



**UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI PADOVA**

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

**Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie**

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA: SCIENZE VETERINARIE

DOTTORATO DI RICERCA: Scienze Cliniche Veterinarie

CICLO XXII

**Parametri eritrocitari e reticolocitari in corso di infiammazione  
sistemica nel cane**

**Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante**

**Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Isola**

**Supervisore: Ch.mo Prof. Daniele Bernardini**

**Dottorando : Dott. Tommaso Furlanello**

## Sommario

<b>Abstract</b>	<b>6</b>
<b>Riassunto</b>	<b>8</b>
<b>Parte Prima</b>	<b>10</b>
<b>FERRO ED EMATOPOIESI</b>	<b>10</b>
<b>FUNZIONI E METABOLISMO DEL FERRO</b>	<b>10</b>
<i>Distribuzione del ferro</i> .....	10
<i>Assorbimento del ferro</i> .....	12
<i>Trasporto del ferro</i> .....	13
<i>Cessione del ferro ai tessuti</i> .....	14
<i>Ruolo dei macrofagi nel metabolismo del ferro e clearance degli eritrociti</i> .....	15
<i>Ruolo dell'epcidina nel metabolismo del ferro</i> .....	16
<b>Eritropoiesi</b>	<b>19</b>
<i>Generalità sui reticolociti</i> .....	19
<i>Reticolociti da stress ("stress reticulocytes"; "shift r.")</i> .....	23
<b>ESAMI DI LABORATORIO PER LO STUDIO DEL METABOLISMO DEL FERRO</b>	<b>24</b>
<b>Generalità</b>	<b>24</b>
<b>Esami biochimici</b>	<b>24</b>
<i>Sideremia</i> .....	24
<i>Serum Iron Binding Capacity (Transferrina)</i> .....	25
<i>Ferritina</i> .....	25
<b>Esami ematologici tradizionali</b>	<b>26</b>
<i>Generalità</i> .....	26
<i>Volume Corpuscolare Medio, MCV</i> .....	27
<i>Contenuto Corp. Medio (MCH) e Concentrazione Emoglobinica Cell. Media (MCHC)</i> .....	27
<b>Esami ematologici eseguibili con il sistema ADVIA 2120®</b>	<b>28</b>
<i>Generalità</i> .....	28
<i>Corpuscolar Hemoglobin Concentration Mean, CHCM</i> .....	29
<i>Cellular Hemoglobin, CH</i> .....	29

<i>Cellular Hemoglobin (retic.), CHr</i> .....	29
<i>Mean Cellular Volume (retic.), MCVr</i> .....	30
<i>Hypo%, Hypo r %</i> .....	30
<i>Micro %, Micro r %</i> .....	31
<b>Esame del midollo</b>	<b>31</b>
<b>ANEMIA DA CARENZA DI FERRO</b>	<b>33</b>
<b>Introduzione</b>	<b>33</b>
<b>Eziopatogenesi</b>	<b>33</b>
<b>Diagnosi di laboratorio</b>	<b>36</b>
<i>Parametri ematologici</i> .....	36
<i>Parametri biochimici</i> .....	37
<b>ANEMIA DA INFIAMMAZIONE</b>	<b>38</b>
<b>Introduzione</b>	<b>38</b>
<b>Eziopatogenesi</b>	<b>40</b>
<i>Omeostasi del ferro patologica e ruolo dell'epcidina</i> .....	43
<i>Inibizione dell'eritropoiesi</i> .....	44
<i>Minore produzione di EPO</i> .....	45
<i>Riduzione dell'emivita eritrocitaria</i> .....	45
<b>Diagnosi di laboratorio</b>	<b>45</b>
<i>Parametri ematologici</i> .....	46
<i>Parametri biochimici</i> .....	47
<b>LA RISPOSTA DI FASE ACUTA: DEFINIZIONI E MONITORAGGIO</b>	<b>47</b>
<i>Fisiopatologia della risposta di fase acuta</i> .....	47
<i>Generalità sulle proteine di fase acuta</i> .....	48
<i>Proteina C Reattiva, CRP</i> .....	49
<i>Aptoglobina, HPT</i> .....	53

<b>Parte seconda</b>	<b>54</b>
<b>Introduzione</b>	<b>54</b>
<b>Materiali e metodi</b>	<b>55</b>
<i>Creazione dei gruppi</i> .....	56
<i>Esame emocromocitometrico</i> .....	57
<i>Esame biochimico</i> .....	59
<i>Profilo coagulativo</i> .....	61
<i>Altre indagini</i> .....	61
<i>Archiviazione dei dati</i> .....	62
<i>Analisi statistica</i> .....	62
<b>Risultati</b>	<b>63</b>
<i>Prevalenza dell'anemia in una popolazione di cani presentati per indagini cliniche</i> .....	63
<i>Segnalamento</i> .....	63
<i>Conta eritrocitaria</i> .....	67
<i>Emoglobina</i> .....	69
<i>Ematocrito (HCT)</i> .....	72
<i>MCV</i> .....	74
<i>MCHC</i> .....	76
<i>CH</i> .....	78
<i>CHCM</i> .....	80
<i>Conta reticolocitaria</i> .....	82
<i>MCVr</i> .....	84
<i>Chr</i> .....	86
<i>CHCMr</i> .....	88
<i>Hypo r %</i> .....	90
<i>Micro r%</i> .....	92
<i>Leucociti</i> .....	94
<i>Sideremia</i> .....	96
<i>Ferritinemia</i> .....	98
<i>Aptoglobina</i> .....	100
<i>Fibrinogeno</i> .....	102
<i>D-Dimeri plasmatici</i> .....	104
<i>Natremia</i> .....	106
<i>Osmolalità sierica misurata</i> .....	108

<b>Discussione e conclusioni</b>	<b>110</b>
<b>Bibliografia</b>	<b>121</b>
<b>Ringraziamenti</b>	<b>128</b>

## Abstract

### **Erythrocyte and reticulocyte parameters during systemic inflammation in the dog**

**Background.** Anemia of inflammation (AI), also known as anemia of chronic disease, is a complex multiorgan response to inflammatory disorders and related cytokine release. Three main mechanisms have been proposed: 1) retention of iron within the mononuclear phagocyte system caused by hepcidin action, 2) inhibition of erythropoiesis by cytokines, and 3) impaired response to erythropoietin. Although this response belongs to the innate immunity and is aimed to reduce the iron bioavailability for infectious agents or neoplastic cells, a detrimental effect for the patient can be observed. In canine medicine the occurrence of AI has been documented decades ago, but little information is available about the prevalence of AI in the clinical setting and on the hematopoietic response to the inflammation magnitude.

