gravi). La fuoriuscita di liquidi e proteine inizia immediatamente dopo la lesione e viene mantenuta finché i vasi danneggiati non vengono trombizzati o riparati. Questa reazione è nota come risposta immediata sostenuta.

- Fuoriuscita ritardata e prolungata di liquidi e proteine. Inizia dopo una latenza di 2-12 ore, e perdura per ore o anche giorni ed interessa le venule ed i capillari. Può essere causata da lesioni termiche lievi o da tossine batteriche.

- Lesione endoteliale mediata dai leucociti. A seguito della loro adesione endoteliale, possono attivarsi, liberando metaboliti tossici dell'ossigeno ed enzimi proteolitici, che a loro volta causano danno o distacco endoteliale, dando luogo ad una maggiore permeabilità. Quest'azione di solito è limitata alle venule ed ai capillari polmonari e glomerulari, in cui i globuli bianchi aderiscono all'endotelio per periodi prolungati (Lentsch AB, Ward PA, 2000).

- Aumento della trascuriosità. Tale processo si verifica grazie a canali costituiti da agglomerati di vescicole e vacuoli interconnessi, non rivestiti, detti organuli vescicolo-vacuolari, attraverso il citoplasma endoteliale. Sembra che il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (Vascular Endothelial Growth Factor, VEGF) aumenti il numero e le dimensioni di questi canali, causando una fuoriuscita di liquidi (Dvorak AM, Feng D., 2001).

- Fuoriuscita di liquidi e proteine da vasi neoformati. I nuovi germogli vascolari restano permeabili, fino a quando le cellule endoteliali non si differenziano formando le giunzioni cellulari. Inoltre, sono più sensibili all'azione dei mediatori chimici, grazie all'elevata densità dei loro recettori (Bates DO et al., 2002).

3) Fuoriuscita dei leucociti dal microcircolo con accumulo nella sede di lesione e attivazione finalizzata all'eliminazione dell'agente lesivo.

Nella fase iniziale dell'infiammazione il flusso ematico rallenta (stasi) ed un maggior numero di globuli bianchi assume una posizione periferica lungo la superficie endoteliale (fenomeno della marginazione). A questo segue un processo denominato rotolamento in cui i leucociti rotolano lentamente lungo l'endotelio e vi aderiscono in modo transitorio, fino a fermarsi. L'adesione e la migrazione dei leucociti sono regolate, in gran parte, dal legame tra molecole di adesione complementari presenti sui leucociti e sulle cellule endoteliali. I mediatori chimici, chemioattrattori e alcune citochine, influiscono su questi processi modulando l'espressione di superficie e l'avidità di queste molecole di adesione (Muller WA, 2002; Luscinskas FW et al., 2002). I recettori di adesione coinvolti appartengono a quattro famiglie molecolari: le selectine, la superfamiglia delle immunoglobuline, le integrine e le glicoproteine mucina-simili.

Il reclutamento dei leucociti, nelle sedi di lesione ed infezione, è un processo multifase. Comporta l'adesione di tali elementi circolanti alle cellule endoteliali e la loro migrazione attraverso l'endotelio. I primi eventi sono costituiti dall'induzione delle molecole di adesione sulle cellule endoteliali. Istamina, trombina e fattore attivante le piastrine (PAF) stimolano la redistribuzione della P-selectina, dai suoi normali depositi intracellulari presenti sulla membrana di specifici granuli, alla superficie cellulare. I macrofagi residenti nei tessuti, i mastociti e le cellule endoteliali rispondono agli agenti lesivi attraverso la secrezione delle citochine TNF, IL-1 e delle chemochine. Le prime agiscono sulle cellule endoteliali delle venule post-capillari adiacenti all'infezione inducendo l'espressione di diverse molecole di adesione. Entro 1-2 ore, le cellule endoteliali iniziano ad esprimere la E-selectina ed i leucociti i ligandi per tali molecole. Questi ligandi interagiscono con la selectina, formando delle interazioni a bassa affinità, che vengono interrotte facilmente dal flusso di sangue.

Grazie all'azione delle chemochine, i globuli bianchi vengono successivamente attivati. La combinazione dell'attivazione delle integrine su tali elementi cellulari e dell'espressione dei ligandi per le integrine sull'endotelio (esercitata da TNF e IL-1), porta alla formazione di un legame saldo, nella sede d'infezione. In questo modo i leucociti sono in grado di concentrarsi nel sito infiammatorio.

A questo processo segue la diapedesi leucocitaria, cioè la migrazione attraverso l'endotelio dei leucociti stimolati dalle chemochine.

Dopo essere fuoriusciti dai vasi, tali cellule migrano nei tessuti verso la sede di lesione, in un processo definito chemiotassi, ossia un movimento orientato lungo un gradiente chimico. I più comuni agenti esogeni che fungono da chemioattrattori, sono i prodotti di origine batterica; mentre quelli endogeni sono rappresentati dai componenti del sistema del complemento, in particolare C5a, dai prodotti della via della lipossigenasi, soprattutto il leucotriene B4 (LTB4) e dalle citochine (es. IL-8).

Gli agenti chemiotattici si legano a specifici recettori transmembranari accoppiati alle proteine G. Segue la trasduzione del segnale e l'attivazione di diverse molecole effettrici che provocano un aumento del calcio citosolico ed attivano delle GTPasi. Queste ultime inducono la polimerizzazione e la riorganizzazione dell'actina sul margine della cellula, permettendo al leucocita di muoversi, estendendo i filopodi che trainano la parte posteriore della cellula nella direzione dell'estensione.

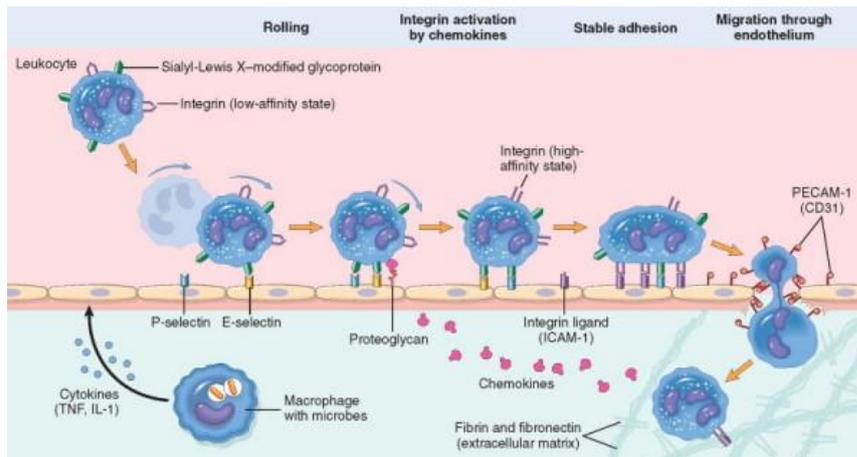


Figura 1. Migrazione dei leucociti attraverso i vasi sanguigni ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 8th edition)

Microrganismi, prodotti derivati dalle cellule necrotiche, complessi antigene-anticorpo e citochine, compresi i fattori chemiotattici, portano all'attivazione dei leucociti. Ad essa seguono delle risposte funzionali, quali: la produzione di metaboliti dell'acido arachidonico a partire dai fosfolipidi, a seguito dell'attivazione della fosfolipasi A2; la degranulazione e la secrezione di enzimi lisosomiali e l'attivazione della cascata ossidativa; la secrezione di citochine che amplificano e regolano le reazioni infiammatorie e la modulazione delle molecole di adesione leucocitarie.

I leucociti esprimono numerosi recettori di superficie che sono coinvolti nella loro attivazione, tra cui:

- Recettori Toll-like (Toll-Like receptors, TLR) che agiscono attivando i leucociti in risposta a differenti specie e componenti microbiche. Tali recettori funzionano grazie all'associazione con le chinasi che portano alla produzione di sostanze microbicide e di citochine da parte dei globuli bianchi.
- Diversi recettori con domini transmembranari accoppiati alle proteine G, che riconoscono i microrganismi ed alcuni mediatori prodotti in risposta all'infezione o al danno tissutale. Il legame dei ligandi, come i prodotti microbici e le chemochine, ai recettori accoppiati alle proteine G, induce la migrazione delle cellule del sangue attraverso l'endotelio e la produzione di sostanze microbicide.
- I fagociti esprimono recettori per le citochine che sono prodotte durante la risposta immunitaria. Una delle più importanti fra queste citochine è l'IFN- γ , che viene secreta dalle cellule natural killer (NK) nella risposta immunitaria innata e dai linfociti T attivati dall'antigene nella risposta immunitaria acquisita. Inoltre è la principale citochina che attiva i macrofagi.
- I recettori per le opsonine promuovono la fagocitosi dei microrganismi rivestiti da varie proteine e trasmettono segnali che attivano i fagociti. I fattori che realizzano l'opsonizzazione, cioè il rivestimento di una particella al fine di renderla bersaglio

della fagocitosi, sono le opsonine e comprendono anticorpi, frazioni del complemento e lecitine.

L'efficienza della fagocitosi è notevolmente aumentata quando i microbi sono opsonizzati dalle opsonine, per le quali i fagociti esprimono recettori ad alta affinità.

L'eliminazione degli agenti patogeni avviene grazie alla fagocitosi ed al rilascio di enzimi da parte di neutrofili e macrofagi. La prima è costituita da tre fasi distinte ma correlate tra loro:

- 1) Riconoscimento ed adesione alla particella da fagocitare da parte del leucocita. Anche se neutrofili e macrofagi possiedono la capacità di inglobare direttamente batteri o materiali estranei, la presenza di recettori facilita tale processo. I più importanti sono i recettori per il mannosio ed i recettori scavenger (spazzini) che agiscono legando ed ingerendo i microbi.
- 2) Ingestione della particella, con conseguente formazione di un vacuolo di fagocitosi. Si tratta di un processo complesso che comporta l'integrazione di numerosi segnali recettoriali, con il rimodellamento della membrana e le alterazioni del citoscheletro (Underhill DM, Ozinsky A., 2002).
- 3) Uccisione e degradazione del materiale ingerito (Underhill DM, Ozinsky A., 2002). Realizzata attraverso meccanismi ossigeno-dipendenti (Nathan C., Shiloh MU, 2000) che portano alla formazione degli intermedi reattivi dell'ossigeno all'interno dei fago-lisosomi, proteggendo così il leucocita dai loro effetti dannosi. Inoltre, all'interno dei granuli azzurrofilo dei neutrofili è presente l'enzima mieloperossidasi (MPO). Il sistema perossido di idrogeno-MPO-alogenuro è un meccanismo battericida molto efficiente. L'uccisione dei batteri può verificarsi grazie ad altre sostanze presenti all'interno dei granuli dei leucociti (Risso A., 2000), tra cui: la proteina permeabilizzante battericida (BPI), il lisozima, la lattoferrina, la proteina basica maggiore e le defensine. Infine, i granuli neutrofilo contengono molti enzimi (es. elastasi) che contribuiscono all'effetto microbicida.

Dopo l'uccisione, le idrolasi acide (immagazzinate nei lisosomi) degradano i microbi all'interno dei fago-lisosomi. A seguito della fagocitosi, i neutrofili, vanno rapidamente incontro a morte cellulare per apoptosi e vengono ingeriti dai macrofagi.

Solitamente, l'infiammazione acuta porta ad uno dei seguenti esiti:

1. Completa risoluzione quando il danno è limitato o di breve durata. Quando la lesione tissutale è stata di modesta entità, le cellule parenchimali danneggiate possono rigenerarsi, esitando nel ripristino anatomico-funzionale del sito oggetto di infiammazione.
2. Guarigione tramite sostituzione con tessuto connettivo (fibrosi). Avviene dopo un danno tissutale di notevole entità, quando la lesione infiammatoria colpisce i tessuti che non sono in grado di rigenerare o quando vi sia un abbondante essudato ricco di fibrina.
3. Progressione verso l'infiammazione cronica.

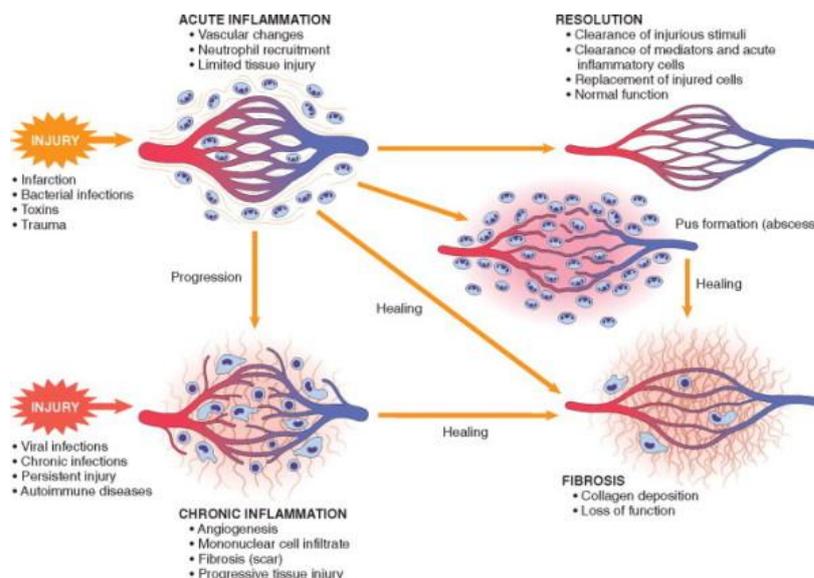
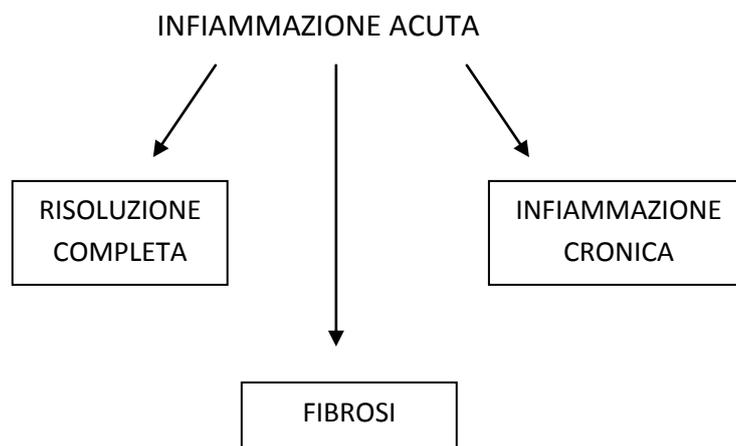


Figura 2. Esiti dell'infiammazione acuta ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 8th edition)



Data la sua elevata potenza, il processo infiammatorio richiede un sistema di controllo che agisca al fine di limitare i suoi eventuali danni. In parte, esso regredisce spontaneamente perché i mediatori dell'infiammazione hanno un'emivita breve, vengono degradati dopo il loro rilascio e sono prodotti rapidamente solo per il tempo in cui lo stimolo persiste. Inoltre, con l'avanzare del tempo, si scatenano dei segnali di arresto che servono ad interrompere la reazione (Nathan CF, 2002).

L'infiammazione è caratterizzata anche da effetti sistemici:

- Febbre
- Aumento delle concentrazioni plasmatiche delle proteine di fase acuta (Baumann et al., 1994). Gli esempi più noti sono la proteina C reattiva (C-Reactive Protein, CRP), il fibrinogeno e l'amiloide sierica A (Serum Amyloid A, SAA).
- Leucocitosi (neutrofilia nelle infezioni batteriche, linfocitosi in quelle virali ed eosinofilia nelle infestazioni parassitarie). Alcune infezioni invece sono caratterizzate da leucopenia (es. infezioni causate da rickettsie e da alcuni protozoi).

- Altre manifestazioni: aumento della frequenza cardiaca e della pressione arteriosa; brividi, anoressia, depressione.

Una risposta infiammatoria insufficiente causa un aumento della suscettibilità alle infezioni ed un ritardo nella guarigione delle ferite e delle lesioni tissutali. Mentre una reazione eccessiva è alla base di numerose patologie, tra cui le allergie e le malattie autoimmuni.

2. BIOMARKER D'INFIAMMAZIONE

2.1. Proteine di Fase Acuta

La risposta di fase acuta è una reazione infiammatoria, non specifica e complessa, che avviene in seguito ad un danno tissutale. Le cause all'origine di tale risposta, possono essere infettive, immunologiche, neoplastiche e traumatiche ed il suo scopo è ripristinare l'omeostasi e rimuovere gli agenti responsabili del disturbo (Ebersole J., Capelli D., 2000; Whicher JT, Westacott CI, 1992).

Tale evento è caratterizzato da numerosi effetti sistemici, quali febbre, leucocitosi, aumento del cortisolo ematico e calo della concentrazione di tiroxina, cambiamenti metabolici (lipolisi, gluconeogenesi, catabolismo muscolare) e diminuzione delle concentrazioni sieriche di ferro e zinco ed è inoltre in grado di modificare le concentrazioni di diverse proteine plasmatiche, dette **proteine di fase acuta (APPs)** (Kushner I., Mackiewicz A., 1993; Eckersall PD, 1995). In corso d'infiammazione alcune di esse diminuiscono e vengono definite APPs negative; lo sono ad esempio l'albumina e la transferrina, altre invece aumentano e quindi sono delle APPs positive come la proteina C reattiva (CRP), l'amiloide sierica A (SAA), l'aptoglobina (Hp), l' α -1 glicoproteina acida (AGP), la ceruloplasmina (Cp) ed il fibrinogeno. Le proteine appartenenti a questo secondo gruppo, in base alla loro risposta agli stimoli pro-infiammatori, vengono classificate in principali ed in moderate. Le principali (CRP, SAA) presentano le seguenti caratteristiche: rapido incremento e decremento delle concentrazioni sieriche, ed intensità dell'incremento stesso (1-100 volte la loro concentrazione sierica basale). Le moderate (Hp, AGP e Cp) invece sono caratterizzate da un incremento sierico più modesto (1-10 volte il livello basale) e da una maggiore lentezza nel raggiungimento del picco secretorio, così come del calo sierico (Cerón JJ et al., 2005).

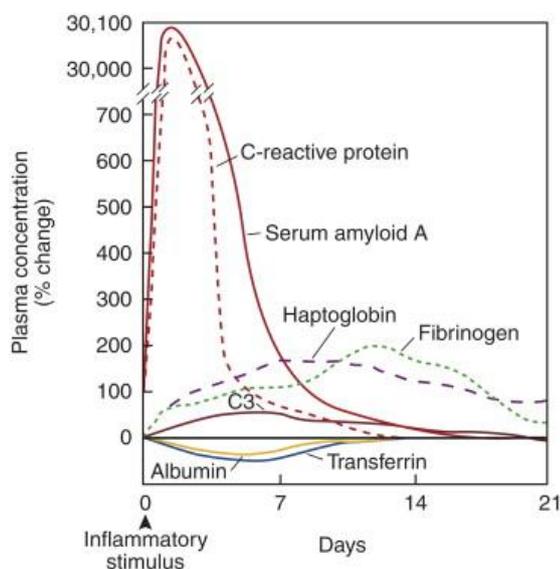


Figura 3. Cambiamento dei livelli plasmatici delle APPs a seguito di uno stimolo infiammatorio moderato ("Molecular biology of acute-phase plasma proteins" Gitlin JD, Colten HR, 1967, vol.14, pag. 123-153)

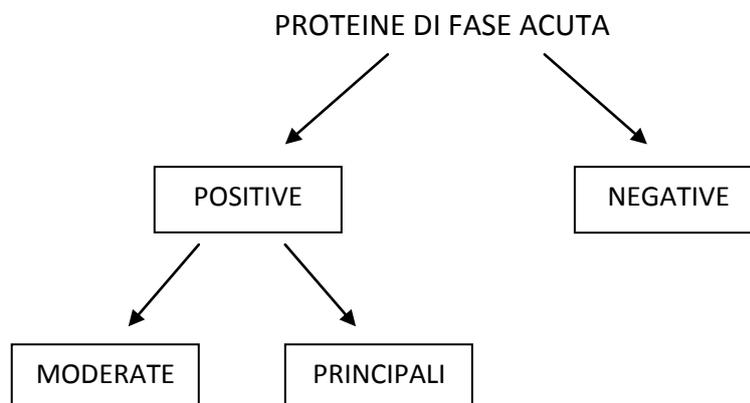
Le APPs positive sono costituite da glicoproteine sintetizzate principalmente dagli epatociti sotto stimolazione delle citochine pro-infiammatorie e successivamente rilasciate nel sangue.

Le principali citochine pro-infiammatorie sono l'interleuchina (IL)-6, IL-1 ed il tumor necrosis factor (TNF)- α . Nel cane, come nell'uomo, l'IL-6 è una delle più importanti citochine in grado di indurre la sintesi di diverse APPs, esercitando la sua azione singolarmente (come per l'Hp) oppure coadiuvata dall'IL-1 (come invece avviene per la CRP e la SAA) (Kushner I., Mackiewicz A., 1993).

Le APPs come ad esempio l'AGP, l'Hp e la SAA possono essere prodotte anche in altri tessuti. La produzione extraepatica di AGP è stata descritta, nell'uomo, in diversi organi, tra cui rene, intestino, cuore e prostata (Poland DCW et al., 2002) ed in diversi tipi di cellule ematiche (Fournier T. et al., 2000) come i linfociti. La produzione linfocitaria di AGP sembra trovare conferma anche nel cane e nel gatto come dimostrato dagli elevati livelli di questa APPs in corso di linfoma (Gahmberg CG, Anderson LC, 1978).

Polmone, tessuto adiposo, milza e rene invece possono produrre l'Hp (Ebersole J., Capelli D., 2000; Dobryszczycka W., 1997).