**Aims.** To classify the prevalence of anemia in a population of sick dogs, presented to a veterinary hospital, and to study the prevalence of variation in the erythron parameters (i.e., prevalence of anemia and related indexes) according to their degree of inflammation.

**Methods.** In order to assess the prevalence of anemia in sick dogs, complete blood counts obtained at the time of admission to the “Clinica Veterinaria San Marco” in one year period (January 2010 to December 2010) were analyzed. Anemia was defined when hemoglobin (Hgb) was  $< 13$  g/dL. To assess how the presence of anemia was related to increased severity of inflammation four groups of dogs cross-matched for breed (or weight), age and sex, with different concentration of serum C reactive protein (CRP) were created. These groups were formed from the analysis of the clinical records of a five-years period (2005-2010). The first group of sick dogs (Group 0) had CRP within reference range, Group 1

included sick dogs with 1-10 fold increase in CRP; Group 2 included sick dogs with 11-30 fold increase in CRP; and Group 3 included sick dogs with > 31 fold increase in CRP. For all dogs full hematological and biochemical data were available for analysis.

**Results:** Anemia was present in 23.4% of the 3579 sick dogs admitted in the year 2010. From the search of 22,669 clinical records of the five-years period (2005-2010), 3452 dogs were included for analysis to assess how the degree of anemia is related to an increased in severity of inflammation. These dogs were divided in four cross-matched group of 864 dogs. Analysis of these sick dogs showed that higher level of inflammation was statistically associated to lower Hgb content. When present the anemia was most of the time mild, normocytic, normochromic, and non regenerative. Anemia was detected in 9.5% of the dogs in Group 0, in 18.8% of the dogs in Group 1, in 40.5% of the dogs in Group 2 and in 39.4% of the dogs in Group 3. Mean reticulocyte absolute count was showed no significant difference between the four groups of sick dogs with different level of inflammation, but in sick dogs with higher CRP concentration reticulocyte abnormalities in both volume and Hgb content were often present.

**Conclusions:** Severity of inflammation was positively associated to prevalence of anemia in sick dogs; the anemia was mild, normocytic, normochromic, and non regenerative. In severe inflammation reticulocytes were smaller in volume and with reduced Hgb content.

## Riassunto

### Parametri eritrocitari e reticolocitari in corso di infiammazione sistemica nel cane

**Introduzione.** L'anemia da infiammazione (Anemia of Inflammation, AI), conosciuta anche come anemia da malattia cronica, è una complessa risposta organica ad uno stato infiammatorio e all'associato rilascio di citokine. Sono stati proposti tre principali meccanismi patofisiologici per motivare la comparsa dell'anemia: 1) sequestro del ferro all'interno del sistema fagocitico-mononucleare conseguente alla secrezione di epcidina, 2) inibizione all'eritropoiesi indotta dall'epcidina e 3) insufficiente risposta all'eritropoietina. Nonostante le azioni prima elencate facciano parte della risposta immunitaria innata e siano finalizzate a ridurre la biodisponibilità del ferro per agenti infettivi e cellule neoplastiche, non è infrequente che l'anemia possa associarsi ad effetti negativi per il paziente. In medicina canina l'AI è nota da tempo, ma vi sono scarse informazioni relative alla prevalenza in ambito clinico e non sperimentale. Inoltre mancano informazioni relative alla risposta eritrocitaria e reticolocitaria in relazione all'intensità dello stato infiammatorio.

**Obiettivi.** Preliminarmente si vuole valutare la prevalenza dell'anemia in un ampio numero di cani portati per indagini cliniche ad una clinica veterinaria. Successivamente verrà indagato l'assetto ematologico in differenti popolazioni di animali, stratificati in base al grado di infiammazione.

**Metodi.** La prevalenza dell'anemia nei cani affetto da uno stato di malattia sono stati esaminati 3579 animali portati per prima visita alla Clinica Veterinaria San Marco nell'anno 2010. I pazienti sono classificati come anemici quando l'emoglobina (Hgb) era < 13 gr/dL. Per indagare correlare l'assetto ematologico in rapporto allo stato infiammatorio, sono stati

creati 4 gruppi di cani, omogenei per razze (o peso), età e sesso, divisi in base ai livelli di proteina C reattiva (CRP). Questi gruppi sono stati creati analizzando i dati clinici raccolti in un periodo di 5 anni (2005-2010). Il primo gruppo (Gruppo 0) presentava concentrazioni sieriche di CRP comprese all'interno dell'intervallo di riferimento, nel Gruppo 1 era aumentata di 1-10 volte, nel Gruppo 2 di 11-30 e nel Gruppo 3 superava di almeno 31 volte il limite massimo dell'intervallo di riferimento. Per tutti cani erano disponibili numerosi esami emato-biochimici.

**Risultati.** Per quanto riguarda i cani visitati nell'anno 2010, l'anemia era presente nel 23,4% dei casi. Tra i 22.669 cani visitati nel periodo quinquennio 2005-2010 venivano estratti i dati di 3452 soggetti, divisi in 4 gruppi omogenei e differenziabili di 864 cani. Considerando l'entità dell'infiammazione, si è notata una diminuzione dell'Hgb al crescere dell'infiammazione stessa. L'anemia, quando presente, era mediamente lieve, normocromica e normocitica e non rigenerativa. L'anemia era presente nel 9,5% dei cani del Gruppo 0, nel 18,8% nel Gruppo 1, nel 40,5% del Gruppo 2 e nel 39,4% del Gruppo 3. La conta reticolocitaria non presentava differenze significative, ma nei pazienti che presentavano i maggiori livelli di CRP si osservava una tendenza alla microcitosi e all'ipocromia.

**Conclusioni.** La gravità dell'infiammazione presenta una correlazione diretta con la prevalenza dell'anemia; l'anemia è lieve, normocitica e normocromica, non rigenerativa. Nelle infiammazioni gravi si osserva una riduzione sia del volume che del contenuto emoglobinico dei reticolociti.

## Parte Prima

### FERRO ED EMATOPOIESI

#### Funzioni e metabolismo del ferro

Il ferro è essenziale per la vita, principalmente per la sua capacità di accettare e donare elettroni, mutando dalla forma ferrosa ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a quella ferrica ( $\text{Fe}^{3+}$ ) e viceversa (Kohgo et al., 2008). Oltre al trasporto di elettroni, che permette la funzione di trasporto dell'emoglobina, il ferro è inoltre un fattore chiave sia per la sintesi del DNA, come cofattore per la riduzione dei ribonucleotidi, che per l'eritropoiesi. Negli eucarioti, infatti, sono state descritte oltre 1000 differenti proteine ferro-dipendenti (Chepelev & Willmore, 2011).

Il ferro può anche presentare una notevole tossicità tissutale perché spontaneamente la forma ferrosa si ossida, producendo ROS (*Reactive Oxygen Species*) quali il superossido, il perossido di idrogeno e radicali ossidrilici ad elevata reattività. Questi composti sono in grado di danneggiare proteine, lipidi e DNA (Richardson et al., 2009; Chepelev & Willmore, 2011). La principale reazione con la quale si formano radicali idrossilici è chiamata *reazione di Fenton*, tramite la quale il ferro reagisce con il perossido di idrogeno per formare radicali ossidrilici. La formazione di questi radicali ossidrilici è considerata un fattore di rischio, in caso di sovraccarico di ferro, anche per lo sviluppo di neoplasie (Richardson et al., 2009). L'intrinseca tossicità del ferro è alla base della necessità per gli organismi viventi di disporre di procedure efficienti di trasporto del ferro attraverso le membrane biologiche, di distribuzione a tutto l'organismo e infine di deposito (sequestro) in forma inerte fino non si renda necessario l'utilizzo del metallo (Knovich et al., 2009).

#### *Distribuzione del ferro*

Il corpo umano ospita circa 3-4 gr di ferro, ovvero 40-50 mg per chilo di peso (Lynch, 2007). Il 60-70% è presente nell'emoglobina, il 20-30% è conservato in un compartimento

di deposito, sotto forma di ferritina ed emosiderina, principalmente nei macrofagi e negli epatociti e infine il 3-7% nella mioglobina, in particolare nel cane che appartiene alle specie più ricche di tale composto (Harvey, 2008a).

L'emoglobina è una metallo-proteina coniugata, che comprende 4 catene polipeptidiche, ognuna delle quali contiene un anello porfirinico chiamato eme. L'anello si lega in modo covalente con un atomo di ferro ferroso (Ashton, 2010). Come riportato in precedenza la quota di ferro legato all'emoglobina è predominante nei mammiferi e ogni ml di emazie concentrate contiene 1.1 mg di ferro (Harvey, 2008a).

Il compartimento di deposito è costituito dalla ferritina, che è presente quasi in tutte le cellule corporee, ma principalmente negli epatociti. La ferritina si lega al ferro, che viene ossidato e sequestrato in una forma sicura all'interno di una ampia cavità. La seconda funzione della ferritina è di controllare l'attività pro-ossidante del ferro, grazie alla sua attività ferrosidasica. In generale la ferritina regola la disponibilità di ferro a livello cellulare ed è un reagente chiave per i danni ossidativi e ciò spiega perché sia presente in ogni cellula e compartimento dell'organismo (Arosio & Levi, 2010).

La ferritina sierica si correla con i depositi totali di ferro dell'organismo (1 ng/mL di ferritina equivale circa a 10 mg di ferro in deposito) e nella ferritina è ospitato il 95% del ferro epatico (Boccio et al, 2003). L'emosiderina invece si trova nelle cellule del sistema monocito-macrofagico del midollo osseo e della milza e nelle cellule epatiche di Kupffer. Rappresenta una ferritina parzialmente degradata che si è formata dopo l'attività lisosomiale. L'emosiderina è visibile al microscopio ottico come granuli grigio-neri con le colorazioni ematologiche, oppure blu con il blu di Prussia (Harvey, 2008a). Solo il 5% del ferro epatico è contenuto nell'emosiderina (Boccio et al., 2003).