La produzione di SAA, invece, è stata dimostrata in tessuti quali intestino, rene, midollo osseo, adipociti (in caso di iperglicemia) e ghiandola mammaria (in caso di mastiti), in diverse specie animali (Lin Y. et al., 2001; Eckersall PD et al., 2001).



La produzione delle APPs, nel sito d'inizio della reazione di fase acuta, si aggiunge a quella epatica e grazie alla riduzione del danno tissutale, contribuisce al mantenimento dell'omeostasi (Fournier T. et al., 2000).

La risposta di fase acuta ha tre caratteristiche principali:

- È una risposta molto veloce che si sviluppa prima della stimolazione della risposta immunitaria specifica ed in molti casi anche prima dell'inizio dei segni clinici. Pertanto, è considerata un marker precoce per qualsiasi processo patologico.
- Si sviluppa secondariamente a numerose condizioni che possono produrre danno tissutale (infettive, immunologiche, neoplastiche,

traumatiche) e quindi non è patognomonica di una determinata patologia.

- Presenta una differente variabilità nelle diverse specie. A seguito di uno stimolo infiammatorio, la produzione, ad esempio, della CRP risulta importante nel cane mentre risulta del tutto insignificante nel gatto (Kajikawa T. et al., 1999).

Le APPs sono coinvolte nella regolazione della risposta immunitaria, nell'infiammazione, nella protezione contro l'infezione e nella riparazione e guarigione del danno tissutale. Inoltre, esercitano effetti pro- ed anti-infiammatori con un delicato equilibrio tra le due funzioni (Hochepped T. et al., 2003).

Alcune proteine come l'AGP e l'albumina legano i farmaci; tale interazione può portare ad importanti implicazioni farmacocinetiche nei pazienti sottoposti a terapia e le variazioni dei livelli plasmatici delle APPs durante l'infiammazione possono alterare la concentrazione plasmatica dei farmaci liberi (Fournier T. et al., 2000; Belpaire FM et al., 1987; Ikenoue N. et al., 2000).

Le APPs giocano un ruolo preponderante anche nella fase cronica dell'infiammazione dove il loro innalzamento va ad aggravare il danno tissutale sottostante (Horadagoda NU et al., 1999; Martinez-Subiela S. et al., 2002) che accompagna la patologia determinando successive complicazioni come il deposito di alcune di queste proteine come ad esempio nella amiloidosi reattiva o nelle malattie cardiovascolari umane (Ceciliani F. et al., 2002; Slavkovsky P., 2005).

– Proprietà biochimiche e metodi di misurazione

Per identificare l'incremento delle concentrazioni delle APPs nell'infiammazione, possono essere impiegate metodiche elettroforetiche su gel di agarosio o su gel di acetato di cellulosa (Eckersall PD, 1995). Tuttavia, la valutazione individuale delle APPs è molto più sensibile (Martinez-Subiela S. et al., 2002).

2.2. Proteina C reattiva (CRP)

La CRP del cane ha un peso molecolare di 100 kD ed è costituita da 5 subunità ognuna di 20 kD. Questa proteina, fu la prima APPs descritta e venne definita nell'uomo come un marker sistemico molto sensibile dell'infiammazione e del danno tissutale (Pepys MB, Hirschfield GM, 2003; Volanakis JE, 2001). Vista al microscopio elettronico, la CRP canina, assomiglia a quella umana; la differenza principale è la glicosilazione di due delle cinque subunità di quella canina (Caspi D. et al., 1984; Eckersall PD, Conner JC, 1988). La diversa struttura chimica può spiegare, in parte, la difficoltà incontrata utilizzando anticorpi contro la proteina umana, nei test effettuati sul sangue canino (Parra MD et al., 2002).

La valutazione della sua concentrazione sierica viene effettuata principalmente con *“immunoassays”*, usando anticorpi specifici contro la CRP canina. Per questo scopo, sono stati sviluppati diversi modelli, tra cui una valutazione immunoturbidimetrica adattata per analizzatori biochimici automatici (Eckersall PD et al., 1991), ELISA (Rikihisa Y. et al., 1994; Eckersall PD et al., 1989) e un *“slide/capillary reverse passive latex agglutination test”* (Yamamoto S. et al., 1994; Tagata K. et al., 1996). Per la valutazione della CRP nel sangue intero canino (Parra MD et al., 2005), nella saliva (Parra MD et al., 2005) e nei versamenti (Parra MD et al., 2004), si possono impiegare dei nuovi metodi basati sul *“time-resolved fluorometry”* (TRFIA) (Parra MD et al., 2006).

Inoltre, in commercio è disponibile un kit ELISA specifico per valutare tale proteina nel cane (Kjelgaard-Hansen M. et al., 2003; Martinez-Subiela S. et al., 2005; Ceron JJ et al., 2004), ed un test immunoturbidimetrico automatico per la CRP sierica umana che può essere impiegato anche nella specie canina (Kjelgaard-Hansen M. et al., 2003).

Infine, recentemente, è stato prodotto un test rapido qualitativo, di tipo immunocromatografico, per la CRP canina (McGrotty YL et al., 2004), che permette di differenziare campioni con concentrazioni di CRP <5mg/L e >5mg/L. I risultati falsamente positivi sono il limite principale del test.

Nel gatto la CRP sembra non essere coinvolta nella risposta di fase acuta (Kajikawa T. et al., 1999), anche se recenti osservazioni aprono differenti ipotesi.

3. PROCESSO EMOSTATICO

L'emostasi è la risultante di una serie di processi molto complessi e finemente regolati con l'obiettivo di mantenere il sangue ad uno stato fluido da una parte, e di realizzarne la trasformazione in coagulo (trombo o tappo emostatico) laddove la noxa patogena lo richieda (contenimento della diffusione delle infezioni).

È regolata da tre componenti: la parete vascolare, le piastrine ed i fattori plasmatici della cascata coagulativa.

Gli eventi dell'emostasi, riassunti brevemente, sono:

- Vasocostrizione arteriolare transitoria a seguito della lesione iniziale; è data dai meccanismi riflessi neurogeni e sostenuta dalla secrezione locale di sostanze come l'endotelina (potente vasocostrittore di origine endoteliale).

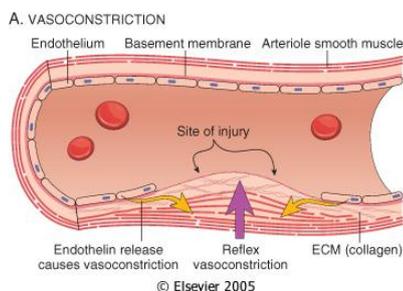


Figura 4. Vasocostrizione arteriolare transitoria ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition)

- Emostasi primaria.

Grazie all'esposizione della matrice extracellulare sub endoteliale, le piastrine vi aderiscono e si attivano, modificando la loro forma e rilasciando le sostanze contenute negli α -granuli; queste richiamano altre piastrine (aggregazione) per formare un tappo emostatico.

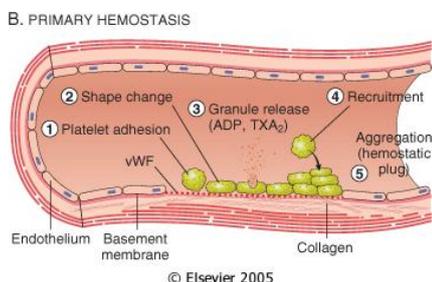


Figura 5. Emostasi primaria ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition)

- Emostasi secondaria.

Nella sede di lesione viene esposto il Fattore Tissutale che agisce insieme ai fattori secreti dalle piastrine per attivare la cascata coagulativa.

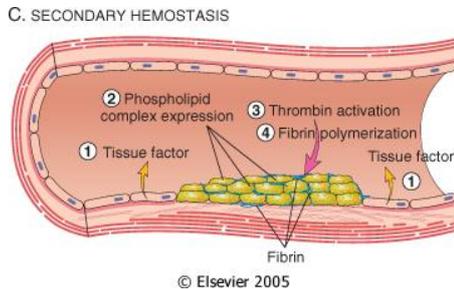


Figura 6. Emostasi secondaria (*"Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition*)

- Formazione di un tappo solido e permanente.

Grazie alla fibrina polimerizzata ed agli aggregati piastrinici. A questo stadio vengono attivati anche dei meccanismi controregolatori, affinché il tappo emostatico sia limitato alla sede di lesione.

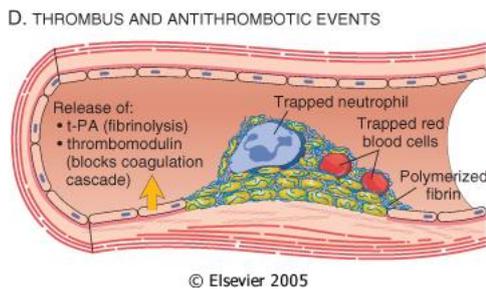


Figura 7. Eventi trombotici ed antitrombotici (*"Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition*)

Endotelio

L'endotelio può essere attivato da agenti infettivi, fattori emodinamici, mediatori plasmatici e citochine.

Le cellule endoteliali intatte hanno proprietà antiplastriniche, anticoagulanti e fibrinolitiche finalizzate a mantenere fluido il flusso ematico, inibendo l'adesione piastrinica e la coagulazione del sangue. A seguito di un danno o attivazione esibiscono invece proprietà procoagulanti, favorendo la formazione locale di coaguli.

Proprietà antitrombotiche dell'endotelio:

- Effetti antiplastrine (Pearson J., 1999).

L'endotelio intatto impedisce il contatto tra piastrine e fattori plasmatici della coagulazione con la matrice extracellulare sub endoteliale che è fortemente trombogenica. Inoltre, se le piastrine vengono attivate da un danno endoteliale

focale, la prostaciclina endoteliale (PGI₂) e l'ossido di azoto inibiscono la loro adesione al circostante endotelio intatto.

- Effetti anticoagulanti.

Esercitati da: 1) molecole eparino-simili che interagiscono con l'antitrombina per inattivare trombina, fattore Xa ed altri; 2) dalla trombomodulina che si lega alla trombina, convertendola da procoagulante ad anticoagulante, in grado di attivare la proteina C; quest'ultima adiuvata dalla proteina S (Esmon C., 2001) inibisce la coagulazione, distruggendo i fattori Va e VIIa. Inoltre, l'endotelio sintetizza l'inibitore del fattore tissutale (tissue factor pathway inhibitor) che forma un complesso inibente con il Fattore Tissutale ed i fattori VIIa e Xa (Kato H., 2002).

- Effetti fibrinolitici.

L'attivatore tissutale del plasminogeno (tissue-type plasminogen activator, t-PA) sintetizzato dalle cellule endoteliali, promuove la fibrinolisi (Lijnen H., Collen D., 1997).

Proprietà protrombotiche dell'endotelio:

- Effetti piastrinici.

L'adesione delle piastrine alla matrice extracellulare, a seguito del danno endoteliale, è facilitata dalla produzione endoteliale del Fattore di von Willebrand (vWF), cofattore essenziale per il legame delle piastrine al collagene e ad altre superfici (Denis C., 2002)

- Effetti procoagulanti.

Le endotossine batteriche e le citochine, inducono la sintesi del Fattore Tissutale da parte delle cellule endoteliali. Esso attiva la via estrinseca della cascata coagulativa (Doshi S., Marmur J., 2002).

- Effetti antifibrinolitici.

Le cellule endoteliali secernono anche l'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI) che deprime la fibrinolisi (Binder B. et al., 2002).

Piastrine

Ricoprono un ruolo centrale nell'emostasi (Bouchard B., Tracy P., 2001).

A seguito della lesione vascolare, entrano in contatto con i componenti della matrice extracellulare sub endoteliale: collagene, proteoglicani, fibronectina ed altre glicoproteine di adesione.

Successivamente, subiscono le seguenti reazioni:

- 1) Adesione e modificazione della forma.

La prima è mediata dalle interazioni del vWF che agisce come ponte tra i recettori di superficie delle piastrine (es. glicoproteina Ib) ed il collagene esposto. L'associazione vWF-glicoproteina Ib è l'unica interazione sufficientemente forte, in grado di resistere al flusso ematico.

2) Secrezione del contenuto degli α -granuli (P-selectina presente sulla membrana, fibrinogeno, fibronectina, fattore V e VIII, fattore piastrinico 4, fattore di crescita piastrino-derivato e fattore di crescita trasformante- β) e dei corpi densi. Il rilascio del contenuto di questi ultimi è molto importante poiché contengono anche il calcio, necessario nella cascata coagulativa, e l'ADP che è un potente mediatore dell'aggregazione piastrinica. Inoltre, l'attivazione piastrinica porta all'espressione di superficie di complessi fosfolipidici, che forniscono i siti di legame per il calcio e per i fattori della coagulazione nella via intrinseca (Heemskerk JW et al., 2002).

3) Aggregazione piastrinica.

L'ADP ed il trombossano A₂ (TxA₂), vasocostrittore secreto dalle piastrine, determinano la formazione del tappo emostatico primario. Questa prima aggregazione è reversibile, ma grazie alla trombina che si lega ai recettori di superficie delle piastrine, si ha un'ulteriore aggregazione. Segue la contrazione piastrinica che costituisce il tappo emostatico secondario, definitivo. Contemporaneamente la trombina converte il fibrinogeno in fibrina, che stabilizza e fissa l'aggregato piastrinico.

Inoltre, l'attivazione piastrinica mediata dall'ADP, provoca un cambiamento nella conformazione dei recettori di superficie piastrinica GpIIb-IIIa, in modo che possano legarsi al fibrinogeno, permettendogli di legare insieme più piastrine formando così degli ampi aggregati.

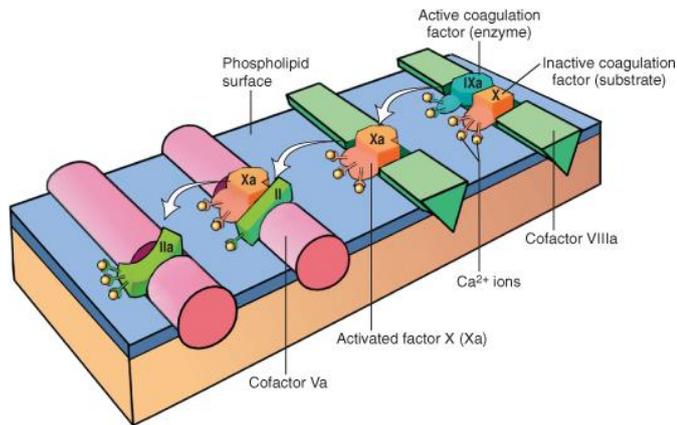
Nel tappo emostatico si osservano anche eritrociti e leucociti. La trombina stimola direttamente l'adesione di neutrofili e monociti e genera prodotti di degradazione della fibrina, che hanno azione chemiotattica, a partire dalla scissione del fibrinogeno.

L'interazione tra PGI₂ (vasodilatatore e inibitore dell'aggregazione piastrinica) e TxA₂ (vasocostrittore e attivatore dell'aggregazione piastrinica) bilancia la funzione piastrinica.

Cascata coagulativa

È costituita da una serie di reazioni enzimatiche che portano all'attivazione di enzimi e culminano nella formazione della trombina, responsabile della conversione del fibrinogeno (proteina plasmatica solubile) in fibrina (proteina fibrosa insolubile).

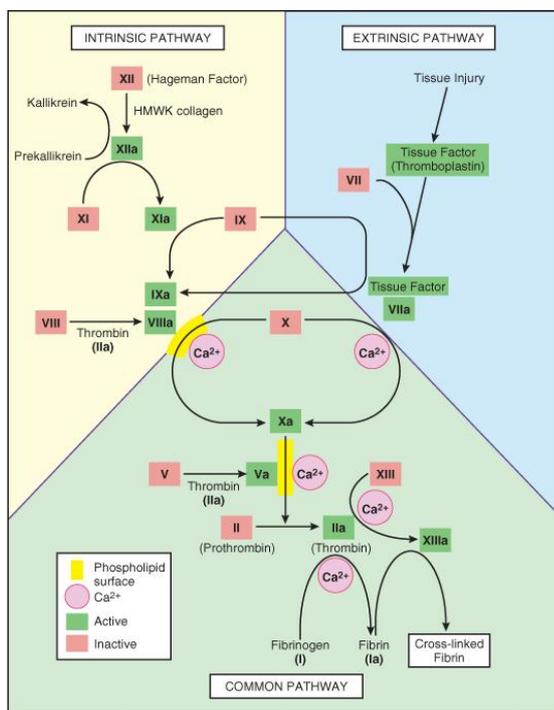
Ogni reazione è il risultato dell'unione di un complesso composto da un enzima (fattore di coagulazione attivato), un substrato (forma proenzimatica del fattore della coagulazione) ed un cofattore (acceleratore di reazione). Queste componenti vengono assemblate su un complesso fosfolipidico e tenute unite dagli ioni calcio. Infatti, la coagulazione tende ad essere localizzata nelle sedi dove tale assemblaggio può verificarsi (superficie piastrinica o endoteliale attivate) (Hoffman M., Monroe DR, 2001).



© Elsevier 2005

Figura 8. Illustrazione schematica della conversione del fattore X in fattore Xa, che a sua volta converte il fattore II (protrombina) nel fattore IIa (trombina) ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition)

Schematicamente la cascata coagulativa viene suddivisa in una via estrinseca ed una via intrinseca, che convergono nella via comune. Tuttavia, tale divisione è essenzialmente un artefatto delle analisi in vitro; ci sono, infatti, interconnessioni tra le prime due vie citate (Robbins e Cotran, "Le basi patologiche delle malattie" settima edizione 2006).



© Elsevier 2005

Figura 9. Cascata coagulativa ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition)

La via intrinseca può iniziare in vitro con l'attivazione del fattore di Hageman (fattore XII). Viene attivata dal contatto con il collagene sub endoteliale e le proteine coinvolte nella fase iniziale di questo processo sono costituite dal chinogeno ad elevato peso molecolare (HMWK), il quale si complessa con la precalicreina (PK) ed il fattore XII (Fattore di Hageman). Successivamente tale fattore viene attivato (XIIa), catalizzando a sua volta la produzione di callicreina dalla PK, con aumento della produzione del fattore XIIa (processo auto amplificante) e di fattore XIa che interviene nell'attivazione di altre proteine procoagulanti.

La produzione del fattore XIa genera la formazione del fattore IXa, il quale attiva e complessa il fattore VIII (VIIIa), assieme allo ione calcio ed ai fosfolipidi piastrinici. Questo processo a cascata è in grado di attivare il fattore X (Fattore Stuart) in fattore Xa, evento che segna l'inizio della via comune.

Il fattore Xa complessandosi a sua volta con il fattore Va, con i fosfolipidi piastrinici e lo ione calcio, attiva la protrombina (fattore II) in trombina.

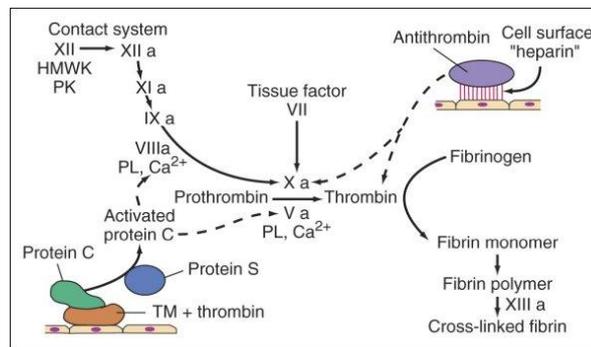


Figura 10. Via intrinseca (*"Principles of Internal Medicine" Harrison's, 18th edition*)

La via estrinseca è attivata dal Fattore Tissutale, una lipoproteina cellulare che viene esposta nel sito della lesione (Kato H., 2002; Semeraro N., Colucci M., 1997).

Il fattore VII (Proconvertina) complessandosi con il Fattore Tissutale (complesso Tenasico) ed il calcio, attiva la via comune (Fattore X).

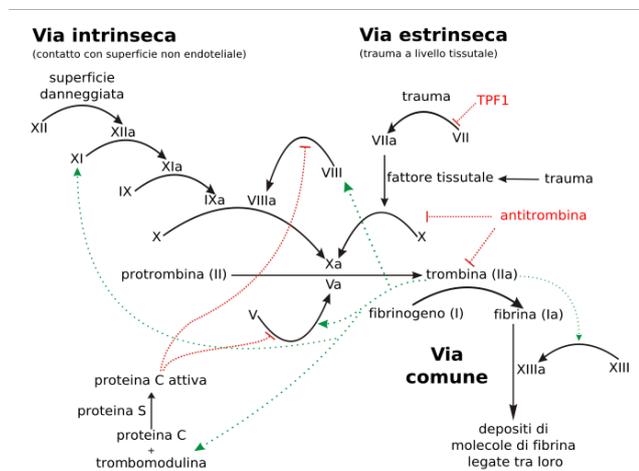


Figura 11. Via intrinseca, via estrinseca e via comune (*"Principi di Medicina Interna" Harrison's, 17a edizione*)

La via comune, attivata sia dalla via intrinseca che estrinseca, ha come obiettivo finale la produzione di una piccola quantità di trombina, in grado di generare fibrina insolubile dopo il distacco dei fibrinopeptidi A e B dalle catene α e β della molecola di fibrinogeno. Quindi si ha la formazione del complesso Protrombinasico costituito da: Xa, Va, calcio ione e fosfolipidi, che genera la trasformazione della protrombina in trombina. Essa attacca il fibrinogeno, distaccando i fibrinopeptidi A e B, e generando monomeri di fibrina insolubili che successivamente vanno incontro ad un processo di polimerizzazione e stabilizzazione, quest'ultimo coadiuvato dal Fattore XIII (Fattore di Laki-Lorand).