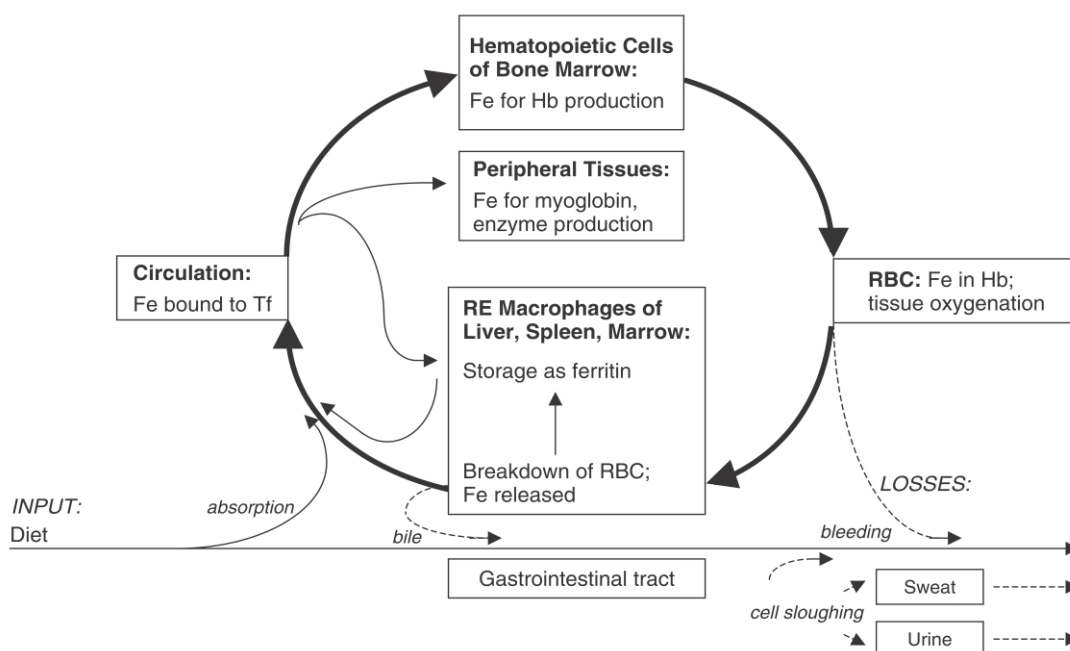
Il terzo compartimento in ordine di importanza (circa 3,5%) è costituito dalla *mioglobina*, strutturalmente simile all'emoglobina, presente in piccole quantità in tutte le cellule muscolari scheletriche e cardiache dove può essere utilizzata come riserva di ossigeno in

condizioni di anaerobiosi (Harvey, 2008a). Il ferro è anche presente nei tessuti e partecipa a numerose attività enzimatiche (Boccio et al., 2003; Harvey, 2008a).

Infine nel plasma è presente una quantità modesta di ferro, rappresentato da circa 3 mg negli esseri umani (Camaschella & Strati, 2010). La maggior parte del ferro circolante è legato ad una glicoproteina chiamata transferrina, che può trasportare una o 2 atomi di ferro per ogni molecola proteica. La maggior parte del ferro legato alla transferrina è destinato alla ematopoiesi extramidollare (Wrighting & Andrews, 2008).

### ***Assorbimento del ferro***

Il metabolismo corporeo del ferro deve essere considerato un sistema semi-chiuso, in mancanza di un meccanismo escretivo attivo e solo 1 mg circa viene perso attraverso perdite ematiche o la esfoliazione delle cellule mucosali intestinali (Schaefer, 2009). Per evitare da un lato pericolosi accumuli di ferro e dall'altro per preservare le riserve marziali, il metabolismo dei mammiferi è evoluto creando delle sofisticate strategie per regolare l'assorbimento (Kohgo et al., 2008). In figura 1 è presentato schematicamente il metabolismo del ferro.



**Figura 1: Metabolismo del ferro, da Schulze e Dreyfuss, 2005**

Il ferro presente negli alimenti proviene da fonti inorganiche ( $\text{Fe}^{+++}$ ) od organiche ( $\text{Fe}^{++}$ ) Nel primo caso il ferro ferrico deve prima subire una riduzione a  $\text{Fe}^{++}$  per essere assorbito, grazie ad un enzima in passato identificato nel citocromo-b duodenale ferririduttasi (Dcytb), ma attualmente ancora non ben definito (Dunn et al., 2006). Dopo la riduzione viene adsorbito dagli enterociti duodenali (Hentze et al., 2010).

Il ferro contenuto negli alimenti di origine animale (eme contenuto in emoglobina e mioglobina) entra nell'enterocita grazie alla presenza di un recettore, che si lega all'eme e che viene successivamente internalizzato per endocitosi (Dunn et al., 2006). Successivamente si libera il ferro dall'eme grazie ad una emossigenasi, chiamata HOX1 (Hentze et al., 2010).