Inoltre, si lega ai recettori a serpentina, li attiva, ed avvia così la trasduzione del segnale di attivazione, con conseguente liberazione dei granuli, attivazione dei recettori del fibrinogeno e infine aggregazione piastrinica. Pertanto, la fase plasmatica influenza la fase piastrinica rendendo le differenti fasi coagulative, parti di un insieme con finalità di bloccare l'eventuale evento emorragico.

Una volta attivata, la cascata della coagulazione deve essere limitata al sito della lesione vascolare per evitare eventi trombotici e/o emorragici incompatibili con la vita. Oltre ai fattori limitanti attivati nel sito di esposizione dei fosfolipidi, essa è regolata da tre anticoagulanti naturali:

- L'antitrombina (AT), il più potente anticoagulante organico esistente, che inibisce l'attività della trombina.
- Le proteine C ed S, due proteine vitamina K-dipendenti. La trombina che sfugge alla complessazione plasmatica con AT interagisce con la trombomodulina. Tale complesso presente sulla superficie endoteliale contigua alla zona vascolare sede di lesione, contribuisce ad attivare la proteina C coagulativa, la quale con il contributo della proteina S, suo cofattore, esercita una potente azione anticoagulante nei confronti dei fattori Va e VIIIa.
- L'inibitore della via del fattore tissutale (Tissue Factor Pathway Inhibitor, TFPI), proteina secreta dall'endotelio e da altri tipi cellulari. Si lega al fattore Xa ed al fattore tissutale-VIIa, inattivandoli per limitare rapidamente la coagulazione (Galino P., 2002).

Tale sistema anticoagulante non consente di contenere in modo apprezzabile l'evoluzione del trombo e se non intervenisse un sistema ausiliario di riduzione del trombo stesso si giungerebbe all'occlusione completa del vaso con conseguente ischemia organica grave, evento peggiore rispetto all'emorragia.

La cascata fibrinolitica evita questa conseguenza, grazie alla produzione di plasmina (enzima proteolitico potentissimo), che limita le dimensioni del coagulo finale. Essa deriva dalla degradazione enzimatica del suo precursore circolante inattivo, il plasminogeno, sia attraverso una via fattore VII-dipendente, sia con due distinti tipi di attivatori del plasminogeno (PA). Il primo è la PA simil-urochinasi (u-PA), presente nel plasma ed in vari tessuti, che è in grado di attivare il plasminogeno nella fase fluida. Inoltre, a sua volta, la plasmina, converte il precursore inattivo pro-urochinasi nella molecola attiva u-PA, creando

un ciclo di amplificazione. Il secondo e fisiologicamente più importante PA, è il tissue-type PA, sintetizzato soprattutto dalle cellule endoteliali e più attivo quando è attaccato alla fibrina.

Il plasminogeno può essere attivato anche dalle streptochinasi di origine batterica.

La plasmina, quindi, scinde la fibrina ed interferisce con la sua polimerizzazione. I risultanti prodotti della scissione della fibrina agiscono anche come deboli anticoagulanti.

L'azione della plasmina viene confinata al coagulo. La quota che sfugge viene complessata dalla α -2-macroglobulina (proteina di fase acuta di origine epatica), che la inattiva, impedendone un'azione sistemica deleteria (Robbins e Cotran, "Le basi patologiche delle malattie" settima edizione 2006).

Contemporaneamente le cellule endoteliali rilasciano inibitori dell'attivatore del plasminogeno (PAI), che mantengono in equilibrio la produzione plasminica e quindi la proteolisi.

Il sistema fibrinolitico porta alla dissoluzione del trombo, formatosi in un lasso di tempo ragionevole affinché la restituito ad integrum, ad opera dei fibroblasti e delle cellule muscolari lisce sotto l'influsso dei fattori di crescita piastrinici, non si sia conclusa.

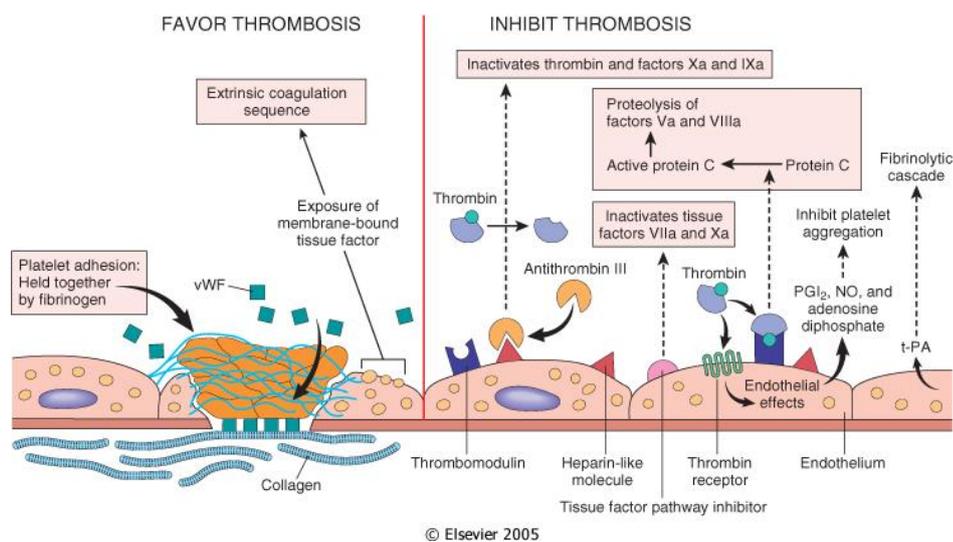


Figura 12. Il sistema fibrinolitico, con rappresentati gli attivatori e gli inibitori del plasminogeno ("Pathologic Basis of Disease" Robbins and Cotran, 6th edition)

4. BIOMARKER COAGULATIVI

4.1. Conta piastrinica (PLT)

Le piastrine sono piccoli frammenti cellulari ovoidali anucleati di piccole dimensioni (1/3-1/4 di un globulo rosso), di colore rosa pallido. La forma è dovuta ad un'impalcatura formata dai microtubuli. All'interno della cellula esiste una complicata rete di canali che, in parte, comunicano con l'esterno e formano i sistemi canalicolari interni che si invaginano in profondità nella struttura della piastrina. Tale sistema tubulare serve alla piastrina per riversare all'esterno l'enorme quantità di sostanze chimiche che essa produce. Queste invaginazioni possono modificarsi nel momento in cui la piastrina si attiva e diventare delle evaginazioni dette pseudopodi o filopodi. Inoltre all'interno delle piastrine sono presenti circa 35 alfa – granuli e 5 corpi densi come compartimenti di stoccaggio (Wurzinger L.J., 1990). Quando la cellula si attiva, i granuli vengono spostati verso il centro e formano un unico grande granulo.

Il rilascio dei mediatori piastrinici contenuti negli α -granuli gioca un ruolo centrale nella regolazione di tutte le fasi infiammatorie e sulle successive fasi riparative del danno tissutale. In contrasto con quest'azione, i mediatori rilasciati dai corpi densi esercitano effetti molto più selettivi sulla fase iniziale del processo infiammatorio.

In aggiunta alla loro capacità di rilasciare mediatori immagazzinati, le piastrine stimolate sono in grado di generare eicosanoidi per regolare l'emostasi e l'infiammazione.

In questo modo le piastrine sono un elemento chiave che collega il processo emostatico, l'infiammazione e la riparazione tissutale. Esse rispondono a segnali specifici generati dal danno tissutale o dall'invasione di patogeni. Sono i primi corpuscoli cellulari che si accumulano sul sito della parete vascolare danneggiata ed all'interno del tessuto circostante. Tali cellule sono in grado di aderire ai vasi sanguigni danneggiati, aggregandosi tra loro, e facilitando la formazione di trombina. Quest'azione contribuisce all'emostasi producendo un tappo piastrinico poi rinforzato dall'azione della trombina che converte il fibrinogeno in frammenti di fibrina.

Attraverso interazioni biochimiche, le piastrine possono comunicare ed essere, nello stesso tempo, influenzate da altre cellule ematiche ed endoteliali.

Una volta attivate hanno un contatto diretto con le cellule endoteliali, i granulociti, i monociti ed i linfociti. In questo modo possono stimolare o inibire gli altri partner cellulari dell'infiammazione ed aiutano la migrazione trans endoteliale dei leucociti nel tessuto circostante (Matthias H.F. Klinger, Wolfgang Jelkman, 2002).

La conta piastrinica viene ottenuta attraverso conte strumentali (ad impedenza od ottiche) e generalmente nei pazienti canini si aggira tra i 140.000-400.000 elementi cellulari per microlitro.

Le alterazioni della conta piastrinica comprendono le trombocitopenie e le trombocitosi, le cui cause sono di seguito elencate:

Le trombocitopenie:

- da consumo (coagulazione intravascolare disseminata DIC)
- da sequestro (epatomegalia, splenomegalia, shock, emorragie cavitare imponenti)
- da distruzione (trombocitopenie immunomediate primarie e secondarie)
- da mancata produzione (aplasie/ipoplasie midollari, leucemie, mielodisplasie e metastasi midollari di neoplasie secondarie)

Le trombocitosi:

- da corticosteroidi
- da splenectomia, in quanto la milza svolge la funzione di riserva delle piastrine
- da anemie ferroprive
- da risoluzione di trombocitopenie immunomediate
- da alterazioni mieloproliferative croniche (trombocitemia essenziale, leucemia mieloide cronica, policitemia)

Nei processi di natura infiammatoria dell'uomo il comportamento delle piastrine è stato descritto dettagliatamente da Matthias H.F. Klingler e Wolfgang Jelkmann "Role of blood platelets in infection and inflammation" (2002).

Nell'uomo la quantità di piastrine prodotte normalmente è maggiore in risposta ad episodi trombocitopenici e minore in corso di trombocitosi (McDonald T.P., 1998). I meccanismi regolatori comprendono i progenitori megacariocitici mieloidi ed i megacariociti (progenie delle cellule staminali ematopoietiche), la trombopoietina (TPO) e diversi peptidi immunomodulatori (Burstein S. A., 1997; Caen J.P., 1999).

I normali meccanismi di feedback che controllano i livelli plasmatici di TPO ed il tasso di produzione piastrinica vengono spesso turbati in corso di malattie infettive ed infiammatorie. Le infezioni acute, in particolare quelle virali, sono associate a trombocitopenia dovuta alla compromissione della megacariopoiesi (Bordin G. et al., 1995; Chelucci C., et al., 1998; Cole J.L. et al., 1998) e all'aumento del turnover piastrinico (Terada H. et al., 1966; Wang S. et al., 1995). I virus possono danneggiare i megacariociti e le piastrine direttamente o possono agire indirettamente attraverso la stimolazione della sintesi di IFN- α e INF- β . Questi interferoni somministrati agli umani sono in grado di causare la riduzione del numero di piastrine (Chan T.M. et al., 1997; Peck-Radosavljevic M. et al., 1998; Shiota G. et al., 1997).

Anche l'iniezione di lipopolisaccaridi batterici (LPS) (Stohlawetz P. et al., 1999) o di TNF- α (Tacchini-Cottier F. et al., 1998) può causare una riduzione acuta delle piastrine circolanti.

Una conseguenza analoga alla somministrazione di LPS è stata dimostrata nel cane. Una dose molto bassa di LPS (0.1 μ g/kg ev) misurata su campioni ematici prelevati a distanza di

tre e sei ore dalla somministrazione, riduceva significativamente la conta piastrinica (Flatland B. et al., 2011).

Pazienti con infiammazione cronica o neoplasie spesso sviluppano una trombocitosi reattiva. Mentre nell'uomo si conosce da tempo la possibilità che si sviluppi una piastrinosi da infiammazione, attualmente nel cane ci sono pochi studi che lo dimostrano (Marchetti V. et al., 2010).

In uno studio precedente a questo, Craven et al., rilevarono una trombocitosi solo nel 7% dei cani (M. Craven et al., 2004)

Sono necessari ulteriori studi per svelare il meccanismo responsabile dell'aumento delle piastrine nei cani con enterite cronica.

4.2. Tempo di Protrombina (PT)

Il Tempo di Protrombina (PT) è un test globale che permette di valutare i fattori I, II, V, VII, X ed è utile nel valutare i deficit congeniti ed acquisiti della via estrinseca della cascata coagulativa, come ad esempio: il deficit congenito della proconvertina nel Beagle (ipoproconvertinemia congenita); l'intossicazione da rodenticidi (difetto di attivazione dei fattori II, VII, IX, X); la DIC (coagulazione intravascolare disseminata); l'iperfibrinogenolisi primaria; l'insufficienza epatica; i disturbi dell'assorbimento della vitamina K (ostruzione delle vie biliari, malassorbimento enterico e/o pancreatico); la sindrome nefrotica e, raramente, la presenza di inibitori.

Carenze o inibitori dei fattori della coagulazione all'interno della via estrinseca e comune portano ad un prolungamento del PT.

Il Tempo di Protrombina è il tempo, espresso in secondi, che impiega il plasma citratato a coagulare dopo l'aggiunta di calcio ed un attivatore della via estrinseca (la tromboplastina/ Fattore Tissutale in sospensione con fosfolipidi).

La tecnica prevede l'aggiunta di 0.2 ml di reagente (tromboplastina in sospensione fosfolipidica con calcio) a 0.1 ml di plasma citratato termostato a 37 gradi centigradi. Il tempo necessario alla formazione del coagulo viene rilevato mediante metodo ottico (sviluppo di una torbidità rilevabile fotometricamente) od elettromeccanico (fibrina che blocca l'oscillazione di una sfera metallica sotto l'azione di un campo elettrico) e viene espresso in secondi.

I risultati del test devono essere comparati ad un intervallo di riferimento, stabilito da ciascun laboratorio, ottenuto da 40 pazienti privi di segni clinici di malattia (popolazione di riferimento). Tale intervallo varia in funzione del lotto di reagente tromboplastinico e della strumentazione utilizzata.

Lo stoccaggio del campione di plasma canino per 2 giorni a temperatura ambiente, non ha effetti significativi sui risultati del test per il PT (Furlanello et al., 2006).

Le proteine coagulative che compongono la via estrinseca devono ridursi significativamente (<30%) prima che il PT aumenti. Questo test non può essere considerato un test sensibile, infatti un PT normale può nascondere un deficit coagulativo lieve/moderato.

La concentrazione di alcuni fattori che compongono la via estrinseca nel cane sono presenti a concentrazione molto più elevate rispetto all'uomo (Fattore VII 300%, Fattore V 900%) da qui i diversi tempi di PT tra uomo e cane (in questa specie molto più brevi). Questa differenza gioca un ruolo significativo nell'interpretazione del test: prolungamenti anche modesti in termini di decimi di secondo si traducono in gravi deficit coagulativi.

Un deficit della via comune, non genera in egual misura un prolungamento dei test che esplorano le vie coagulative globali, in quanto la via estrinseca appare più sensibile a tali deficit.

Un prolungamento del PT può essere ascrivibile a:

- carenze congenite dei fattori della via estrinseca (Emofilia A, carenza di proconvertina del Beagle, ecc.)
- insufficienza epatica
- DIC
- iperfibrinogenolisi primaria
- intossicazione da rodenticidi

4.3. Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT)

Il Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT) misura l'integrità della via intrinseca e comune della cascata coagulativa.

Viene utilizzato come test di screening (Kitchens, 1988) per identificare deficienze congenite e acquisite o la presenza di inibitori.

Carenze o inibitori dei fattori della coagulazione all'interno della via intrinseca e comune portano ad un prolungamento dell'aPTT.

L'aPTT si presenta alterato ad esempio nella deficienza del fattore XII, della precalicreina e del chininogeno ad elevato peso molecolare ma deficienze individuali di questi fattori non danno sanguinamento.

Ridotte attività di fibrinogeno, protrombina, del fattore V o X (via comune), possono prolungare l'aPTT, anche se il PT è più sensibile.

L'aPTT può essere utilizzato per monitorare la terapia eparinica e svelare la presenza di eventuali inibitori coagulativi come il Lupus Anticoagulant (LA) e le sostanze eparino simili prodotte nelle neoplasie plasmocitarie (mieloma multiplo) e mastocitarie (mastocitoma).

L'aPTT è il tempo, in secondi, che impiega il plasma citratato a coagulare dopo l'aggiunta di frammenti di tromboplastina (accorgimento utilizzato per attivare solo la via intrinseca),

calcio ed un attivatore (Caolino, Celite, Silice, Acido Ellagico e Destrano solfato). Il reagente dell'aPTT è chiamato tromboplastina parziale perché il fattore tissutale non è in associazione con il fosfolipide com'è nel reagente per il PT (Bajaj SP, Joist JH, 1999).

La tecnica prevede l'aggiunta di 0.1 ml di reagente (frammenti di tromboplastina in sospensione fosfolipidica) a 0.1 ml di plasma citratato termostato a 37 gradi centigradi. Il tempo necessario alla formazione del coagulo, una volta aggiunto alla miscela precedente 0.1 ml di cloruro di calcio, viene rilevato mediante metodo ottico (sviluppo di una torbidità rilevabile fotometricamente) od elettromeccanico (fibrina che blocca l'oscillazione di una sfera metallica sotto l'azione di un campo magnetico) ed espresso in secondi. I risultati del test devono essere comparati ad un intervallo di riferimento ottenuto su una popolazione di riferimento costituita da 40 pazienti privi di segni clinici di malattia.

Tale intervallo varia in particolare in funzione del tipo di tromboplastina (Tromboplastina di encefalo di coniglio, di polmone di coniglio, o Tromboplastina ricombinante umana) (Mischke R., 2000). Rivestono minore importanza i differenti lotti di reagente (Mischke R., 2002) e della strumentazione utilizzata.

Il campione di plasma può essere conservato anche a temperatura ambiente per due giorni senza che si alterino i risultati del test; mentre nel plasma refrigerato dopo 48 o 72 ore di stoccaggio l'aPTT risulta prolungato (Furlanello et al., 2006).

Le proteine coagulative che compongono la via intrinseca devono ridursi significativamente (<30%) prima che l'aPTT aumenti. Questo test quindi non può essere considerato un test sensibile ed un aPTT normale può nascondere un deficit coagulativo lieve/moderato. Alcuni fattori che compongono la via intrinseca nel cane sono presenti a concentrazioni molto più elevate rispetto all'uomo (Fattore VIII 800%, Fattore XI 300%, IX 200%, XII 200%) da qui i diversi tempi di aPTT tra uomo e cane (in questa specie molto più brevi).

Modesti prolungamenti dell'aPTT devono essere interpretati conoscendo la sensibilità della Tromboplastina utilizzata, in quanto i differenti tipi di Tromboplastina generano risultati estremamente differenziati nei medesimi plasmi.

Carenze congenite dei fattori di contatto (chininogeno ad elevato peso molecolare, precalliecreina) e del fattore XII, generano tempi di aPTT estremamente elevati a fronte di un'assenza di segni clinici emorragici. Questo evento, dovuto all'attivazione del Fattore XI indipendentemente dal Fattore XII, viene differenziato dosando direttamente il Fattore XII o eseguendo l'aPTT con acido ellagico come attivatore, in quanto l'attivazione, mediante questo agente sintetico, parte dal Fattore XI e trascura i fattori di contatto.

Un prolungamento dell'aPTT può essere dato da:

- un'impropria raccolta del campione
- l'utilizzo di un anticoagulante diverso dal citrato di sodio al 3.2%
- un improprio rapporto tra sangue ed anticoagulante
- un paziente con ematocrito elevato (oltre 55%)
- carenze congenite dei fattori della via intrinseca

- insufficienza epatica
- DIC
- iperfibrinogenolisi primaria
- intossicazioni da rodenticidi (Couto GB, Sheafor SE, 1999)
- presenza di inibitori

La differenziazione tra carenza dei fattori e presenza di inibitori viene effettuata con la prova del miscelamento. Il campione oggetto di studio viene miscelato con un pool di plasmi provenienti da pazienti sani e viene quindi misurato l'aPTT. Se il paziente presenta un prolungamento dell'aPTT da carenza di fattori, il test si normalizza in quanto la mescolanza con il pool dei sani porta un contributo di almeno il 50% di attività dei fattori coagulativi, entità più che sufficiente per normalizzare i tempi di coagulazione anche in pazienti con gravi deficit coagulativi.

Carenze dei fattori VIII, IX e XI, tuttavia, causano disordini emorragici di varia gravità a seconda dei livelli dei fattori individuali.

Una volta che la carenza è stata individuata, il passaggio successivo è determinare se è congenita o acquisita (deficienza di vitamina K, patologia epatica, coagulopatia da consumo).

4.4. Fibrinogeno (Fib)

Il Fibrinogeno è una glicoproteina plasmatica solubile di elevato peso molecolare (340 kDa) (Weng et al., 1996) che viene trasformata in monomeri di fibrina a seguito della scissione operata dalla trombina (Soheier S. Adam et al., 2010).

Viene sintetizzato ed assemblato negli epatociti e nei fibroblasti, quindi secreto nel circolo sanguigno. La sua emivita plasmatica nel cane va dai 2,5 ai 4,5 giorni (Adelson E., 1965; Hammond J. D. S., D. Verel, 1959; Madden R. E., R. G. Gould, 1952; Rutherford R. B., R. M. Hardaway, 1966).

È una proteina di fase acuta (biomarker d'infiammazione) (Ross, 1999) e quando aumenta indica la presenza di un processo infiammatorio ed identifica soggetti con un alto rischio di patologie vascolari.

Recenti studi indicano che un incremento della concentrazione del fibrinogeno influenza il microcircolo, dando un incremento della viscosità plasmatica, dell'aggregazione dei globuli rossi e della trombogenesi delle piastrine, alterando la reattività vascolare e compromettendo l'integrità dello strato di cellule endoteliali. Questi cambiamenti provocano disfunzioni vascolari ed esacerbano le complicazioni del microcircolo in corso di patologie vascolari (D. Lominadze et al., 2009).

Viene usato anche per valutare anomalie ereditarie della sintesi del fibrinogeno (ipofibrinogenemia del San Bernardo e del Borzoi), disfunzioni epatiche, coagulopatie da

consumo (DIC), coagulopatie diluizionali (fluidoterapie aggressive), sindromi iperfibrinogenolitiche (Zoja et al., 2011) e nel monitoraggio delle terapie trombolitiche.

La misurazione del fibrinogeno è ritenuta un utile strumento per la diagnosi di DIC ma non si è dimostrata diagnostica in tutti i casi. Infatti, nonostante il consumo continuo, presente in questa condizione clinica, i suoi livelli plasmatici possono rimanere entro l'intervallo di riferimento. In uno studio la sensibilità dell'ipofibrinogenemia per la diagnosi di DIC era solo del 28% e generalmente indicava le forme di consumo maggiormente ingravescenti (Marcel Levi, Joost C. Meijers, 2010).

Esistono numerosi metodi per dosare il fibrinogeno. Tempo di coagulazione indotto dalla trombina (tempo di Trombina), dosaggio dell'antigene "fibrinogeno" mediante metodi immunologici ed il metodo gravimetrico. Tra tutti il più diffuso è il tempo di trombina modificato secondo "Clauss" (Clauss, 1957) che prevede l'aggiunta ad un plasma citratato diluito di una elevata concentrazione di trombina. Il tempo di coagulazione del plasma diluito è inversamente proporzionale alla concentrazione del fibrinogeno plasmatico quando vengono utilizzate elevate concentrazioni di trombina.

Il fibrinogeno può essere determinato normalmente anche nei pazienti sotto terapia eparinica.

Il tempo di coagulazione osservato dopo l'aggiunta di trombina, viene comparato a quello di un pool di plasmi standard. Ogni laboratorio deve prepararsi una curva standard utilizzando plasmi a valore noto.

La concentrazione di fibrinogeno diminuisce lievemente dopo che il campione è stato stoccato per 48 ore a temperatura ambiente (Furlanello et al., 2006).

Numerose condizioni non coagulative sono in grado di alterare i livelli ematici di questa glicoproteina.

Flogosi, corticosteroidi, estrogeni e gravidanza alterano i livelli plasmatici di questo analita rendendo difficile la diagnosi di eventuali coagulopatie da consumo. Si deve ricordare che anche le paraproteinemie (presenza di livelli elevati di una paraproteina o gammaglobulina monoclonale nel sangue) sono in grado di determinare una sottostima del fibrinogeno in quanto ostacolano la polimerizzazione della fibrina.

Un'iperfibrinogenemia può essere rilevata in caso di avvelenamento da rodenticidi (Couto GB, Sheafor SE, 1999).

4.5. Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's)

I Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's) rappresentano le scorie derivanti dall'azione esercitata dalla plasmina (enzima proteolitico molto potente)

prevalentemente sulla fibrina e sporadicamente sul fibrinogeno, in quanto lo zimogeno di partenza, il plasminogeno, presenta una forte affinità chimica per la fibrina.

Di conseguenza, la formazione della plasmina avviene all'interno del coagulo e solo una minima quantità fuoriesce esercitando un'azione proteolitica non selettiva rivolta anche a proteine ormonali ed al fibrinogeno. I frammenti che derivano dall'azione della plasmina sono prevalentemente D ed E (FDP's).

Una volta prodotti, i livelli plasmatici rimangono entro range fisiologici, grazie all'azione dei macrofagi epatici che provvedono alla loro metabolizzazione ed escrezione.

Per la misurazione degli FDP's vengono usati dei sistemi di agglutinazione al lattice manuali che utilizzano siero o plasma. I sistemi basati sul plasma sono preferibili in quanto non riconoscono il fibrinogeno e di conseguenza la positività appare maggiormente specifica. Tali test sono stati validati anche nella specie canina (Caldin M. et al., 1998; Agatha M. Boisvert et al., 2001)

Un'elevata concentrazione plasmatica degli FDP's può presentarsi in corso di:

- DIC (Bovill, 1994)
- iperfibrinogenolisi primaria (Zoia A. et al., 2011)
- insufficienza epatica
- terapie immunosoppressive (steroidi, chemioterapici)
- emorragie (avvelenamento da rodenticidi) (Couto CG, Sheafor SE, 1999)

Le affezioni che coinvolgono le cellule di Kuppfer (epatopatie diffuse, terapie immunosoppressive) riducono l'attività delle stesse determinando un incremento degli FDP's relativo ad un deficit di metabolizzazione piuttosto che ad una aumentata produzione (iperfibrinolisi).

4.6. Dimeri D (prodotti di degradazione della fibrina)

I Dimeri D sono dei frammenti fibrinici, testimoni diretti della formazione intravascolare di fibrina (trombo), in quanto derivano esclusivamente da essa (coagulo) e non dal fibrinogeno. La formazione dei Dimeri D necessita, da una parte di fibrina a livello intravascolare, e dall'altra che l'aggressione plasminica avvenga in contemporanea in due siti stechiometricamente opposti della catena fibrinica. Quest'evento è meno probabile rispetto ad un attacco casuale della plasmina sulla fibrina. Ne consegue che la produzione dei Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's) è più rapida di quella dei Dimeri D. È facile pensare anche ad un lasso temporale maggiore per la formazione degli stessi. Questo spiegherebbe perché in corso di traumi acuti, nella primissima fase di valutazione clinica, siano aumentati solo gli FDP's e solo alcune ore dopo anche i Dimeri D.

L'obiettivo del test è valutare la fibrinolisi, evento conseguente alla deposizione di fibrina in sede intravascolare.

I test commerciali moderni determinano i Dimeri D con diversi metodi. Tutti utilizzano anticorpi monoclonali che rilevano un epitopo, presente nel fattore XIIIa legato al frammento con dominio D della fibrina, ma non nei prodotti di degradazione del fibrinogeno o nei prodotti di degradazione della fibrina non legati.

Il determinante antigenico riconosciuto è una porzione dei polipeptidi del dominio D che è conformazionalmente reattiva dopo che il fattore XIIIa e la plasmina hanno modificato la proteina (Gaffney PJ et al., 1995).

Nonostante la loro capacità di misurare specificatamente la fibrina prodotta dall'azione della trombina, fattore XIIIa e plasmina, questi test hanno dei limiti dovuti sia alla loro specificità che alla loro sensibilità. I test disponibili attualmente per determinare i Dimeri D non sono identici perché l'antigene dei Dimeri D è presente in prodotti di degradazione di dimensioni diverse, gli anticorpi monoclonali riconoscono diversi epitopi, ed il tipo di test, gli standard di calibrazione, e la strumentazione, variano.

Poiché l'analita non è una semplice struttura con composizione uniforme, è necessario essere consapevoli delle performance del test utilizzato.

Nell'uomo gli sforzi effettuati per standardizzare i risultati del test, fino ad ora non hanno avuto successo.

Esistono metodiche quantitative immunoturbidimetriche (Caldin et al., 2008) e metodiche di agglutinazione al lattice semiquantitative (Stokol T. et al., 2000) validate per la veterinaria.

Alcuni pazienti possono richiedere la determinazione o il monitoraggio dei livelli di Dimeri D. In generale, il test dei Dimeri D può essere effettuato per verificare in quale misura è stata avviata la formazione di fibrina o per sapere se ci sono alcuni cambiamenti in questo processo in corso di una specifica terapia o patologia (Lowe GD, 2005; Rathbun SW et al., 2004). In pratica, la determinazione dei Dimeri D è stata più ampiamente validata nell'esclusione della trombosi venosa profonda dell'uomo, e nella diagnosi e monitoraggio della DIC.

La diagnosi di trombosi è complicata dal fatto che i livelli dei Dimeri D sono comunemente elevati nei pazienti ospedalizzati. Questo può rispecchiare alcuni dei diversi processi patologici sottostanti che avviano la formazione intravascolare di fibrina ma non necessariamente esitano in trombosi (Meesters EW et al., 2007).

Nei pazienti che ricevono una terapia anticoagulante per una trombosi acuta, i livelli plasmatici elevati dei Dimeri D si normalizzano gradualmente.

L'impiego di agenti con una predominante attività anti-Xa o di agenti con combinata attività anti-Xa e antitrombina, dà cambiamenti equivalenti nella formazione e degradazione della

fibrina dopo una trombosi acuta. I livelli plasmatici dei Dimeri D potrebbero quindi essere impiegati per monitorare la risposta alla terapia effettuata con questi agenti.

Un incremento dei Dimeri D deve considerare:

- una DIC
- una trombosi

4.7. Antitrombina (AT)

La Antitrombina è l'anticoagulante naturale per eccellenza. È una proteina di sintesi epatica, con peso molecolare tra 50.000 e 60.000 Dalton. Nella specie umana tale marker coagulativo rappresenta una proteina di fase acuta di tipo negativo (Fourrier F., 2006; Goda Choi et al., 2006), mentre nella specie felina rappresenta una proteina di fase acuta di tipo positivo. Nella specie canina il ruolo tra le proteine di fase acuta non appare ancora definito ma si pensa emulare il comportamento della specie umana.

La quantità di antitrombina può essere misurata con un test funzionale o immunologico. Quello funzionale deve essere eseguito sul plasma e non sul siero, perché con la coagulazione si verifica un consumo variabile di antitrombina e questo può portare a bassi livelli sierici nonostante i livelli plasmatici siano normali.

Esso prevede l'incubazione del plasma con un enzima antitrombinico, di solito trombina o fattore Xa, e successivamente la misurazione dell'enzima residuo.

La quantità di antitrombina presente nel campione testato viene calcolata grazie ad una curva di riferimento basata su una concentrazione nota di antitrombina rispetto all'enzima residuo. In alcuni metodi vengono utilizzati dei substrati sintetici per misurare l'enzima residuo.

Sono stati sviluppati numerosi test immunologici. I più diffusi sono il metodo ad immunodiffusione radiale di Mancini, *elettroimmunoassay* di Laurell (McKay, 1981) ed un metodo nefelometrico (Fareed et al., 1982).

La determinazione dell'antitrombina ha tre funzioni:

- 1) funzione diagnostica: può diminuire in corso di:
 - insufficienza epatica
 - DIC
 - malassorbimento
 - proteinuria (sindrome nefrotica)
 - emorragie (effetto diluizionale)

- 2) funzione prognostica (in soggetti affetti da DIC livelli di antitrombina inferiore al 50-60% hanno prognosi severe).
- 3) funzione terapeutica (la somministrazione di eparina, esercita un'azione anticoagulante aumentando da 100 a 1000 volte l'attività dell'antitrombina). In questo senso appare rilevante conoscere l'attività dell'AT prima di somministrare l'eparina ad un paziente.

L'intervallo di riferimento dei metodi attualmente validati nella specie canina oscillano tra il 70-80% ed il 120-130%.

5. INTRODUZIONE ALLO STUDIO

5.1. Scopo del lavoro

La presenza di una relazione tra i marcatori dell'infiammazione e della coagulazione è un argomento ben dimostrato e studiato in medicina umana. In medicina veterinaria, invece, questa relazione non è stata ancora adeguatamente studiata nonostante la sua potenziale rilevanza.

Il processo infiammatorio e quello emostatico giocano infatti un ruolo centrale nella difesa dell'ospite. Basti pensare che le cellule del sistema immunitario contribuiscono ad avviare la fase coagulativa e che alcuni mediatori dell'infiammazione sono in grado di influire l'emostasi. Inoltre le proteasi coagulative hanno significativi effetti immunomodulatori.

Infezioni di diverso tipo sono caratterizzate da una risposta infiammatoria acuta e sono spesso accompagnate da profonde alterazioni dell'emostasi.

L'espressione di materiale procoagulante da parte delle cellule infiammatorie può attivare la cascata coagulativa. In questo contesto il Fattore Tissutale (TF) gioca un ruolo centrale. Negli stati infiammatori i monociti possono esprimerlo sulla loro superficie ed attivare il fattore VII, avviando il processo emostatico e di conseguenza generando trombina che, a sua volta, converte il fibrinogeno in fibrina ed induce l'aggregazione piastrinica, portando alla formazione del coagulo.

Le citochine pro-infiammatorie sono mediatori dell'attivazione della coagulazione. L'interleuchina (IL)-6, che esercita l'azione più importante, ed il tumour necrosis factor (TNF)- α spostano l'equilibrio emostatico verso uno stato procoagulante, promuovendo la produzione di fibrina in diversi stati infiammatori, sia a livello locale che sistemico.

I meccanismi che modulano il processo emostatico in condizioni normali comprendono degli anticoagulanti naturali, tra cui: l'antitrombina, la proteina C attivata (APC) e l'inibitore del fattore tissutale (TFPI). Essi interferiscono con l'attivazione della coagulazione a vari livelli. Nei pazienti con infezione, i livelli sistemici di antitrombina e proteina C attiva sono diminuiti a causa del consumo aumentato, della inibizione alla sintesi e della loro degradazione. Inoltre la trombomodulina, importante mediatore dell'attivazione della proteina C attiva, subisce una down-regulation sulla superficie endoteliale, causata dalle citochine pro infiammatorie TNF- α e IL-1 β .

L'inibizione del sistema fibrinolitico facilita la deposizione di fibrina in presenza di citochine pro-infiammatorie. Lo stato procoagulante causato dal TNF- α è accompagnato dall'inibizione della fibrinolisi. Nell'infiammazione la fibrinolisi viene aumentata immediatamente dagli attivatori del plasminogeno, rilasciati dall'endotelio. Successivamente l'attivazione del plasminogeno viene ostacolata dall'aumento dell'inibitore dell'attivatore del plasminogeno (PAI-1). Sia il TNF- α che l'IL-1 β esercitano un effetto anti-fibrinolitico stimolando il rilascio del PAI-1 e riducendo quello dell'attivatore del plasminogeno.

Alla luce di tali interazioni, i livelli elevati di citochine pro-infiammatorie causano un'imponente attivazione sistemica della coagulazione, inibendo contemporaneamente la fibrinolisi e gli anticoagulanti naturali.

Anche l'attivazione dell'emostasi promuove l'accelerazione della risposta infiammatoria, attraverso l'azione di alcune proteasi coagulative che esercitano effetti pro-infiammatori sulle cellule. Grazie alle interazioni tra esse, si crea un'amplificazione del processo infiammatorio ed emostatico. Pertanto, infiammazione e coagulazione sono reciprocamente interconnesse creando condizioni altamente pro-infiammatorie e pro-coagulanti in diverse condizioni patologiche.

Oggetto della presente trattazione sarà di stabilire se anche nella specie canina è possibile evidenziare l'interconnessione tra il processo flogistico ed il processo emostatico.

5.2. Panoramica della letteratura esistente

In medicina umana sappiamo che il processo flogistico crea una condizione di ipercoagulabilità per limitare il danno infettivo/infiammatorio attraverso il confinamento dell'evento stesso.

Per verificare il legame che lega il processo infiammatorio e quello coagulativo sono state effettuate numerose ricerche.

Sono degni di menzione le famose ricerche di "Marcel Levi MD et al., 2004" che hanno evidenziato come il processo infiammatorio porti all'attivazione di quello emostatico e di come quest'ultimo influenzi l'attività del primo.

Infatti l'infiammazione sistemica è un potente stimolo pro-trombotico. E conduce ad una up-regulation dei fattori pro-coagulanti e ad una down-regulation degli anticoagulanti naturali inibendo l'attività fibrinolitica. Oltre a modulare i meccanismi di coagulazione plasmatica, i mediatori dell'infiammazione aumentano la reattività piastrinica (C.T. Esmon, 2003).

L'aumento dell'espressione del fattore tissutale (TF) causata dall'infiammazione, tende a spostare l'equilibrio emostatico in favore di coagulazione/trombosi. Endotossine, tumor necrosis factor α (TNF- α) e interleuchina-1 α (IL-1 α) inducono l'espressione del TF da parte dei monociti/macrofagi (Walsh PN, 1987; Edington TS et al., 1991). Il TF lega il fattore VIIa; questo complesso catalizza l'attivazione del fattore X in Xa che forma il complesso protrombinico insieme al fattore Va, alla protrombina (fattore II) ed al calcio; in questo modo genera la trombina (fattore IIa). La funzione chiave di quest'ultima è convertire il fibrinogeno in fibrina (Marcel Levi MD et al., 2004).

La trombina è in grado di incentivare l'adesione e l'attivazione leucocitaria, amplificando così la risposta infiammatoria. Una volta formatasi è in grado di attivare ulteriori piastrine (Marcel Levi MD et al., 2004) inducendo la produzione di livelli elevati del fattore di attivazione piastrinica (PAF) (Bar-Shavit R. et al., 1986), il quale agisce anche come un potente agonista neutrofilico (Lorant DE et al., 1991). Inoltre, conseguentemente

all'attivazione piastrinica da parte della trombina, si ha l'induzione della formazione del TF (Pendurthi UR et al., 1997; Miller DL et al., 1998) e l'aumento delle citochine infiammatorie, IL-6 e IL-8 (André P. et al., 2002; Henn V. et al., 1998). Diversi studi *in vitro* mostrano come le proteasi coagulative esercitino una up-regulation sull'espressione dei mediatori pro-infiammatori (Jones A., Geczy CL, 1990; Tom van der Poll T. et al., 2001). Gli anticoagulanti naturali: antitrombina, inibitore del fattore tissutale (TFPI) e proteina C attivata (APC), modulano l'interfaccia infiammazione-coagulazione e possiedono un'attività anti-infiammatoria distinta da quella anti-coagulante (C.T. Esmon, 2003). Ad esempio, oltre al ruolo centrale nella regolazione della coagulazione, la proteina C svolge anche un'importante funzione come modulatore dell'infiammazione (C.T. Esmon, 2002). Quando attivata è in grado di inibire la produzione di TNF- α , IL- β , IL-6 e IL-8 da parte delle colture di monociti/macrofagi (Okajima K., 2001).

In corso d'infiammazione tutti e tre i sistemi anticoagulanti possono essere compromessi. I livelli di antitrombina, il principale inibitore della trombina e del fattore Xa, si presentano significativamente diminuiti durante risposte infiammatorie intense, come risultato del suo consumo, della sintesi compromessa e della degradazione operata dalle elastasi neutrofiliche (Vary TC, Kimball SR, 1992; Seitz R. et al., 1989). Tale molecola può essere anche un importante mediatore dell'infiammazione. Legandosi direttamente ai neutrofili o ad altri leucociti, attenua l'espressione dei recettori per le citochine e le chemochine (Kaneider NC et al., 2003).

Durante un'infiammazione sistemica, oltre ai ridotti livelli di APC causati dalla sua sintesi compromessa (Vary TC, Kimball SR, 1992) e dalla degradazione esercitata dalle elastasi neutrofiliche, il sistema si presenta alterato come risultato della down-regulation della trombomodulina sulla superficie endoteliale, mediata dalle citochine pro-infiammatorie TNF- α e IL- β (Nawroth PP, Stern DM, 1986).

La somministrazione di dosi farmacologiche di TFPI in pazienti con infezioni e infiammazioni sistemiche, può prevenirne il decesso (Creasey AA et al., 1993).

L'infiammazione aumenta la sintesi di fibrinogeno (C.T. Esmon, 2003), anche se fibrinogeno e fibrina possono stimolare direttamente l'espressione di citochine pro-infiammatorie (TNF- α e IL-1 β) sulle cellule mononucleate ed indurre la produzione di chemochine (IL-8) da parte delle cellule endoteliali e dei fibroblasti (Szaba FM, Smiley ST, 2002) amplificando l'evento infiammatorio stesso.

I fattori fibrinolitici possono modulare la risposta infiammatoria attraverso il loro effetto sul reclutamento e sulla migrazione delle cellule infiammatorie.

Tutti gli studi svolti in merito, dimostrano chiaramente come infiammazione e coagulazione siano due processi che interagiscono l'uno con l'altro, influenzandosi a vicenda. Questa comunicazione avviene a livello di attivazione piastrinica, anticoagulanti fisiologici, formazione e risoluzione della fibrina (Marcel Levi MD et al., 2004).

Inoltre, diversi fattori coagulativi condividono somiglianze strutturali con i componenti del processo infiammatorio. Questo suggerisce anche l'esistenza di uno stretto legame evolutivo tra essi (C.T. Esmon, 2003).

Di questo affascinante e complesso rapporto che lega infiammazione e coagulazione esistono esigue tracce in medicina veterinaria. Una sola pubblicazione dal titolo "Relationship between assays of inflammation and coagulation: a novel interpretation of the canine activated clotting time" scritto da Teresa Cheng et al. (2009) tenta di delineare anche nella specie canina le complesse interrelazioni che legano i due sistemi.

La popolazione oggetto di studio era formata da 87 cani malati e da 15 soggetti privi di segni clinici, utilizzati come controlli. L'analisi dei loro campioni ematici, ha permesso di valutare l'associazione tra due marker d'infiammazione, la Conta dei neutrofili maturi e la Proteina C reattiva (CRP), e cinque parametri coagulativi, Tempo di Coagulazione Attivato (ACT), Tempo di Protrombina (PT), Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT), Antitrombina (AT) e Conta piastrinica (PLT). I pazienti sono stati suddivisi in quattro gruppi di studio in base ai valori di ACT rilevati.

Lo studio riporta una correlazione positiva dell'ACT e dell'aPTT con la CRP e la Conta neutrofilica, anche se tale correlazione si è dimostrata debole. Inoltre, le concentrazioni di CRP e di AT si sono rilevate inversamente correlate come a dire che forse la Antitrombina è una proteina di fase acuta negativa come nella specie umana. Questo studio suggerisce la necessità di modificare la tradizionale interpretazione del processo emostatico e di considerare la risposta emostatica come parte integrante del processo infiammatorio.