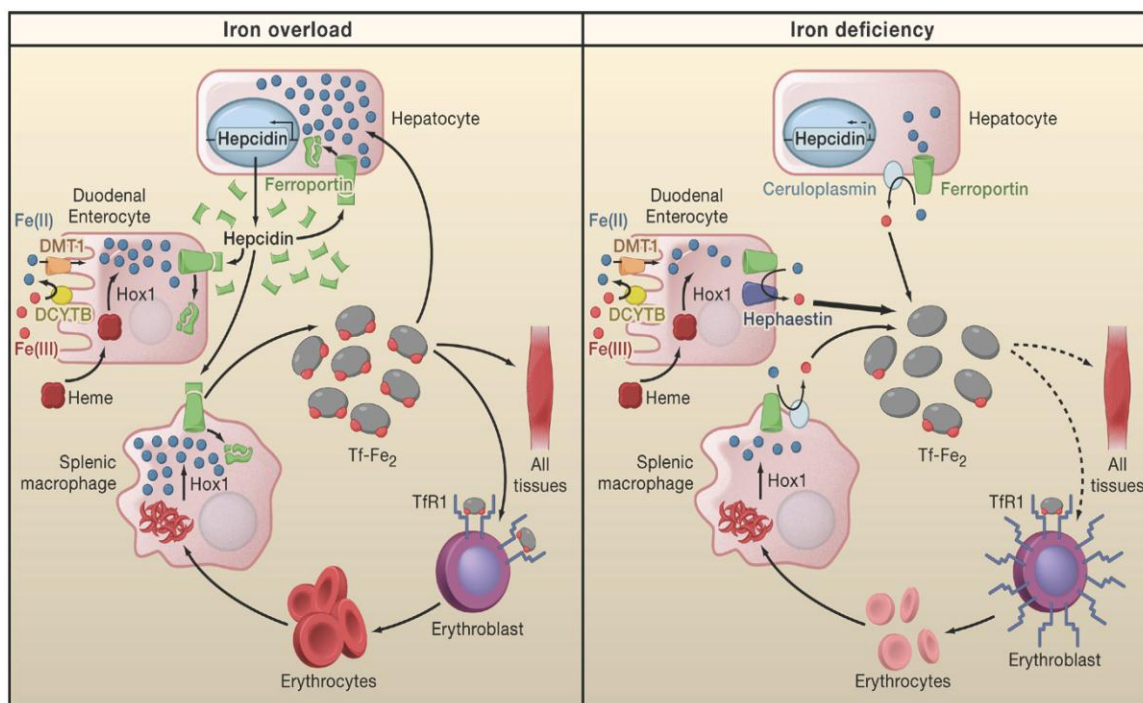
### ***Trasporto del ferro***

L'esportazione del ferro citosolico (vedi anche figura 2) richiede la presenza di una proteina-chiave nel metabolismo del ferro: la ferroportina (Fp). La Fp è una proteina transmembranaria posta sulla superficie delle cellule intestinali, dei macrofagi splenici ed epatici e degli epatociti. La Fp cede il ferro di deposito al plasma, perché possa giungere al midollo emopoietico (Handelman & Levin, 2008). In altri termini è considerata l'unica iron-exporter dei vertebrati (Wrighting & Andrews, 2008). Richiede inoltre la compresenza di una ossidasi omologa alla ceruloplasmina, al fine di permettere l'ossidazione necessaria per il legame con la transferrina (Tf) (Hentze et al., 2010).

La transferrina è il principale veicolo del ferro nel sangue. E' un polipeptide a singola catena, dotata di 2 lobi, ognuno dei quali è in grado di legare un atomo di ferro ( $\text{Fe}^{+++}$ ). Il legame con la transferrina protegge l'organismo dall'azione ossidante del ferro e riduce la biodisponibilità del ferro da parte di eventuali batteri (Bleackley et al., 2009). Circa il 70% della transferrina circola non legata al ferro, al fine di agire come un tampone per l'eventuale presenza di ferro libero (Bleackley et al., 2009). La quantità di ferro circolante e legato alla Tf è determinato da 3 processi coordinati: l'assorbimento duodenale, il riciclo

del ferro eritrocitario da parte dei macrofagi (vedi oltre) e la quantità di ferro presente nel fegato (Wrighting & Andrews, 2008).

Nella figura 2 è presentata graficamente l'interazione necessaria per l'assorbimento e l'escrezione del ferro.

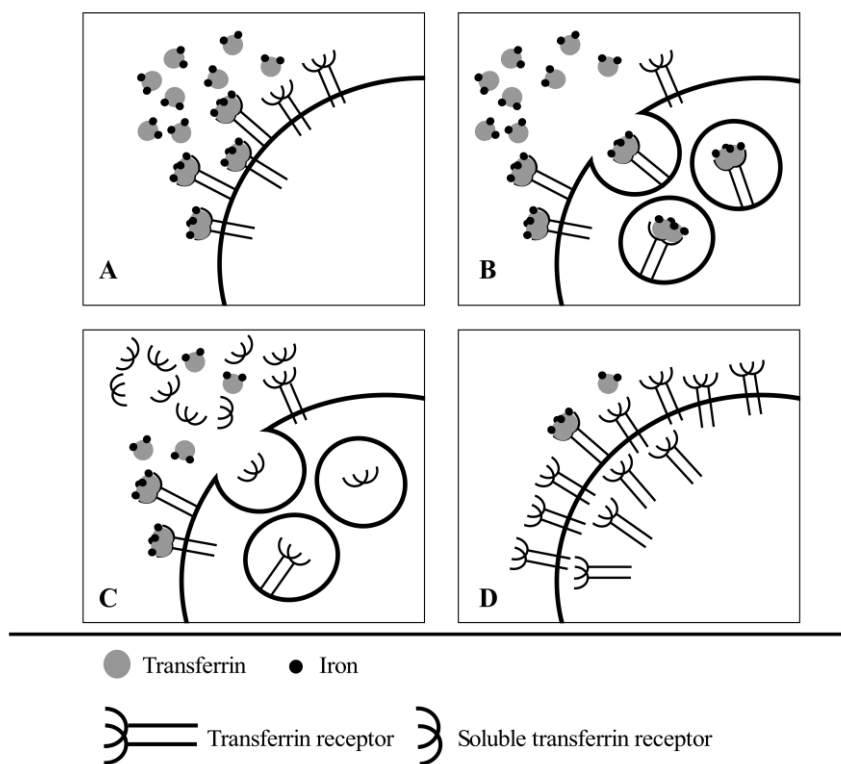


**Figura 2: Regolazione dell'omeostasi sistemica del ferro in condizioni di sovraccarico (a sx) e di carenza (a dx), da Henzte et al., 2010.**

### *Cessione del ferro ai tessuti*

La cessione del ferro legato alla transferrina richiede un legame con una glicoproteina ubiquitaria, di massa molecolare di 190 kDa, chiamata Transferrin Receptor (TfR) espressa sulla superficie di tutte le cellule nucleate (Richardson et al., 2009). La sua funzione è appunto di provvedere alla internalizzazione del ferro, trasportato nel complesso ferro-transferrina, nelle cellule (Ervasti, 2008). Si reperisce in tutte le cellule proliferanti e che richiedono ferro, quali reticolociti, linfociti attivati, monociti, macrofagi ed altre cellule presenti in cute, fegato, pancreas, ipofisi, testicoli, placenta. Viene espressa anche dalle cellule neoplastiche (Ervasti, 2008). L'espressione in superficie è direttamente proporzionale al fabbisogno cellulare e di conseguenza ne sono maggiormente dotati i precursori eritroidi. Per quanto riguarda i reticolociti, più sono immaturi e maggiore è

l'espressione del TfR sulla superficie cellulare stessa (Ervasti, 2008). Nella figura 3 è presentata una rappresentazione grafica del legame del recettore TfR con la transferrina.



**Figura 3: Presentazione schematica del rapporto tra il TfR e il recupero del ferro. Da A a C è presentata la formazione del legame e il rilascio per escitosi di frammenti del TfR (C). Nel riquadro D si nota l'aumentata espressione del TfR in caso di carenza di ferro (da Ervasti, 2008)**

Nel plasma è presente una forma troncata del TfR, chiamata forma solubile (sTfR) e che origina dal TfR, solitamente dopo la captazione della transferrina (vedi anche figura 3) (Ervasti, 2008, Camaschella & Strati, 2010).