L'ampiezza campionaria ridotta dei casi (87 soggetti) e dei controlli (15 soggetti), l'asimmetria numerica dei due gruppi e la eterogeneità dei medesimi (razza, sesso ed età) nei confronti effettuati, costituiscono un limite allo studio stesso.

6. MATERIALI E METODI

6.1. Strumentazione

Per la esecuzione dei test coagulativi si è utilizzato un analizzatore random access multiparametrico della Roche. Tale strumento utilizza una metodica meccanica per la determinazione della formazione fibrinica.

Per la determinazione dei Dimeri D, della Antitrombina e della Proteina C reattiva si è utilizzato un analizzatore chimico-clinico random access automatizzato (Olympus AU 2700) distribuito dalla Beckman Coulter.

Per la determinazione della Conta piastrinica si è utilizzato una analizzatore ematologico di tipo ottico (laser) "Advia 2120" distribuito dalla Bayer.

6.2. Reagenti e metodiche

L'**aPTT** è stato determinato utilizzando un kit commerciale della Roche. La procedura consiste nel mettere 50 µl di plasma citratato e 50 µl di sospensione di caolino tamponato (5 mg/ml di caolino) e cefalina (sostituto piastrinico), preparata da tessuti cerebrali di coniglio secondo Bell e Alton (Bell WN, Alton HG, 1954), in una provetta preriscaldata a 37°C, lasciando il tutto in incubazione per 4 minuti. Successivamente si effettua l'aggiunta di 50 µl di cloruro di calcio (pre riscaldato a 37°C). Il tempo necessario per la formazione di un coagulo visibile, misurato con metodo cronometrico, viene espresso in secondi e costituisce il Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato.

Il **PT** è stato determinato utilizzando un kit commerciale della Roche. La procedura consiste nel mettere 100 µl di reagente (Tromboplastina di cervello di coniglio, liofilizzata) in una provetta preriscaldata a 37°C e successivamente aggiungere 50 µl di plasma citratato. Il tempo necessario per la formazione di un coagulo visibile, misurato con metodo cronometrico, viene espresso in secondi e costituisce il Tempo di Protrombina.

Il **Fibrinogeno** misurato in mg/dl (concentrazione) è stato determinato utilizzando un kit commerciale della Roche. La procedura consiste nel mettere 100 µl di plasma prediluito in rapporto 1:20 (100 µl di plasma + 1900 µl di tampone) in una provetta preriscaldata a 37°C, e sottoposta ad incubazione per 3 minuti a 37°C. Successivamente si aggiungono 50 µl di reagente del Fibrinogeno (Trombina umana >70 unità NIH/ml, liofilizzata) e viene misurato il tempo di coagulazione con metodo cronometrico. Per ogni determinazione, i risultati in secondi vengono convertiti automaticamente in mg/dl utilizzando una curva standard.

Gli **FDP's** plasmatici sono stati determinati utilizzando un kit commerciale della Roche, opportunamente validato nella specie canina (Caldin et al., 1998; Stokol T. et al., 1999), che utilizza anticorpi monoclonali per la determinazione dei frammenti della fibrina e del fibrinogeno. Il dosaggio degli FDP's plasmatici è stato eseguito a diluizioni di 1:2 e 1:8 ed i risultati sono stati riportati come negativi quelli <5 µg/ml e positivi quelli compresi tra 5-20 µg/ml e >20 µg/ml.

La determinazione dei **Dimeri D** plasmatici è stata eseguita utilizzando un kit commerciale della Roche, opportunamente validato nella specie canina (Caldin M. et al., 2000), che utilizza un anticorpo policlonale per la determinazione dei frammenti della fibrina.

La **Antitrombina** è stata determinata utilizzando un kit commerciale della Roche. Al campione di plasma citrato viene aggiunta eparina, un substrato cromogenico ed un eccesso di trombina. Tutta la AT presente viene legata, formando un complesso inattivo. La trombina in eccesso rilascia la p-nitroanilina dal substrato cromogeno. Poiché la quantità residua di trombina è inversamente proporzionale alla concentrazione di AT nel campione, l'aumento dell'estinzione ad una lunghezza d'onda di 405 nm permette di calcolare l'attività della AT.

6.3. Raccolta dei campioni

La raccolta dei differenti campioni (coagulativi, chimici ed ematologici) proviene dalla vena cefalica dei pazienti dopo appropriata rasatura e disinfezione dell'arto. I campioni coagulativi sono stati messi in una provetta "Vacurette" (sistema sottovuoto) della Greiner bio-one contenente citrato di sodio al 3.2%, 0.109 M, rispettando il rapporto sangue/anticoagulante indicato nella provetta (9/1). Dopo la raccolta del sangue le provette venivano delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto miscelamento tra anticoagulante e sangue. Al termine del miscelamento le provette venivano sottoposte a centrifugazione a 4400 g per 3 minuti e veniva separata la parte plasmatica. Tutti i campioni plasmatici sono stati analizzati entro 60 minuti dalla raccolta del campione ematico.

Il sangue destinato alla determinazione della Proteina C reattiva è stato posto in una provetta "Vacurette" (sistema sottovuoto) della Greiner bio-one contenente un attivatore della coagulazione (Z Serum Clot Activator). Le provette sono state delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto contatto tra la sostanza procoagulante depositata sulla parete della provetta ed il sangue. Dopo 2 minuti di stazionamento in verticale, le provette sono state sottoposte a centrifugazione (4400 g per 3 minuti), al termine della quale la parte sierica del campione veniva separata utilizzando delle pipette in plastica tipo "pasteur" e posta su contenitori barcodati idonei alla processazione nell'analizzatore automatico "Olimpus 2700". Tutti i campioni sono stati processati entro un'ora dalla raccolta del campione.

Il sangue destinato alla analisi ematologica (Conta piastrinica) è stato posto in una provetta sottovuoto (BD Vacutainer) contenente EDTA come anticoagulante. Le provette venivano delicatamente capovolte per 5-6 volte al fine di assicurare un corretto miscelamento tra sangue ed anticoagulante. Tutti i campioni ematologici sono stati processati entro un'ora dalla raccolta.

6.4. Database della Clinica Veterinaria Privata "San Marco"

Per la finalità dello studio in oggetto si è provveduto a consultare l'archivio informatico della Clinica Veterinaria Privata "San Marco" degli ultimi 6 anni di attività (giugno 2005-giugno 2011). Il numero di pazienti sottoposti a prima valutazione, di cui era possibile disporre di tutti i dati ematologici, coagulativi e biochimici indispensabili per il presente studio ammontava a 16.589 pazienti. Questi 16.589 pazienti sono stati divisi in quattro gruppi in base al livello di Proteina C reattiva. Il primo gruppo (gruppo 0) conteneva pazienti ammalati con Proteina C reattiva che rientrava nell'intervallo di riferimento (0.01-0.22 mg/dl). Il secondo gruppo (gruppo 1) conteneva pazienti ammalati con Proteina C reattiva compresa tra 1 e 10 volte (0.23-2.22 mg/dl) l'intervallo di riferimento. Il terzo gruppo (gruppo 2) conteneva pazienti ammalati con Proteina C reattiva compresa tra 11 e 30 volte (2.23-6.66 mg/dl) l'intervallo di riferimento. Il quarto gruppo (gruppo 3) conteneva pazienti ammalati con Proteina C reattiva compresa tra 31 e 120 volte (6.67-26.40 mg/dl) l'intervallo di riferimento. In questo modo si è realizzata la costruzione di 4 gruppi di cani ammalati con livelli di infiammazione crescente.

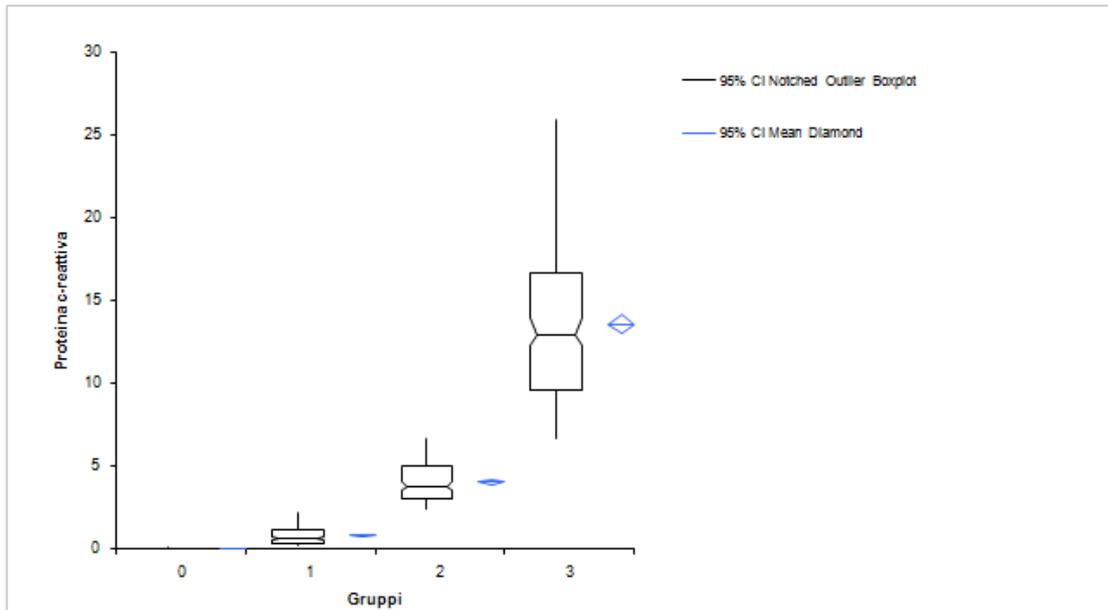
Gruppo 0 = cani ammalati con flogosi assente (CRP 0.01-0.22 mg/dl)

Gruppo 1 = cani ammalati con flogosi lieve (CRP 0.23-2.22 mg/dl)

Gruppo 2 = cani ammalati con flogosi moderata (CRP 2.23-6.66 mg/dl)

Gruppo 3 = cani ammalati con flogosi severa (CRP 6.67-26.40 mg/dl)

Tali gruppi di pazienti, pur omogenei per livelli di infiammazione, erano estremamente eterogenei per razza, sesso, età e condizione sessuale (castrati e non castrati). Un lavoro di selezione meticoloso ha consentito di realizzare un cross match per razza, sesso, età e condizione sessuale portando alla selezione di 1020 pazienti canini globali divisi in 4 gruppi di 255 pazienti ciascuno. In questo modo i 4 gruppi di pazienti condividevano la condizione di stato malattia, di razza, di sesso, età e di condizione sessuale, differendo esclusivamente per i diversi livelli di flogosi (differenti livelli di CRP). Per la quasi totalità dei pazienti si disponeva dei seguenti test: Proteina C reattiva, Tempo di Protrombina, Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato, Conta piastrinica, Fibrinogeno, Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno, Dimeri D e Antitrombina.



Proteina c-reattiva by Gruppi	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	255	0.028	0.025 to 0.032	0.0018	0.0283
1	255	0.812	0.744 to 0.880	0.0346	0.5533
2	255	4.040	3.887 to 4.193	0.0776	1.2390
3	255	13.568	12.966 to 14.171	0.3058	4.8831

Proteina c-reattiva by Gruppi	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	255	0.01	0.010	0.010	0.010 to 0.010	0.048	0.09	0.038
1	255	0.23	0.342	0.630	0.540 to 0.750	1.157	2.21	0.815
2	255	2.38	2.992	3.730	3.540 to 4.050	4.990	6.66	1.998
3	255	6.68	9.580	12.960	12.340 to 13.960	16.660	25.94	7.080

I 4 gruppi di 255 pazienti ciascuno, erano costituiti dalle seguenti razze (vedi allegato n.1):

- 151 Meticci
- 20 Labrador Retriever
- 15 Pastore Tedesco
- 10 Boxer
- 9 Yorkshire Terrier
- 5 Golden Retriever
- 5 Setter Inglese
- 4 Bovaro del Bernese
- 4 Dobermann

- 4 Bassotto Tedesco a Pelo Liscio
- 3 Alano
- 3 Cocker Spaniel Inglese
- 3 Rottweiler
- 2 Barbone toy
- 2 Carlino
- 2 Jack Russel Terrier
- 2 Maltese
- 2 Siberian Husky
- 2 West Highland White Terrier
- 2 Zwergpinscher
- 1 Beagle
- 1 Bracco Tedesco Drahthaar
- 1 Bulldog Inglese
- 1 Chihuahua
- 1 Shih - Tzu

Per quanto riguarda il sesso e la condizione sessuale dei pazienti, ciascuno dei 4 gruppi di 255 cani era costituito da:

- 122 femmine di cui 42 castrate, e
- 133 maschi di cui 15 castrati

(vedi allegato n.2)

L'età dei soggetti era estremamente eterogenea e fluttuava da pazienti di pochi giorni (30 giorni) a pazienti anziani (circa 18 anni).

(vedi allegato n.3)

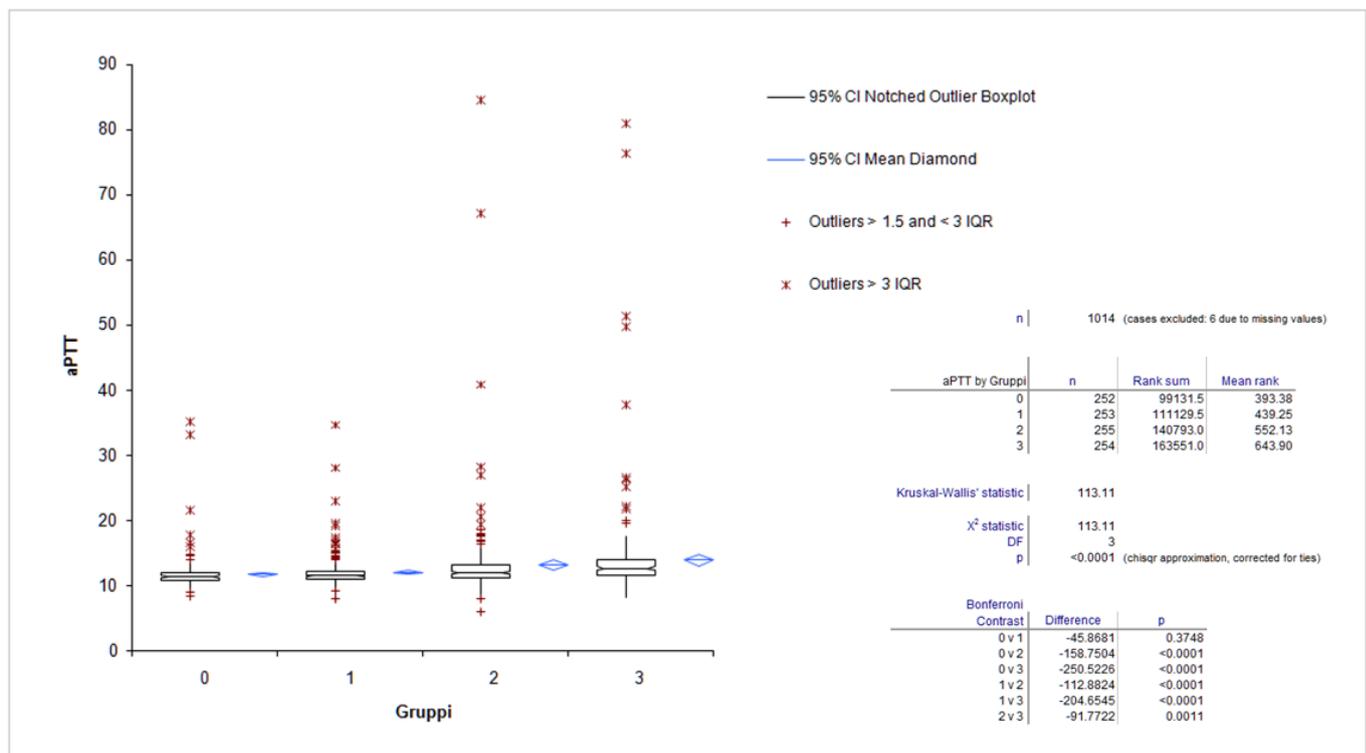
6.5. Metodi statistici

La normalità della distribuzione campionaria è stata valutata mediante il test di Kolmogorov-Smirnov. I dati distribuiti normalmente sono stati riportati come media \pm SD, mentre i dati a distribuzione non parametrica sono stati riportati come mediana e range. Per lo studio delle variabili a distribuzione parametrica di tipo continuo è stata utilizzata l'analisi di varianza ad una via, e successivamente il test di Tukey per la comparazione multipla. Per lo studio delle variabili a distribuzione non parametrica è stato eseguito il test di Kruskal-Wallis, mentre per la comparazione multipla il test di Bonferroni. Le variabili categoriche (FDP's) sono state studiate utilizzando il test del chi quadrato e come post-test il test di Bonferroni. Il grado di associazione tra le variabili oggetto di studio è stato stabilito utilizzando il coefficiente di correlazione di Spearman per i differenti ranghi. Le analisi statistiche sono state eseguite utilizzando il software statistico "Analysis-it" (Analyse-It Software Ltd) ed il livello di significatività è stato settato a $p < 0.05$.

7. RISULTATI

7.1. Risultati

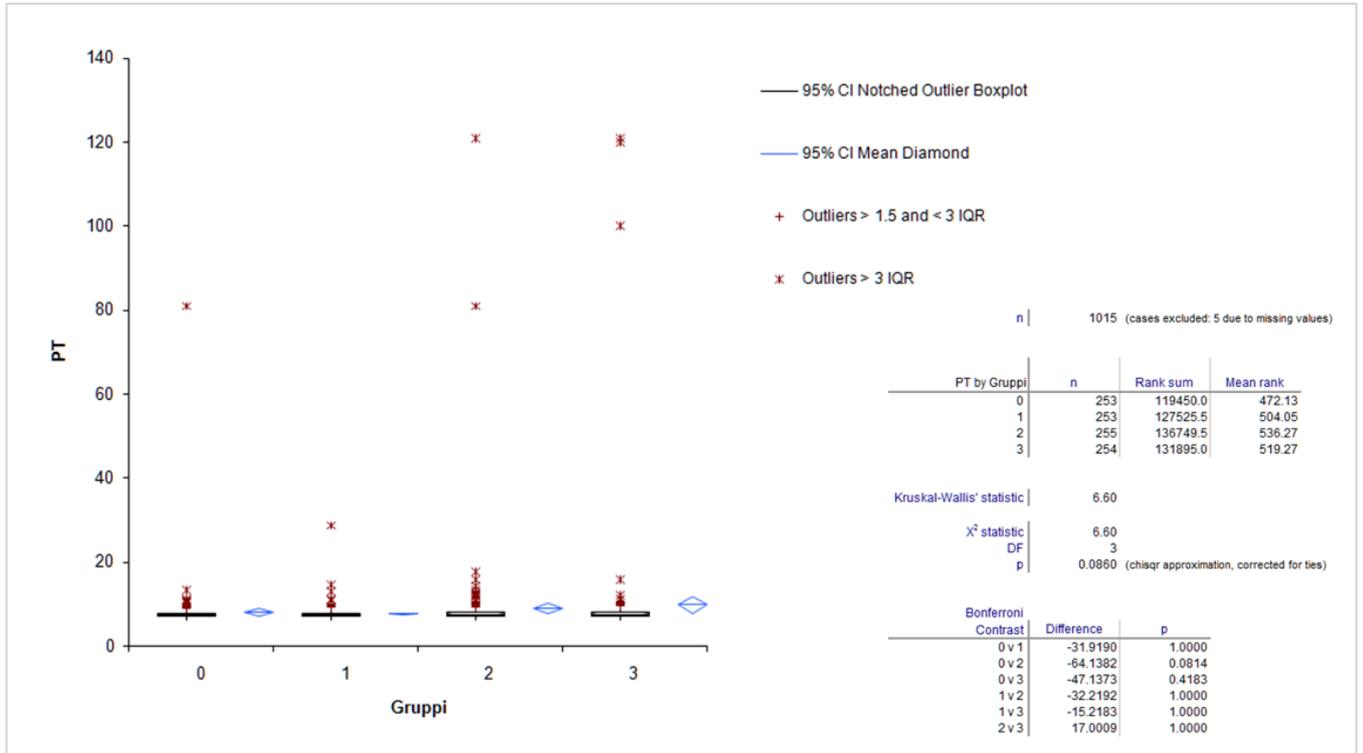
Il primo test valutato è stato l'aPTT. Come si può osservare l'aPTT presenta valori crescenti al crescere del livello di CRP. Il confronto tra i primi due gruppi (gruppo 0 contro gruppo 1) non ha dato esito statisticamente significativo anche se si apprezzava comunque l'effetto dell'evento (mediana che sale da 11.5 sec. a 11.6 sec.). Il confronto tra il gruppo 0 (11.5 sec. valore mediano) ed i gruppi 2 e 3 (12.1 sec. e 12.6 sec. valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo ($p=0.000$ e $p=0.000$). Il confronto tra il gruppo 1 (11.60 sec. mediana) ed i gruppi 2 e 3 (12.1 sec. e 12.6 sec. valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo ($p=0.000$ e $p=0.000$). Anche il confronto tra il gruppo 2 (12.1 sec. mediana) ed il gruppo 3 (12.6 sec. mediana) si è dimostrato statisticamente significativo ($p=0.000$).



aPTT by Gruppi	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	252	11.77	11.48 to 12.07	0.150	2.387
1	253	12.05	11.75 to 12.34	0.150	2.388
2	255	13.18	12.40 to 13.97	0.399	6.368
3	254	14.01	13.12 to 14.91	0.455	7.249

aPTT by Gruppi	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	252	8.4	10.90	11.50	11.30 to 11.60	12.10	35.2	1.20
1	253	8.1	11.10	11.60	11.50 to 11.70	12.23	34.7	1.13
2	255	6.1	11.30	12.10	11.90 to 12.30	13.30	84.6	2.00
3	254	8.3	11.69	12.60	12.40 to 13.00	14.10	81.0	2.41