### ***Ruolo dei macrofagi nel metabolismo del ferro e clearance degli eritrociti***

I macrofagi sono leucociti mononucleati con funzione fagocitaria e che esplicano un ruolo importante nell'immunità sia innata che cellulo-mediata. Inoltre fagocitano e rilasciano il ferro secondariamente a vari fattori e sono così in grado di modulare la sideremia. Il ferro custodito dai macrofagi proviene primariamente dalla degradazione degli eritrociti senescenti (Bleackley et al., 2009), che esauriscono il loro percorso vitale, considerando un'emivita di 120 gg. nell'uomo (Wrighting & Andrews, 2008), 100-115 giorni nel cane e 73

gg. nel gatto (Harvey, 2008b). L'emivita eritrocitaria è inoltre determinata anche dagli insulti ossidativi accumulate dalle emazie. I meccanismi attraverso i quali i macrofagi sono in grado di individuare le emazie senescenti o danneggiate sono complessi ed in parte ancora non chiariti (Wrighting & Andrews, 2008). Sicuramente avvengono delle trasformazioni reologiche legate all'età (ad esempio minore deformabilità), ma sono anche stati descritti meccanismi di clearance sia immunologici (legami con immunoglobuline o complemento) che non immunologici (ossidazione delle proteine) (Christian, 2010).

La clearance avviene nella milza, nel fegato e nel midollo ematopoietico. Le emazie fagocitate sono digerite all'interno dei fagolisosomi macrofagici e l'emoglobina è dissociata ad eme e globina (Christian, 2010). Successivamente una eme-ossigenasi catalizza l'ossidazione a biliverdina, ferro libero e monossido di carbonio. Il ferro che si accumula nel macrofago può essere utilizzato dalla cellula, sequestrato nella ferritina, oppure esportato nel plasma (Wrighting & Andrews, 2008; Orino & Watanabe, 2008). La maggior parte del ferro viene comunque mobilizzato grazie alla Fp, per essere utilizzato nella eritropoiesi. Dato che la Fp mobilizza ferro ferroso, è necessario l'ausilio di una ferrosidasi circolante, la ceruloplasmina, per ottenere il ferro ferrico che si andrà a legare con la transferrina circolante. La ceruloplasmina inoltre permette la persistenza delle Fp sulla superficie cellulare, facilitando così il ricircolo del ferro (Wrighting & Andrews, 2008).

Infine i macrofagi midollari possono offrire del ferro recuperato dalle emazie senescenti direttamente agli eritroblasti, senza (probabilmente) l'ausilio della Fp e della transferrina (Hentze et al., 2010). Si possono infatti formare le c.d. isole eritroblastiche, visibili a volte nella citologia midollare. Le isole sono formate da cluster di cellule eritropoietiche disposte a centri concentrici attorno ad un macrofago che, tramite proiezioni membranose fornisce ferro e probabilmente altri nutrienti e citokine ematopoietiche (Chasis & Mohandas, 2008).

### ***Ruolo dell'epcidina nel metabolismo del ferro***

L'epcidina (*hepcidin*) è un piccolo ormone polipeptico di recentissima scoperta (2001) che negli ultimi anni è stato riconosciuto come il principale regolatore dell'assorbimento del

ferro e del suo ricircolo. Inoltre ha rivoluzionato ogni interpretazione del metabolismo del ferro sia in condizioni di normalità che di malattia (Franchini et al., 2010).

L'epcidina è prodotta dal fegato, e il termine *hepcidine* deriva dalla coniugazione dell'origine epatica con la sua funzione attività antimicrobica diretta (Fry, 2010) che però è stata dimostrata solo in vitro (Hentze et al., 2010). La epcidina è anche prodotta dai monociti, su stimolazione di interleukina 6 (IL-6) e dei lipopolisaccaridi (Adamson, 2008). Viene inoltre prodotta da adipociti e cardiomiociti (Kemna et al., 2008).

È classificata come una proteina della fase acuta (Mast et al., 2008; Kemna et al., 2008), perché la sua sintesi viene indotta da stati infettivi ed infiammatori (Franchini et al. 2010).

Dal punto di vista molecolare, la produzione inizia da un pre-propeptide da 84aa, dal quale deriva la proepcidina circolante da 60aa, che viene infine ridotta alla epcidina (Price & Schrier, 2010). Esistono 2 forme principali, con 20 e 25 AA (Richardson et al., 2009). Secondo altri la forma matura bio-attiva è da 25 AA. Alcune degradazioni amino-terminali risultano nella produzione di più piccole isoforme da 20 e 22 AA (Franchini et al. 2010).

La circolazione nel plasma avviene grazie ad un legame con una alfa-2 macroglobulina (Hentze et al., 2010). L'epcidina è stata isolata e sequenziata negli esseri umani, nel topo, nel ratto, nel maiale, nei pesci e anche nel cane (Fry et al., 2004).

Esistono due condizioni di sovraespressione acquisita dell'epcidina: più raramente in caso di adenomi epatici che producono epcidina, o molto più comunemente nelle anemie da infiammazione, associate alla presenza di citochine infiammatorie (Comaschella & Strati, 2010), come sarà dettagliato più avanti.

In generale, i principali induttori e regolatori del gene HAMP, posto sul cromosoma 19q13.1 e deputato alla produzione di epcidina, sono (Franchini et al. 2010):

1. Alterazioni nei depositi corporei di ferro
2. Alterazioni nel tasso di eritropoiesi
3. Ipossia
4. Stress ossidativo

## 5. Infiammazione

IL-6 è il principale stimolo per la secrezione acuta di epcidina e infatti il trattamento con Ab anti-recettori per IL-6 porta ad una rapida riduzione delle epcidina e ad una correzione dell'anemia (Nemeth & Ganz, 2006). Viene stimolata anche da altre citokine (Handelman & Levin, 2008), tra le quali si cita la IL-1 (Fry, 2010).

Viene inibita dalla carenza di ferro e da patologie che richiedono un incremento dell'eritropoiesi, quali principalmente l'anemia l'ipossia. Quando si riduce l'epcidina, allora aumentano le ferroportine sulla superficie dei macrofagi e degli epatociti, permettendo l'export del ferro dal pool di deposito al plasma (Hentze et al., 2010). La produzione è inibita anche dalla presenza di un *hypoxia-inducible factor* (HIF)-1 $\alpha$  (Viatte & Vaulont, 2009).

L'epcidina viene prodotta entro poche ore dall'evento infiammatorio ed infatti inoculando epcidina ad un topo si ottiene ipoferremia in 1h. Questo fenomeno è così rapido perché il pool plasmatico è scarso rispetto al flusso di ferro necessario per l'eritropoiesi (Harvey, 2008a). Più in particolare si genera un picco sierico di epcidina entro 6h dallo stimolo iniziale, parallelo con la diminuzione della sideremia, che si mantiene per almeno 22h (Sihler & Napolitano, 2008). Secondo altri una singola iniezione di epcidina mantiene una profonda ipoferremia per 2-3 gg. (Ganz & Nemeth, 2009). Viene considerata quindi un'azione rapida come insorgenza ma limitata nel tempo. È interessante notare che terminata la produzione di epcidina la ipoferremia torna a valori normali (o superiori) dopo qualche ora (Viatte & Vaulont, 2009). Il meccanismo d'azione è di grande interesse: l'epcidina giunge alla superficie basolaterale degli enterociti del duodeno, dove causa l'internalizzazione e conseguente degradazione della Fp, portando in conclusione all'intrappolamento del ferro entro la cellula. Con identico meccanismo agisce anche su macrofagi ed epatociti (Richardson et al., 2009).

## **Eritropoiesi**

Dopo aver accennato nelle pagine precedenti al metabolismo del ferro, si vuole ora introdurre alcuni elementi relativi all'eritropoiesi che sono da ritenere fondamentali per una corretta interpretazione degli stati patologici a carattere anemico che verranno di seguito presentati.

Con eritropoiesi si intende la proliferazione e progressiva differenziazione delle cellule staminali ematopoietiche (HSCs) in eritrociti emoglobinizzati (Olver, 2010).

L'eritropoiesi e la massa eritrocitaria è regolata dai livelli cellulari di ossigeno. Gli RBC originano dalle HSC in maniera "stepwise". Ad ogni passo si osserva una divisione cellulare ed una differenziazione; inoltre ogni passo è iniziato e regolare da fattori specifici umorali, microambientali, di superficie cellulare e da fattori trascrizionali (Olver, 2010).

L'eritropoiesi è confinata, nell'animale adulto, nello scheletro assiale. Se aumentano le richieste la produzione avviene anche nelle ossa piatte e lunghe, a spese della matrice ossea. In condizioni estreme la produzione si sposta in milza, fegato e linfonodi (Harvey, 2008b). È necessaria una amplificazione massiva per creare  $4 \times 10^{11}$  rbc maturi a partire da  $2 \times 10^4$  cellule staminali. In condizioni normali sono presenti 50 rubrociti e 113 reticolociti per ogni rubroblasto (Olver, 2010). La progressione da pronormoblasto ad eritrocita maturo richiede 3-5 gg. negli esseri umani (Riley et al., 2001; Riley et al., 2002).

La divisione cellulare avviene fino allo stadio di eritroblasto. Ad ogni divisione si associa una diminuzione del volume (Ervasti, 2008).

La maturazione degli eritrociti può essere così riassunta: BFU (*Burst Forming Units*)  $\Rightarrow$  CFU (*Colony Forming Unit*)  $\Rightarrow$  rubroblasto o proeritroblasti  $\Rightarrow$  prorubrocita  $\Rightarrow$  rubrociti basofili  $\Rightarrow$  rubrociti policromatofili  $\Rightarrow$  metarubrocita (eritrocita nucleato)  $\Rightarrow$  reticolocita  $\Rightarrow$  eritrocita (Olver, 2010).

### ***Generalità sui reticolociti***

I reticolociti sono eritrociti immaturi e derivano dalla eliminazione del nucleo presente nei normoblasti ortocromatici (Riley et al., 2002). Sono così chiamati dal reticolo che appare

quando vengono colorati con coloranti basici quali il blu di metilene. Il reticolo comunque è un artefatto formato dalla precipitazione dell'acido ribonucleico ribosomiale e dalle proteine (Harvey, 2008a).

La maturazione inizia nel BM ed è completata nel sangue periferico e nella milza nel cane e nel gatto (Harvey, 2008a). Le più importanti modifiche che avvengono nel processo maturativo sono le seguenti (Riley et al., 2002):

- Sintesi e accumulo citoplasmatico di Hb
- Perdita delle capacità di sintetizzare proteine e dei mitocondri
- Condensazione della cromatina, contrazione ed estrusione del nucleo
- Perdita dei recettori di superficie
- Alterazioni nella composizione delle membrane per variazioni delle percentuali di colesterolo e dei fosfolipidi
- Alterazioni nelle concentrazioni di vari enzimi intracellulari, tra i quali la glucosio-6-fosfato deidrogenasi

La fase iniziale, partendo dal metarubrocita, prevede l'espulsione del nucleo e la riorganizzazione del citoscheletro per modifica dei filamenti intermedi e del microtubulo; i nuclei espulsi sono rapidamente fagocitati dai macrofagi midollari (Olver, 2010). Nel processo maturativo i reticolociti guadagnano Hb e perdono organelli, membrane di superficie, volume e numerose proteine presenti nella superficie cellulare (Olver, 2010).