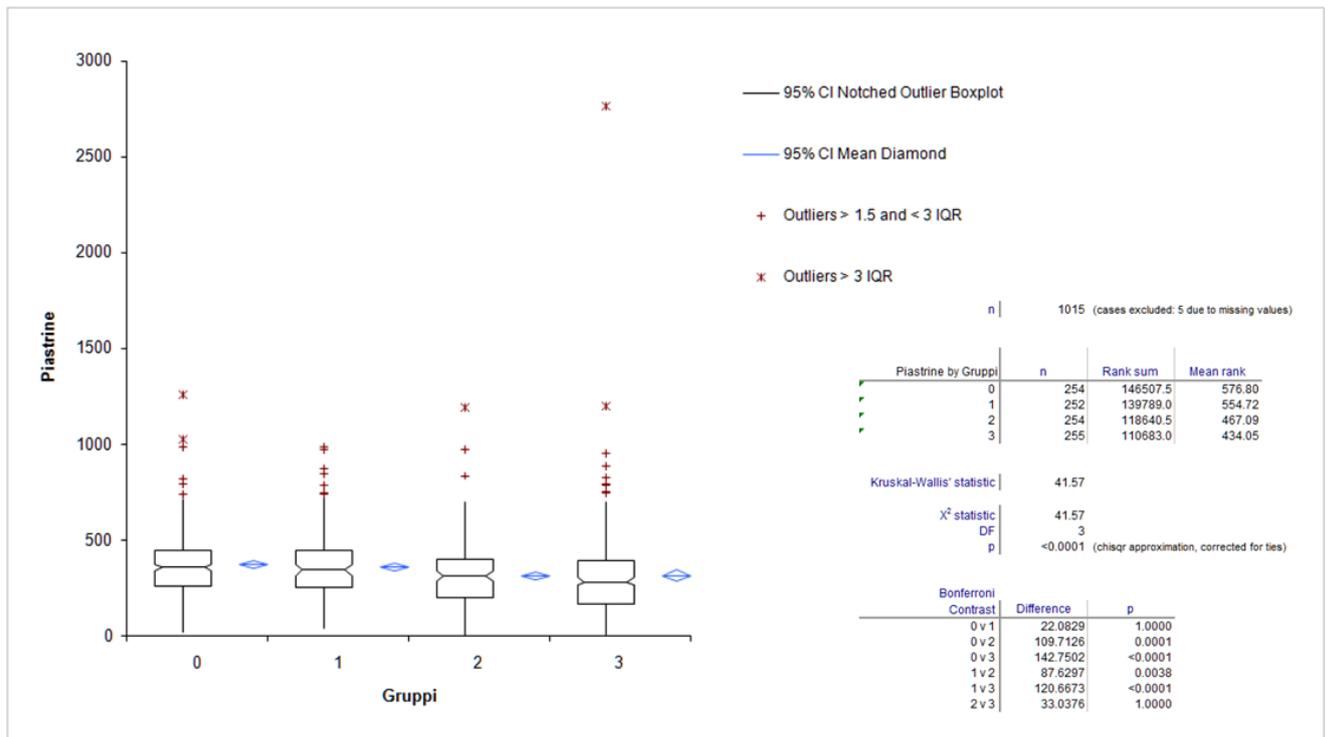
Il secondo test valutato è stato il **PT**. I confronti effettuati tra i diversi gruppi non hanno dato esiti statisticamente significativi.



PT by Gruppi	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	253	8.15	7.33 to 8.96	0.413	6.569
1	253	7.74	7.54 to 7.94	0.101	1.605
2	255	9.07	7.71 to 10.44	0.693	11.065
3	254	9.87	7.99 to 11.75	0.956	15.233

PT by Gruppi	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	253	6.3	7.10	7.50	7.40 to 7.60	7.90	81.0	0.80
1	253	6.2	7.10	7.50	7.40 to 7.60	7.90	28.8	0.80
2	255	6.2	7.20	7.60	7.50 to 7.70	8.10	121.0	0.90
3	254	6.2	7.10	7.50	7.40 to 7.70	8.10	121.0	1.00

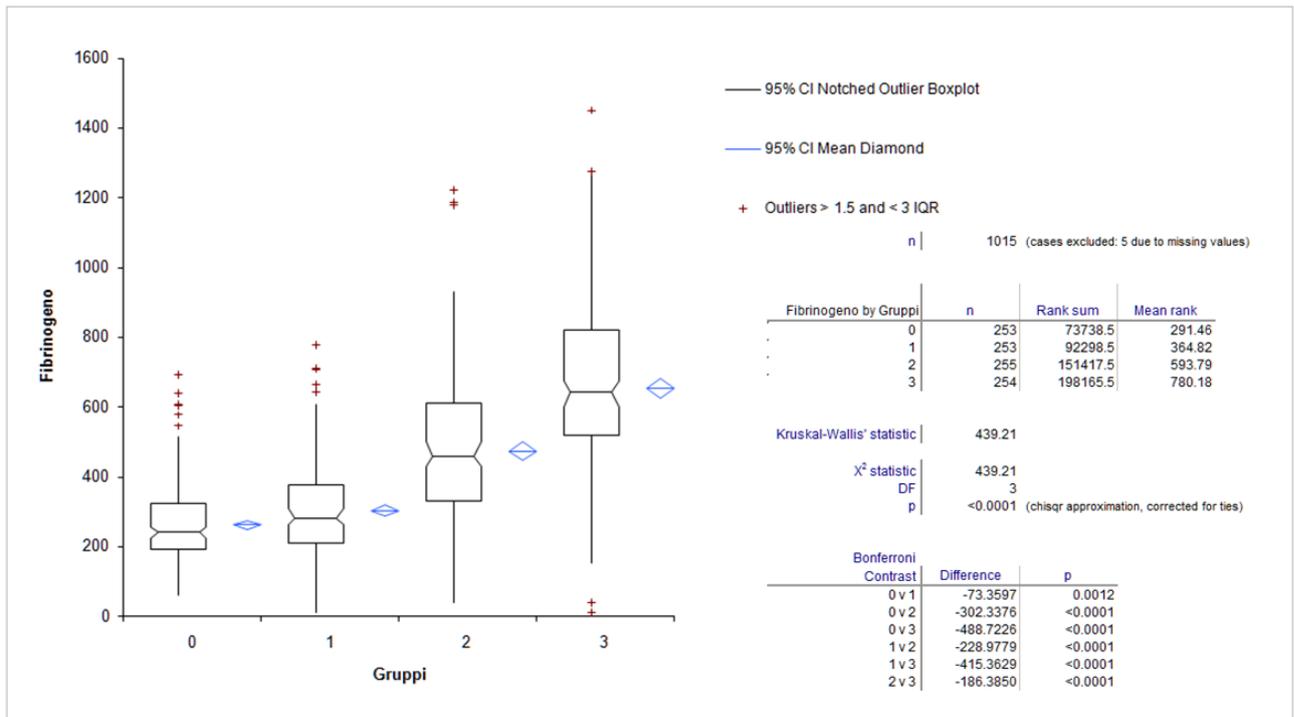
Il terzo test valutato è stato la **Conta piastrinica**. Come si può osservare la Conta piastrinica diminuisce all'aumentare del livello di CRP. Il confronto tra i primi due gruppi (gruppo 0 contro gruppo 1) non ha dato esito statisticamente significativo anche se si apprezzava comunque l'effetto dell'evento (mediana che cala da 358.500 piastrine/microlitro a 344.500 piastrine/microlitro). Il confronto tra il gruppo 0 (358.500 piastrine/microlitro valore mediano) ed i gruppi 2 e 3 (312.500 piastrine/microlitro e 283.000 piastrine/microlitro valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo ($p=0.000$ e $p=0.000$). Anche il confronto tra il gruppo 1 (344.500 piastrine/microlitro mediana) ed i gruppi 2 e 3 (312.500 piastrine/microlitro e 283.000 piastrine/microlitro mediana) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo ($p=0.000$ e $p=0.000$). Il confronto tra gli ultimi due gruppi (gruppo 2 contro gruppo 3) non ha dato esito statisticamente significativo anche se si apprezzava comunque l'effetto dell'evento (mediana che cala da 312.500 piastrine/microlitro a 283.000 piastrine/microlitro).



Piastrine by Gruppi	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	254	373.1	354.4 to 391.9	9.52	151.67
1	252	364.1	344.0 to 384.2	10.19	161.70
2	254	313.5	293.3 to 333.7	10.25	163.41
3	255	314.6	284.6 to 344.6	15.22	243.09

Piastrine by Gruppi	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	254	21	263.9	358.5	341.0 to 374.0	446.3	1259	182.4
1	252	42	253.0	344.5	312.0 to 373.0	445.6	987	192.6
2	254	4	200.8	312.5	285.0 to 338.0	404.0	1194	203.3
3	255	10	170.8	283.0	266.0 to 305.0	397.3	2766	226.5

Il quarto test valutato è stato il **Fibrinogeno**. Come si può osservare il Fibrinogeno presenta valori crescenti al crescere del livello di CRP. Tutti i confronti effettuati tra i diversi gruppi hanno dato esito statisticamente significativo ($p=0.000$), con mediane crescenti dal gruppo 0 ai gruppi 1, 2 e 3 (242 mg/dl, 281 mg/dl, 459 mg/dl e 644 mg/dl).



Fibrinogeno by Gruppi	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	253	262.36	249.61 to 275.12	6.478	103.033
1	253	303.56	287.64 to 319.49	8.085	128.604
2	255	474.45	447.79 to 501.11	13.537	216.161
3	254	654.52	625.99 to 683.06	14.492	230.958

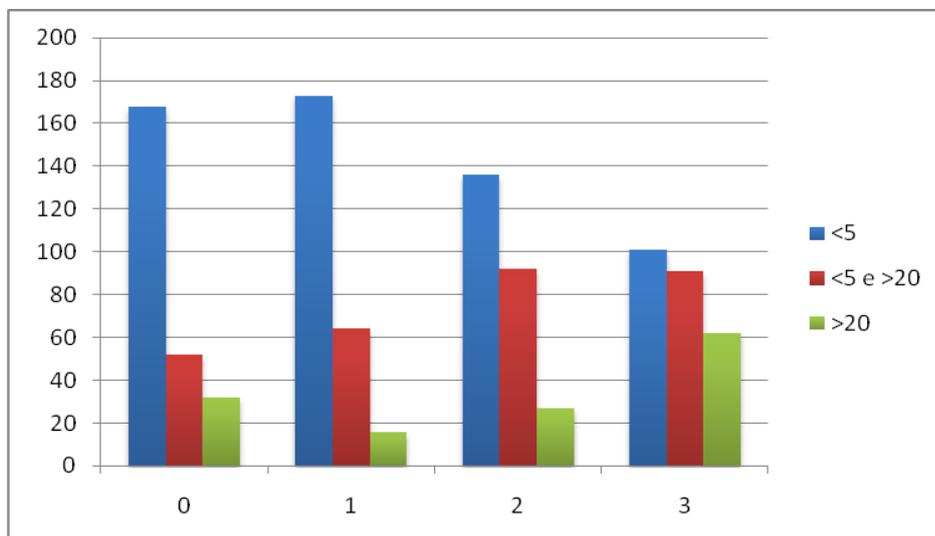
Fibrinogeno by Gruppi	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	253	60.0	191.00	242.00	226.00 to 255.00	323.33	692.0	132.33
1	253	12.7	209.67	281.00	265.00 to 308.00	376.67	778.0	167.00
2	255	41.0	331.00	459.00	431.00 to 503.00	610.67	1223.0	279.67
3	254	12.3	517.67	644.00	601.00 to 675.00	819.33	1451.0	301.67

Il quinto test valutato è stato quello degli **FDP's**. Per poterlo valutare statisticamente è stato categorizzato in variabili ordinali denominando come "gruppo 1" i pazienti con livelli di FDP's <5 µg/ml, come "gruppo 2" i pazienti con livelli di FDP's compresi tra 5 e 20 µg/ml e "gruppo 3" i pazienti con FDP's >20 µg/ml. In questo confronto la variabile CRP è stata utilizzata come variabile ordinale come precedentemente definito nella sezione "Materiali e metodi". Come si può osservare gli FDP's patologici (Gruppo 2 e 3) presentano valori parzialmente crescenti al crescere del livello di CRP. Il confronto fra variabili ordinali effettuato utilizzando il test "chi quadrato" ha dato esito statisticamente significativo (p=0.000). Il numero di pazienti con valori <5 µg/ml (non patologici appartenenti al Gruppo 1) diminuisce all'aumentare del grado di flogosi nei gruppi 2 e 3 rispetto ai gruppi 1 e 2: 168 nel gruppo 0, 173 nel gruppo 1, 136 nel gruppo 2 e 101 nel gruppo 3. Il numero di pazienti con valori compresi tra 5 e 20 µg/ml (patologici appartenenti al Gruppo 2) aumenta all'aumentare del grado di flogosi nei gruppi 0, 1, 2 e rimane pressoché invariato nel gruppo 3 rispetto al gruppo 2: 52 nel gruppo 0, 64 nel gruppo 1, 92 nel gruppo 2 e 91 nel gruppo 3. Il numero di pazienti con valori >20 µg/ml (patologici appartenenti al Gruppo 3) si presenta elevato nel gruppo 3 rispetto agli altri gruppi (0, 1 e 2): 32 nel gruppo 0, 16 nel gruppo 1, 27 nel gruppo 2 e 62 nel gruppo 3.

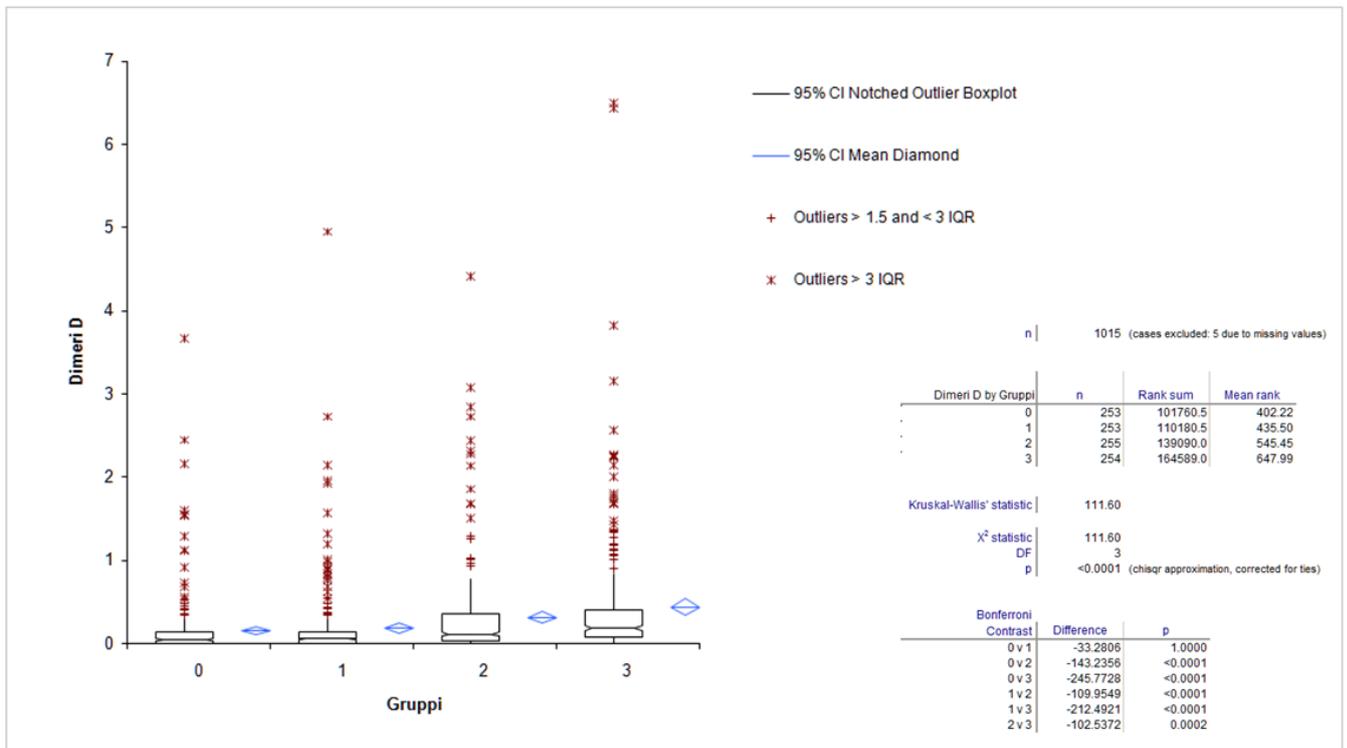
n | 1014 (cases excluded: 6 due to missing values)

FDP's	Gruppi				Total
	0	1	2	3	
<5	168 (143.6)	173 (144.2)	136 (145.4)	101 (144.8)	578
>5	52 (74.3)	64 (74.6)	92 (75.2)	91 (74.9)	299
>20	32 (34.0)	16 (34.2)	27 (34.5)	62 (34.3)	137
Total	252	253	255	254	1014

Pearson's X² statistic | 72.88
 DF | 6
 p | <0.0001



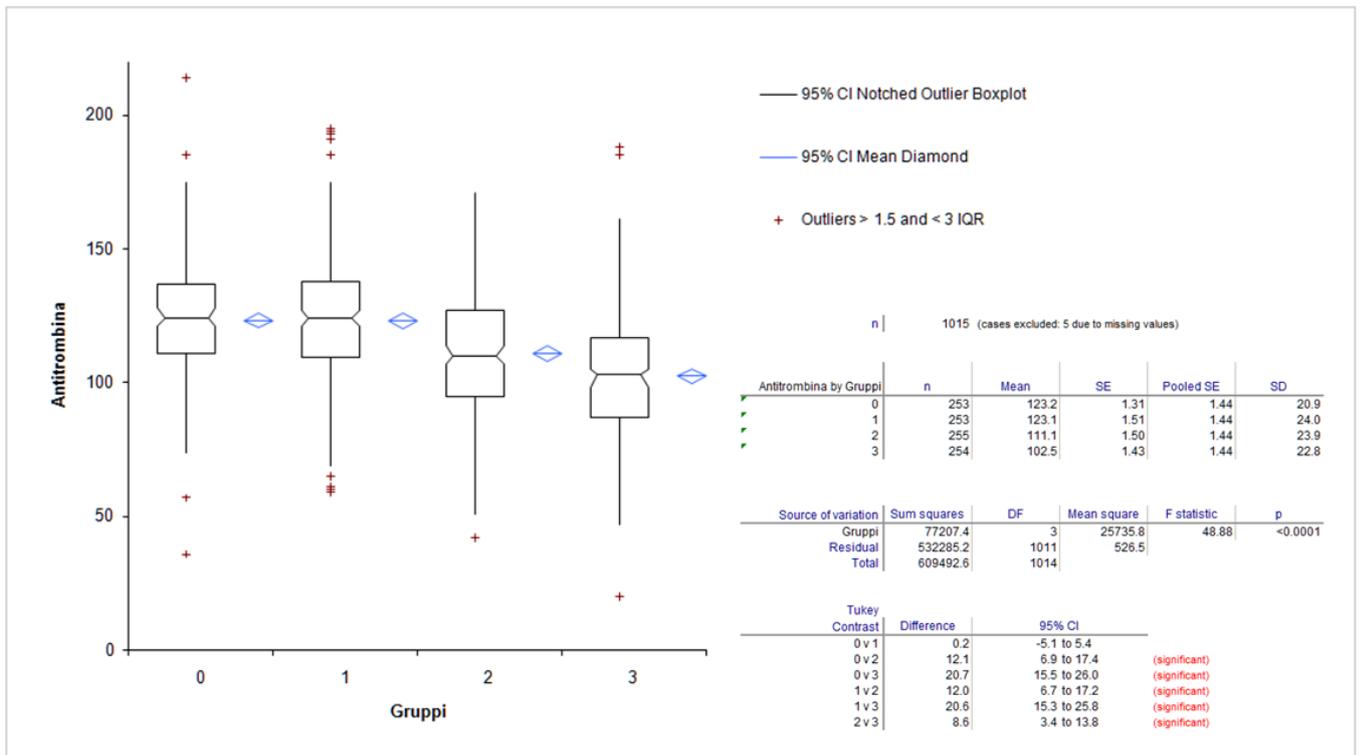
Il sesto test valutato è stato quello dei **Dimeri D**. Come si può osservare i Dimeri D presentano valori crescenti al crescere del livello di CRP. Il confronto tra i primi due gruppi (gruppo 0 contro gruppo 1) non ha dato esito statisticamente significativo anche se si apprezzava comunque l'effetto dell'incremento (mediana che sale da 0.05 µg/ml a 0.06 µg/ml). Il confronto tra il gruppo 0 (0.05 µg/ml valore mediano) ed i gruppi 2 e 3 (0.120 µg/ml e 0.185 µg/ml valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo (p=0.000 e p=0.000). Il confronto tra il gruppo 1 (0.06 µg/ml mediana) ed i gruppi 2 e 3 (0.120 µg/ml e 0.185 µg/ml valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo (p=0.000 e p=0.000). Anche il confronto tra il gruppo 2 (0.120 µg/ml mediana) e il gruppo 3 (0.185 µg/ml mediana) si è dimostrato statisticamente significativo (p=0.000).



Dimeri D by Gruppo	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	253	0.158	0.112 to 0.205	0.0238	0.3779
1	253	0.193	0.136 to 0.250	0.0290	0.4606
2	255	0.317	0.247 to 0.387	0.0355	0.5668
3	254	0.443	0.345 to 0.540	0.0496	0.7900

Dimeri D by Gruppo	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	253	0.01	0.010	0.050	0.040 to 0.060	0.140	3.67	0.130
1	253	0.01	0.010	0.060	0.050 to 0.070	0.143	4.95	0.133
2	255	0.01	0.030	0.120	0.090 to 0.140	0.368	4.41	0.338
3	254	0.01	0.080	0.185	0.160 to 0.220	0.410	6.49	0.330

Il settimo test valutato è stato quello della **Antitrombina**. Come si può osservare la Antitrombina presenta valori decrescenti al crescere del livello di CRP. Il confronto tra i primi due gruppi (gruppo 0 contro gruppo 1) non ha dato esito statisticamente significativo e i valori mediani coincidevano (124%). Il confronto tra il gruppo 0 (124% valore mediano) ed i gruppi 2 e 3 (110% e 103% valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo ($p=0.000$ e $p=0.000$). Il confronto tra il gruppo 1 (124% mediana) ed i gruppi 2 e 3 (110% e 103% valori mediani) ha dato in entrambi i casi esito statisticamente significativo. Anche il confronto tra il gruppo 2 (110% mediana) e il gruppo 3 (103% mediana) si è dimostrato statisticamente significativo ($p=0.000$).



Antitrombina by Gruppi	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	253	123.2	120.7 to 125.8	1.31	20.92
1	253	123.1	120.1 to 126.0	1.51	24.01
2	255	111.1	108.1 to 114.1	1.50	23.95
3	254	102.5	99.7 to 105.3	1.43	22.76

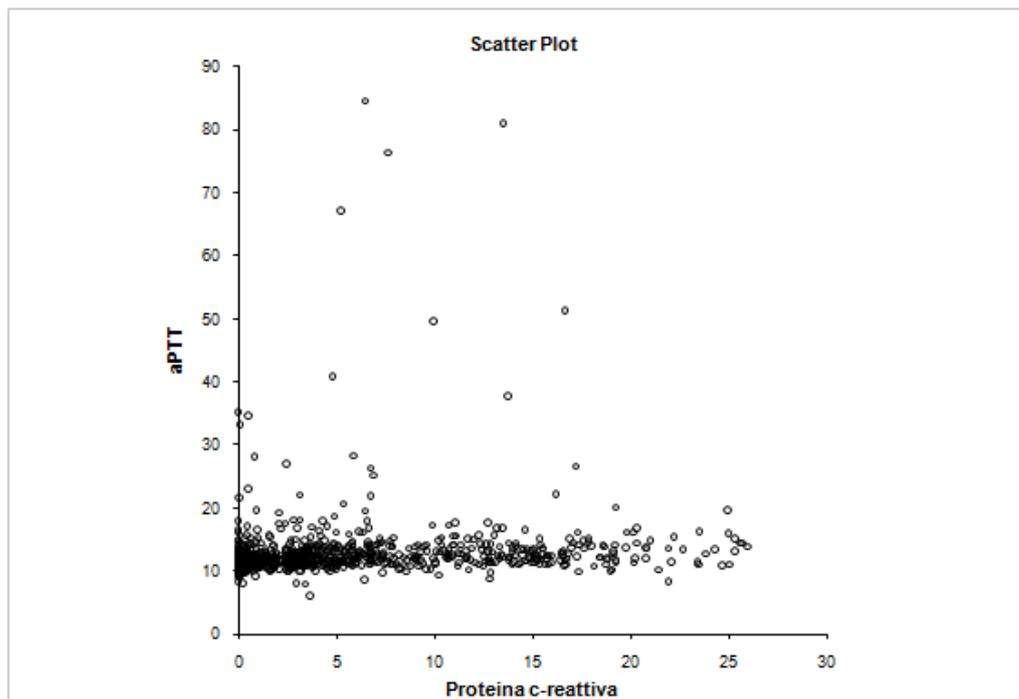
Antitrombina by Gruppi	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	253	36	111.0	124.0	121.0 to 128.0	137.0	214	26.0
1	253	59	109.7	124.0	121.0 to 127.0	138.0	195	28.3
2	255	42	95.0	110.0	107.0 to 114.0	127.0	171	32.0
3	254	20	87.0	103.0	98.0 to 105.0	117.0	188	30.0

7.2. Studio delle correlazioni

Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato (aPTT)

CRP e aPTT sono positivamente correlate anche se l'intensità della correlazione appare debole ($r=0.35$). La certezza di tale associazione appare invece molto robusta ($p=0.000$). Il coefficiente di determinazione (r^2) è pari al 12.25% indicando che molti altri fattori influenzano l'aPTT oltre alla CRP.

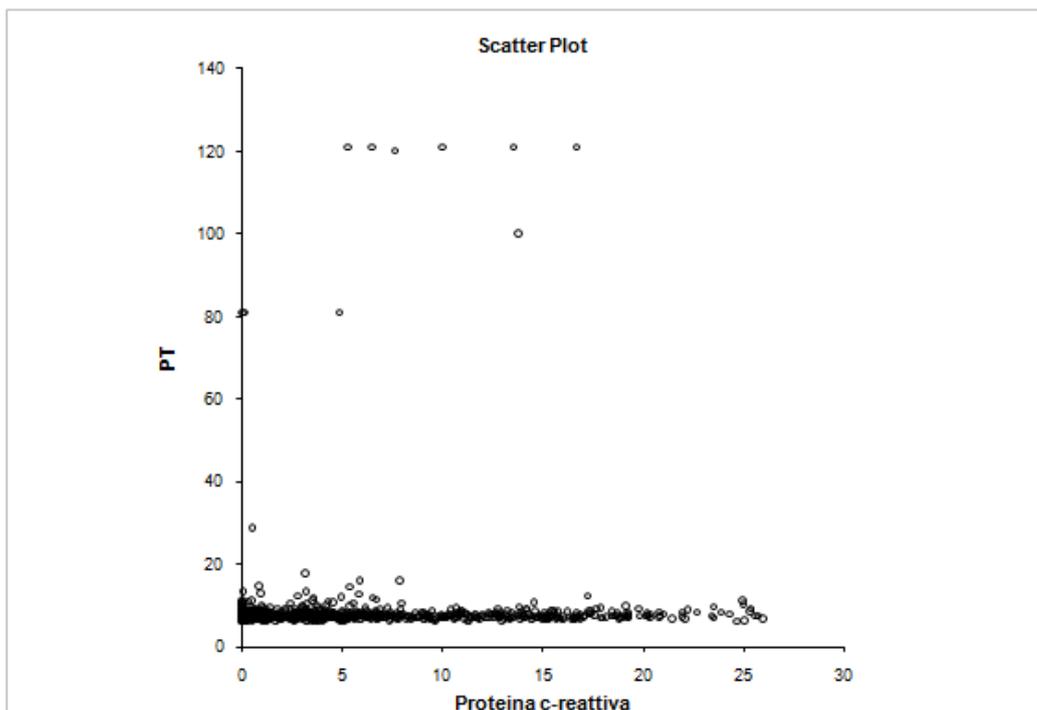
n		1011	(cases excluded: 9 due to missing values)
rs statistic		0.35	
95% CI		0.29 to 0.40	(normal approximation)
t statistic		11.80	
DF		1009	
2-tailed p		<0.0001	(t approximation, corrected for ties)



Tempo di Protrombina (PT)

Il Tempo di Protrombina ha evidenziato una correlazione positiva molto debole ($r=0.07$) con la CRP, ed il coefficiente di determinazione (r^2) pari a 0.49% indica che la CRP spiega una variabilità molto marginale del PT.

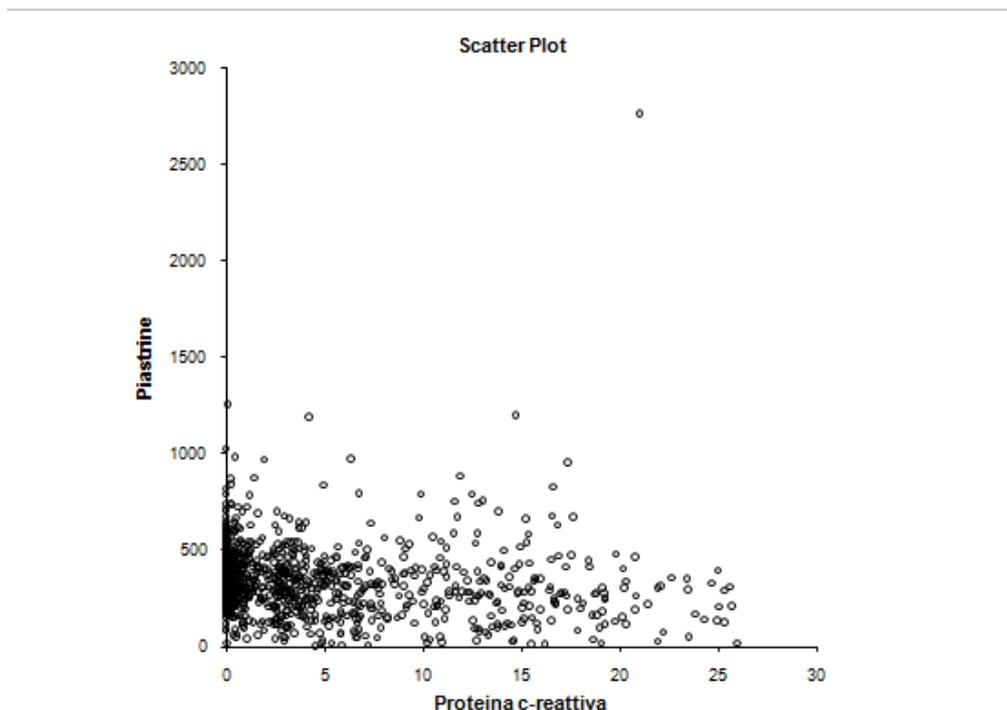
n	1012	(cases excluded: 8 due to missing values)
rs statistic	0.07	
95% CI	0.01 to 0.13	(normal approximation)
t statistic	2.19	
DF	1010	
2-tailed p	0.0287	(t approximation, corrected for ties)



Conta piastrinica (PLT)

La Conta piastrinica ha evidenziato una debole correlazione negativa ($r=-0.20$) con la CRP, anche se tale debole associazione appare statisticamente molto certa ($p=0.000$). Il coefficiente di determinazione (r^2) pari al 4% indica che la CRP spiega una minima parte della variabilità della conta piastrinica.

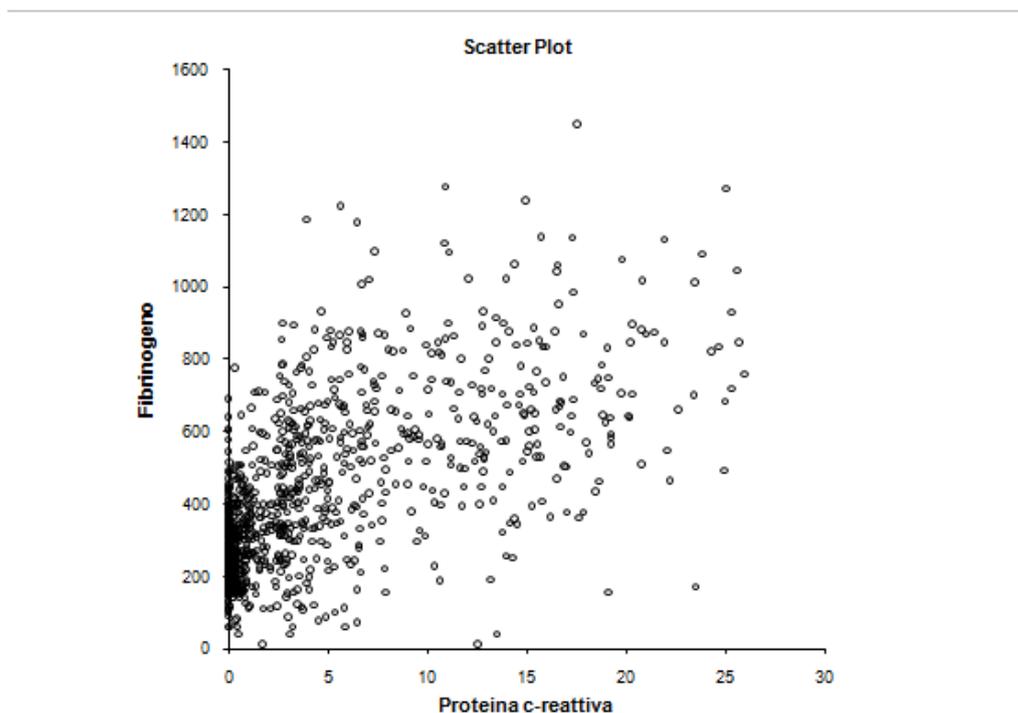
n	1012	(cases excluded: 8 due to missing values)
rs statistic	-0.20	
95% CI	-0.26 to -0.14	(normal approximation)
t statistic	-6.59	
DF	1010	
2-tailed p	<0.0001	(t approximation, corrected for ties)



Fibrinogeno (Fib)

Il fibrinogeno ha evidenziato una correlazione positiva moderata ($r=0.66$) con la CRP, statisticamente molto robusta ($p=0.000$). Il coefficiente di determinazione (r^2) pari al 43.6% indica che buona parte della variabilità del fibrinogeno dipende dalla CRP.

n	1012 (cases excluded: 8 due to missing values)
rs statistic	0.66
95% CI	0.62 to 0.69 (normal approximation)
t statistic	27.84
DF	1010
2-tailed p	<0.0001 (t approximation, corrected for ties)



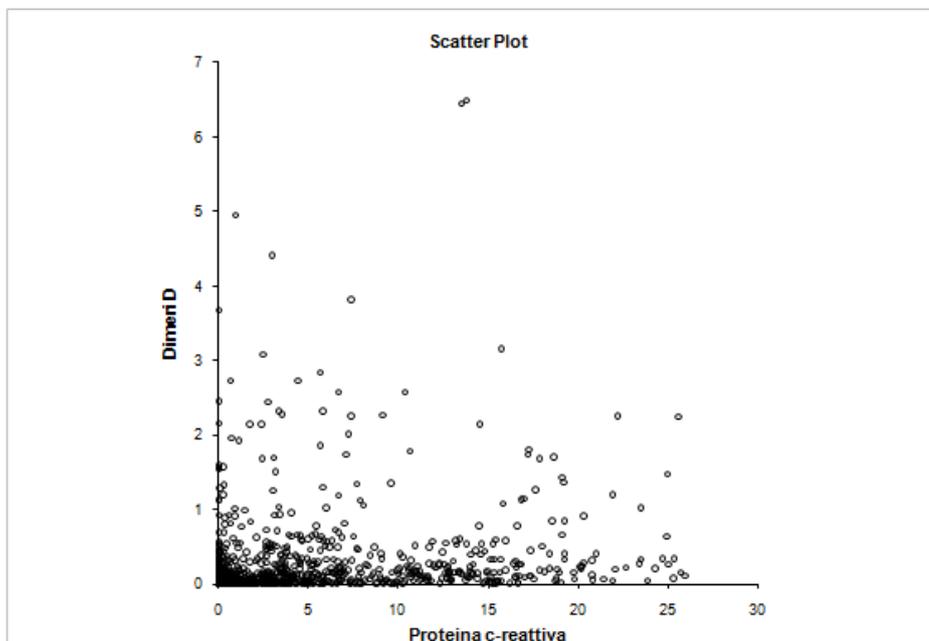
Prodotti di degradazione della Fibrina e del Fibrinogeno (FDP's)

Gli FDP's sono stati categorizzati come variabili ordinali, al pari dei gruppi di pazienti con differenti livelli di CRP. Si è proceduto a valutare il coefficiente di correlazione Gamma che ha determinato l'esistenza di una correlazione positiva statisticamente significativa ($p=0.000$) ma il cui effetto appare alquanto debole ($r=0.29$), a denotare che molti altri fattori intervengono a generare i differenti livelli di FDP's nei diversi gruppi di pazienti.

Dimeri D (DD)

I Dimeri D hanno evidenziato una debole correlazione positiva ($r=0.34$) con la CRP, anche se statisticamente molto robusta ($p=0.000$). Il coefficiente di determinazione (r^2) pari all'11.6% indica che la CRP spiega solo in parte la variabilità dei Dimeri D.

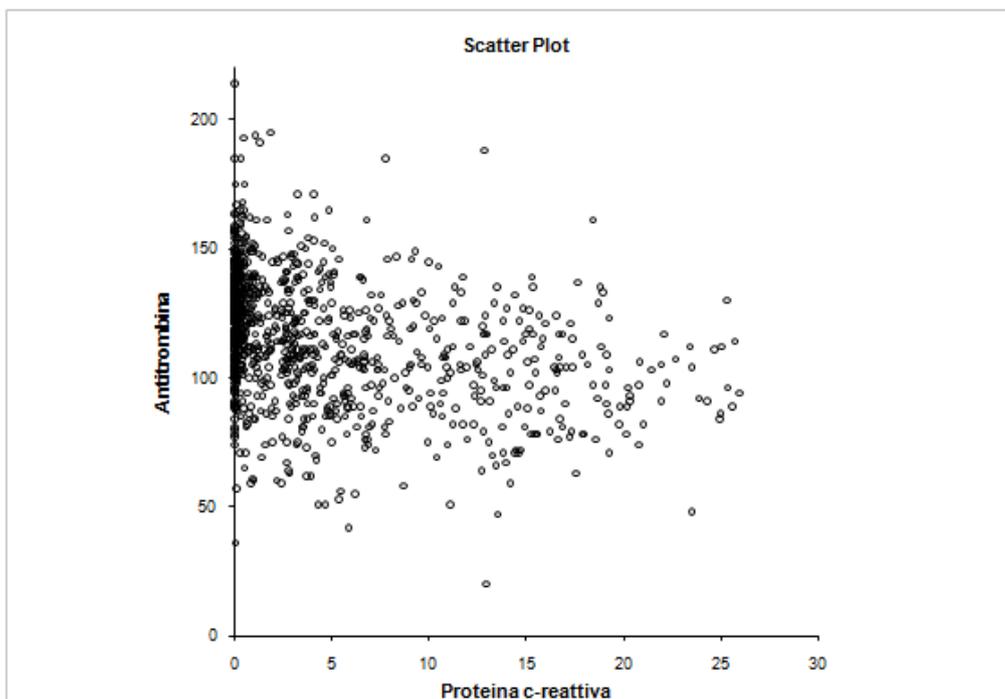
n	1012 (cases excluded: 8 due to missing values)
rs statistic	0.34
95% CI	0.28 to 0.39 (normal approximation)
t statistic	11.49
DF	1010
2-tailed p	<0.0001 (t approximation, corrected for ties)



Antitrombina (AT)

L'antitrombina ha evidenziato una debole correlazione negativa ($r=-0.38$) con la CRP, anche se statisticamente molto robusta ($p=0.000$). Il coefficiente di determinazione (r^2) pari al 14.4% indica che la CRP spiega solo in parte la variabilità dell'antitrombina.

n	1012 (cases excluded: 8 due to missing values)	
rs statistic	-0.38	
95% CI	-0.43 to -0.32	(normal approximation)
t statistic	-12.89	
DF	1010	
2-tailed p	<0.0001	(t approximation, corrected for ties)



8. DISCUSSIONE

La relazione tra il processo infiammatorio (Proteina C reattiva) e l'infiammazione (biomarker coagulativi) nella specie canina ha trovato ampia conferma nello studio in oggetto, a dimostrare ancora una volta che il cane rappresenta un candidato ideale come modello per la patologia umana.

Il Tempo di Tromboplastina Parziale Attivato ha presentato un incremento dei tempi di coagulazione in relazione all'incremento della Proteina C reattiva. Tale relazione potrebbe derivare da un incremento del consumo delle proteine coagulative che compongono la cascata intrinseca in funzione della attivazione emostatica (aumento dell'espressione del Fattore Tissutale) che il processo infiammatorio (IL-1, IL-6 e TNF α) è in grado di causare. Una possibile spiegazione alternativa a questa, potrebbe indicare le proteine della cascata intrinseca come proteine di fase acuta negativa, al pari della albumina e della transferrina. Il fatto che accanto all'aumento dell'aPTT si sia verificato anche un incremento dei Dimeri D e degli FDP's (iperfibrinolisi) sembra indicare come più probabile come ipotesi quella di una aumentata attivazione emostatica e di conseguenza di un consumo (DIC) dei fattori procoagulanti. Entrambe le ipotesi sono comunque plausibili dal punto di vista biologico.

La Antitrombina, al pari dell'aPTT, sembra indicare una riduzione della concentrazione dovuta ad una attivazione emostatica, con relativo consumo della proteina, la cui funzione principale di anticoagulante viene ad esaurirsi nell'espletamento della funzione stessa a cui è preposta. Anche in questo caso l'ipotesi alternativa di una ridotta sintesi della proteina in quanto proteina di fase acuta negativa, potrebbe svolgere un certo ruolo. Nel caso specifico, questa caratteristica di proteina di fase acuta negativa nella specie umana è già stata ampiamente documentata. Entrambe le ipotesi sembrano quindi avere la stessa dignità clinica.

Le piastrine, sono cellule con implicazioni molto importanti nel processo infiammatorio e coagulativo, che nella specie canina non hanno ancora trovato lo spazio e la collocazione idonea nella medicina dei piccoli animali. Le piastrine e la Proteina C reattiva sono inversamente correlate a denotare, come nel caso precedente, che al salire della flogosi inizia una attivazione emostatica che conduce ad un consumo delle piastrine stesse. Considerato che il processo infiammatorio nella specie umana, conduce ad una piastrinosi reattiva molto ben descritta, tale rilevazione potrebbe indicare la relativa facilità ad attivare il sistema emostatico nella specie canina rispetto alla specie umana.

L'incremento degli FDP's e dei Dimeri D sembrano indicare che l'attivazione emostatica sinora ipotizzata negli altri test trovi ora una conferma. Infatti questi test sono l'espressione che il processo emostatico ha prodotto come espressione finale un eccesso di fibrina, in grado di alterare il microcircolo e di generare quindi conseguenze importanti. L'organismo nel tentativo di contenere la deposizione di fibrina a livello microcircolatorio attiva dei sistemi anticoagulanti (plasmina) in grado di contenere questo fenomeno e i cui prodotti di rifiuto (FDP's e Dimeri D) rappresentano degli ottimi indicatori dei processi avvenuti.

Il Fibrinogeno ha dimostrato un incremento della sua concentrazione in relazione all'incremento della Proteina C reattiva. Tale comportamento conferma il suo ruolo di proteina di fase acuta positiva di tipo moderato. Il non aver rilevato decrementi di fibrinogeno derivanti dall'attivazione del processo emostatico, conferma la scarsa sensibilità del test nella coagulazione intravascolare disseminata (DIC) (Marcel Levi, Joost C. Meijers, 2010). In definitiva è probabile che nel processo infiammatorio, nonostante il fibrinogeno venga consumato (DIC), l'incremento della sintesi prodotta dalla flogosi occulti tale fenomeno. È possibile che in futuro si arrivi a calcolare una ratio Fibrinogeno-CRP come indicatore predittivo del processo di consumo (DIC), che meglio evidenzia un eventuale consumo del fibrinogeno, anche in corso di processi infiammatori.

Il Tempo di Protrombina non ha generato risultati statisticamente significativi nel confronto tra i diversi gruppi di pazienti, ma si presentava statisticamente correlato alla Proteina C reattiva in modo positivo. Il motivo per il quale il Tempo di Protrombina nel confronto tra gruppi non ha generato risultati statisticamente significativi deve essere ascritto alla metodologia utilizzata per la determinazione del test stesso. Infatti tale test viene di solito determinato utilizzando reagenti del commercio dedicati alla specie umana. La specie canina contiene una concentrazione di proteine della via estrinseca molto più elevata rispetto alla specie umana (ad esempio Fattore VII 300%, Fattore V 900%). Questa enorme differenza tra cane e uomo, relativamente alla concentrazione delle proteine della via estrinseca, è responsabile dei tempi molto accorciati rispetto all'uomo (6.5-8.5 secondi nel cane e 12-15 secondi nell'uomo) e della bassissima sensibilità del test nella nostra specie di interesse (Mischke R., Nolte I., 1997).

In definitiva, lo studio svolto ha evidenziato lo stretto legame tra il processo infiammatorio ed il processo coagulativo così come già noto nell'uomo.

9. CONCLUSIONI

Il lavoro retrospettivo caso-controllo svolto utilizzando il data base della Clinica Veterinaria Privata San Marco ha consentito di osservare l'esistenza di una associazione importante tra le variazioni infiammatorie e quelle coagulative. Tale fenomeno, in termini di plausibilità biologica potrebbe essere ascritto sia alla maggior probabilità di innesco di una coagulazione intravascolare disseminata all'aumentare dei livelli di flogosi (CRP), cosa peraltro ben documentata nella patologia della specie umana, sia alla riduzione nella sintesi delle proteine procoagulanti (aPTT, Fibrinogeno) che anticoagulanti (AT). Il peso di questi differenti fenomeni esplicativi del processo esaminato potrebbe essere chiarito ricorrendo ad una prova sperimentale in vitro, ove cellule epatiche in coltura possono essere esposte a livelli crescenti di interleuchine infiammatorie, verificando le conseguenti variazioni della sintesi epatica dei marcatori in precedenza studiati. In questo modello infatti, i processi di consumo relativi alla coagulazione intravascolare disseminata possono essere evitati, riducendo la complessità del modello studiato. In alternativa, la determinazione dei complessi Trombina-Antitrombina nel plasma, al variare della CRP, potrebbe aiutare a comprendere se al salire della CRP si assiste ad un aumento dei processi coagulativi generati dall'aumento dei processi infiammatori, evidenziando lo stretto legame che unisce questi essenziali quanto importanti processi biologici.

Tutto questo evidenzia nel suo complesso, da una parte la stretta interdipendenza tra i processi infiammatori e coagulativi, implicati entrambi nell'isolamento della noxa patogena, e dall'altra introduce ad una profonda riflessione circa l'interpretazione dei test coagulativi. Poiché gli eventi infiammatori influenzano fortemente i livelli plasmatici dei test coagulativi, la determinazione dei livelli di CRP potrebbe rivelarsi cruciale per una corretta interpretazione dei test emostatici.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Adam S.S., Key N.S., Greenberg C.S. (2009), "D-dimer antigen: current concepts and future prospects", *Blood: Journal of the American Society of Hematology*, 113, 2878-2887
2. Boisvert A.M., Swenson C.L., Haines C.J. (2001), "Serum and plasma latex agglutination tests for detection of fibrin(ogen) degradation products in clinically ill dogs", *Veterinary Clinical Pathology*, 30(3), 133-136
3. Bovill E.G., Tracy R.P., "Methods for the determination of the plasma concentration of fibrinogen", *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw Hill, L87-L88
4. Bovill E.G., Tracy R.P., "Fibrin(ogen) degradation products", *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw Hill, L104-L105
5. Caldin M., Furlanello T. et al. (1998), "Sensitivity and specificity of citrated plasma FDP's and D-dimer in the diagnosis of the disseminated intravascular coagulation (DIC) in dogs", *Journal of Veterinary Internal Medicine*
6. Caldin M., Furlanello T., Lubas G. (2000), "Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canin citrated plasma", *Veterinary Clinical Pathology*, 29(2), 51-54
7. Cerón J.J., Eckersall P.D., Martinez-Subiela S. (2005), "Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives", *Veterinary Clinical Pathology*, 34(2), 85-99
8. Cheng T., Mathews K.A., Abrams-Ogg A.C.G., Wood R.D. (2008), "Relationship between assays of inflammation and coagulation: a novel interpretation of the canine activated clotting time", *The Canadian Journal of Veterinary Research*, 73, 97-102
9. Choi G., Schultz M.J., Levi M., van der Poll T. (2006), "The relationship between inflammation and the coagulation system", *Swiss Med WKLY*, 136, 139-144
10. Dellinger R.P. (2003), "Inflammation and coagulation: implication for the septic patient", *Clinical Infectious Diseases*, 36, 1259-1265
11. Esmon C. T., Fukudome K., Mather T., Bode W., Regan L.M., Stearns-Kurosawa D.J., Kurosawa S. (1999), "Inflammation, sepsis, and coagulation", *Haematologica*, 84, 254-259
12. Esmon C.T. (2003), "Inflammation and thrombosis", *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 1, 1343-1348

13. Flatland B., Fry M.M., LeBlanc C.J., Rohrbach B.W. (2011), "Leucocyte and platelet changes following low-doses lipopolysaccharide administration in five dogs", *Research in veterinary science*, 90(1), 89-94
14. Fourrier F. (2006), "Hemostasis disorders in severe infections: state of the art", *Med Mal Infect*, 36(6), 304-313
15. Furlanello T., Caldin M., Stocco A., Tudone E., Tranquillo V., Lubas G., Solano-Gallego L. (2006), "Stability of stored canine plasma for hemostasis testing", *Veterinary Clinical Pathology*, 35(2), 204-207
16. Hultin M.B., "Antithrombin III assay", *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw-Hill, L101-L102
17. Klinger M.H.F., Jelkmann W. (2002), "Role of blood platelets in infection and inflammation", *Journal of interferon & cytokine research*, 22, 913-922
18. de Laforcade A.M., Freeman L.M., Shaw S.P., Brooks M.B., Rozanski E.A., Rush J.E. (2003), "Hemostatic changes in dogs with naturally occurring sepsis", *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17, 672-679
19. Levi M., van der Poll T., Büller H.R. (2004), "Bidirectional relation between inflammation and coagulation", *Circulation*, 109, 2698-2704
20. Levi M., Meijers J.C. (2011), "DIC: Which laboratory tests are most useful", *Blood Reviews*, 25, 33-37
21. Lominadze D., Dean W.L., Tyagi S.C., Roberts A.M. (2010), "Mechanisms of fibrinogen-induced microvascular dysfunction during cardiovascular disease", *Acta Physiol (Oxf)*, 198(1), 1-13
22. Marchetti V., Lubas G., Lombardo A., Corazza M., Guidi G., Cardini G. (2010), "Evaluation of erythrocytes, platelets, and serum iron profile in dogs with chronic enteropathy", *Veterinary Medicine International*, 1-5
23. Miletich J.P., "Prothrombin time", *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw-Hill, L82-L84
24. Miletich J.P., "Activated partial thromboplastin time", *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw-Hill, L85-L86
25. Mischke R., Nolte I. (1997), "Optimization of prothrombin time measurements in canine plasma", *American Journal of Veterinary Research*, 58(3), 236-241
26. Mischke R. (2000), "Activated partial thromboplastin time as a screening test of minor or moderate coagulation factor deficiencies for canine plasma: sensitivity of

- different commercial reagents”, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 12, 433-437
27. Mischke R. (2002), “Effect of reagent batch on activated partial thromboplastin time in canine plasma and use of the ratio system for standardization”, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 115(5-6), 225-229
 28. Opal S. M., Esmon C.T. (2003), “Bench-to-bedside review: Functional relationships between coagulation and the innate immune response and their respective roles in the pathogenesis of sepsis”, *Critical Care*, 7(1), 23-38
 29. Paltrinieri S. (2008), “The feline acute phase reaction”, *Vet Journal*, 177(1), 26-35
 30. Parra MD, Tuomola M., Cabezas-Herrera J., Céron JJ (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), 113-126
 31. Piccione G., Casella S., Giannetto C., Giudice E. (2010), “Effect of storage conditions on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and fibrinogen concentration on canine plasma samples”, *Journal of Veterinary Science*, 11(2), 121-124
 32. Riewald M., Ruf W. (2003), “Science review: Role of coagulation protease cascade in sepsis”, *Critical Care*, 7(2), 123-129
 33. Robbin e Cotran, “Infiammazione acuta e cronica”, *Le basi patologiche delle malattie*, settima edizione, Elsevier, 47-86
 34. Robbins e Cotran, “Alterazioni emodinamiche, malattia trombo embolica, shock”, *Le basi patologiche delle malattie*, settima edizione, Elsevier, 124-130
 35. Sheafor S.E., Couto C.G. (1999), “Anticoagulant rodenticide toxicity in 21 dogs”, *Journal of the American Animal Hospital Association*, 35(1), 38-46
 36. Stokol T., Brooks M.B., Erb H.N., Mauldin G.E. (2000), “D-dimer concentrations in healthy dogs and dogs with disseminated intravascular coagulation”, *American Journal of Veterinary Research*, 61(4), 393-398
 37. Ware J.A., Collier B.S., “Platelets morphology, biochemistry, and function”, *Williams Hematology*, fifth edition, McGraw Hill, 1161-1201
 38. Zoia A., Augusto M., Drigo M. and Caldin M., “Hypofibrinogenemia with discordant results between elevated FDP’s and normal D-dimer in dogs with ascites due to right-sided congestive heart failure”, *JAVMA*, 2011 in-press

11. RINGRAZIAMENTI

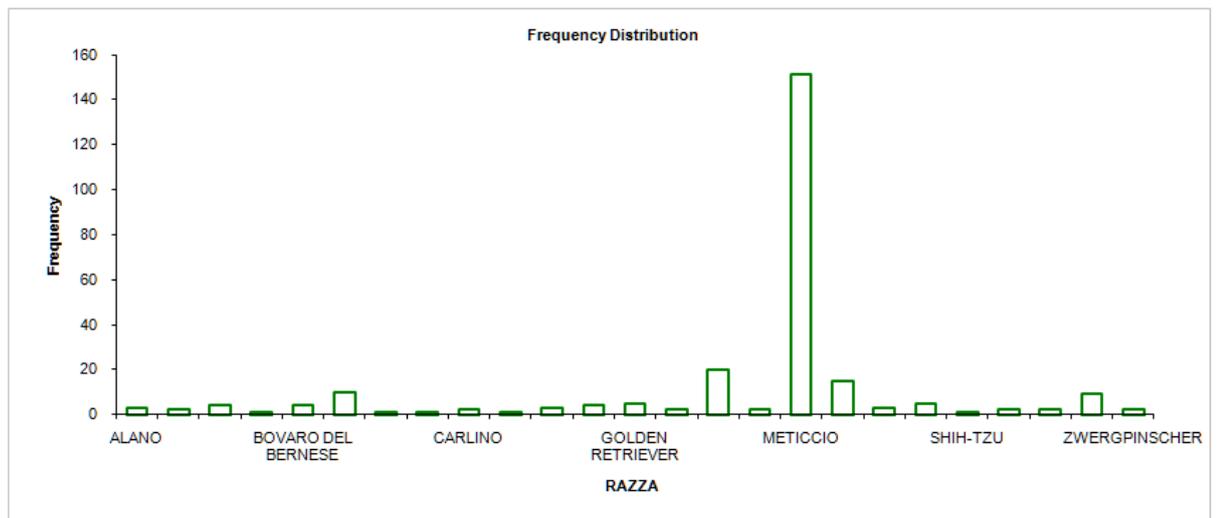
Desidero ringraziare:

- il Professor Daniele Bernardini, che ci ha permesso di svolgere questo studio;
- il Dottor Marco Caldin, per avermi guidata ed aiutata nella realizzazione del lavoro, dedicandomi il suo tempo;
- la Clinica Veterinaria Privata “San Marco”, che ha messo a disposizione il suo database e che mi ha dato la possibilità di affacciarmi alla realtà post-universitaria;
- la Dottoressa Silvia Bianchini, per il suo contributo durante la stesura della tesi;
- il Dottor Michele Drigo, per averci aiutato nella parte statistica;
- la Dottoressa Mara Senzolo, per la simpatia e la disponibilità durante il tirocinio;
- i miei genitori, per avermi sempre sostenuta, moralmente ed economicamente, permettendomi di realizzare il mio sogno;
- Giovanni, Luisa e Giada, sempre presenti nel momento del bisogno;
- Fabio, per essere al mio fianco;
- zia Isetta e la Dottoressa Rita, per il loro costante sostegno a distanza;
- Vanessa, per esserci sempre e per il supporto ed i consigli;
- Michela ed Elisa, per essermi state vicine ed aver reso unici questi cinque anni di università;
- Ilenia, Laura, Roberta, Filippo, Marco B., Marco Z. e Nicolò, per l’allegria che mi trasmettono;
- la Dottoressa Monica Mandi, che mi dà la possibilità di affiancarla nel suo lavoro di medico veterinario;
- gli amici del “Parco zoofilo San Francesco”, per l’affetto che da sempre mi dimostrano.

12. ALLEGATI

Allegato n. 1

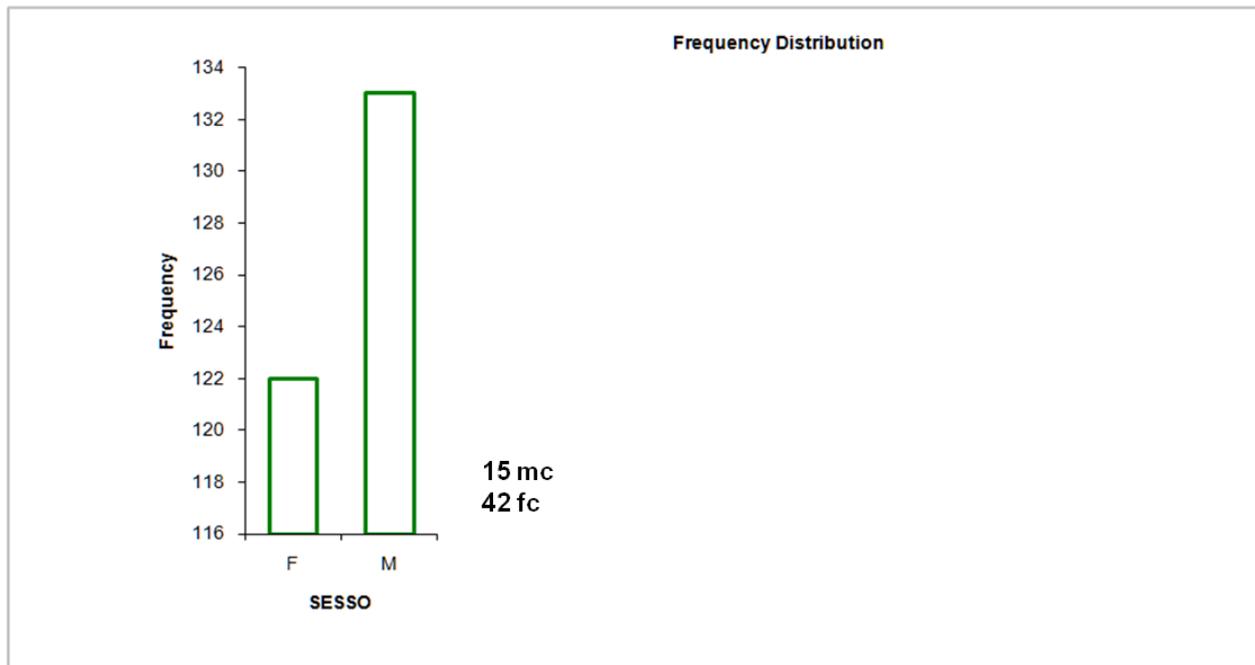
n | 255
 Categories | 25
 Mode | METICCIO



RAZZA	n	Proportion
ALANO	3	0.012
BARBONE TOY	2	0.008
BOVARO DEL BERNESE	4	0.016
BEAGLE	1	0.004
BOVARO DEL BERNESE	4	0.016
BOXER	10	0.039
BOVARO DEL BERNESE	1	0.004
BULLDOG INGLESE	1	0.004
CARLINO	2	0.008
CHIHUAHUA	1	0.004
COCKER SPANIEL INGLESE	3	0.012
DOBERMANN	4	0.016
GOLDEN RETRIEVER	5	0.020
JACK RUSSEL TERRIER	2	0.008
LABRADOR RETRIEVER	20	0.078
MALTESE	2	0.008
METICCIO	151	0.592
PASTORE TEDESCO	15	0.059
ROTTWEILER	3	0.012
SETTER INGLESE	5	0.020
SHIH-TZU	1	0.004
SIBERIAN HUSKY	2	0.008
SHIH-TZU	2	0.008
YORKSHIRE TERRIER	9	0.035
ZWERGPINSCHER	2	0.008

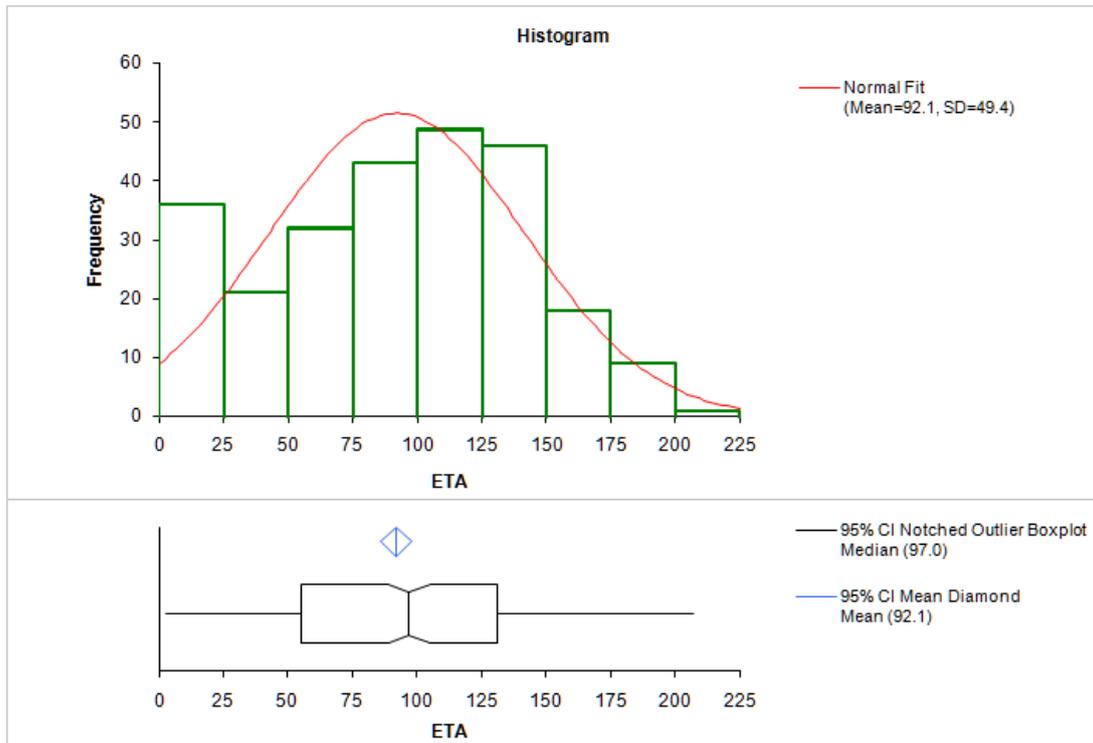
Allegato n. 2

n	255
Categories	2
Mode	M



SESSO	n	Proportion
F	122	0.478
M	133	0.522

Allegato n. 3



n	255	Median	97.0
Mean	92.1	95.5% CI	89.0 to 105.0
95% CI	86.0 to 98.1	Range	204
SE	3.09	IQR	75.7
Variance	2437.0	Percentile	
SD	49.4	0th	3.0 (minimum)
95% CI	45.4 to 54.1	25th	55.3 (1st quartile)
CV	53.6%	50th	97.0 (median)
Skewness	-0.16	75th	131.0 (3rd quartile)
Kurtosis	-0.85	100th	207.0 (maximum)
Shapiro-Wilk W	0.97		
p	<0.0001		