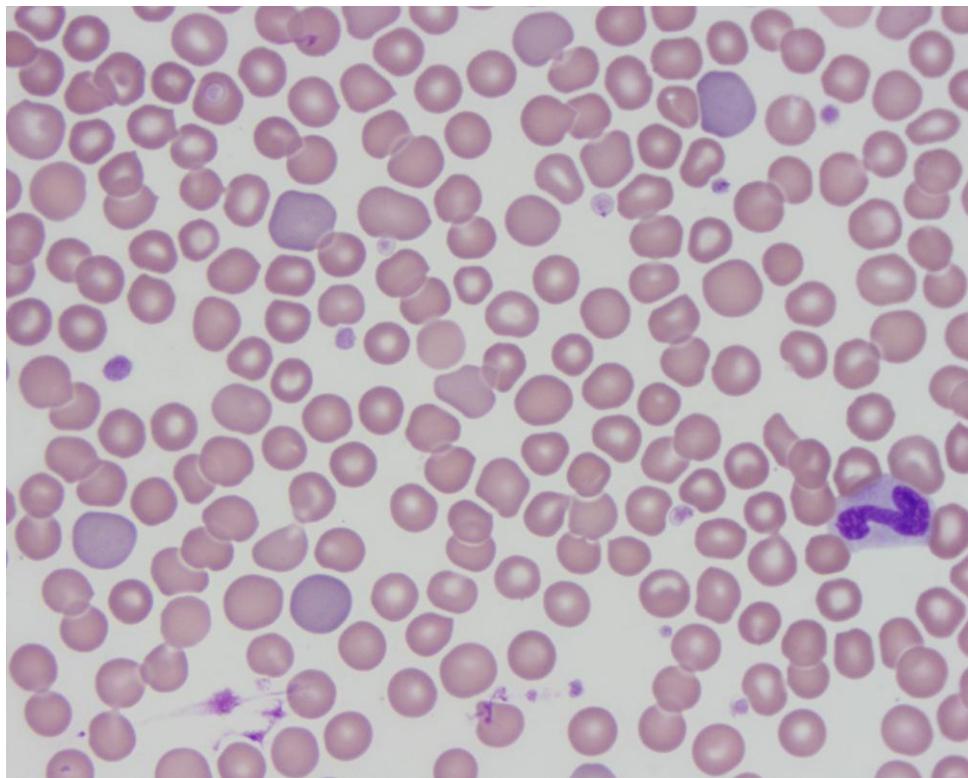
I reticolociti contengono comunque residui mitocondriali, membrane del Golgi, ribosomi e microtubuli. Presentano un volume > 35% circa rispetto ai gr maturi (Olver, 2010) o del > del 20-30% negli esseri umani (Riley et al., 2002).

Nella fase di maturazione viene prodotto il 20-30% dell'Hb totale. Questa attività richiede un citoplasma in grado di operare delle sintesi e quindi completo di ribosomi, poliribosomi, RNA e mitocondri. Questi organelli dovranno essere rimossi nei 3-4 gg. seguenti. La maturazione richiede quindi una degradazione e una pulizia dei componenti che non saranno utilizzati dalla cellula matura (Christian, 2010).

Dai reticolociti vengono inoltre liberati degli esosomi che hanno un ruolo principale nel rimodellamento dei reticolociti e nel processo di estrusione. Sono formate da invaginamenti eodocitici della membrana. Gli esosomi rilasciati presentano delle caratteristiche, come ad esempio l'esposizione di fosfatidiliserina, che permettono il loro riconoscimento e la rimozione da parte dei macrofagi come corpi apoptotici, impedendo lo sviluppo di infiammazioni o autoimmunità (Christian, 2010).

I reticolociti rimangono per 2-3 gg. a maturare nel midollo prima di essere rilasciati nel circolo (Olver, 2010). Durante la loro maturazione, i reticolociti diventano sempre più deformabili, al fine di poter uscire dallo spazio extravascolare del midollo. I reticolociti spingono contro le superfici ab-luminali delle cellule endoteliali che compongono la parete del seno. Le cellule endoteliali sviluppano dei "*thins*" citoplasmatici e dei piccoli pori, che permettono ai reticolociti di essere spinti attraverso la parete del seno, grazie ad un piccolo gradiente pressorio. Apparentemente i seni si chiudono dopo il passaggio del reticolocita (Harvey, 2008a).

Nel cane i reticolociti (figura 4) che vengono liberati dal midollo sono "relativamente immaturi" e appaiono come policromatofili (Harvey, 2008a) .



**Figura 4: Striscio ematico in cane che manifesta un'intensa rigenerazione.. I reticolociti si presentano di diametro maggiore e di più intensa affinità tintoriale (per g.c. Dott.ssa Silvia Tasca, Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco)**

I reticolociti nel cane sono per la maggior parte classificabili come aggregati. I puntati sono più rari perché è molto veloce la maturazione ad eritrocita maturo (Christian, 2010). La maturazione dopo il rilascio ematico si completa in 24h circa (Christian, 2010) e per 4 gg. al massimo negli esseri umani (Mast et al., 2008).

Nel cavallo, con il NMB non si osservano reticolociti e nemmeno vengono prodotti in caso di anemia. Con lo strumento ADVIA 2120® Siemens e grazie ad una metodica che verrà presentata più avanti è possibile comunque riconoscere una popolazione reticolocitaria anche nel cavallo. Secondo alcuni potrebbe trattarsi di artefatti (Harvey, 2008a), oppure, più probabilmente di una maggiore sensibilità della metodica e pertanto si può concludere che le moderne strumentazioni possono aiutare nella valutazione dell'anemia del cavallo (Christian, 2010).

***Reticolociti da stress (“stress reticulocytes”; “shift r.”)***

La regola generale, ad eccezione degli equini, è che in caso di anemia vengano prodotti un aumentato numero di reticulociti. Se l'anemia è grave vengono rilasciati dei macroreticulociti basofilici, chiamati anche “*stress reticulocytes*”, che presentano dimensioni doppie (Harvey, 2008a). Sono meno maturi dei normali reticulociti e presentano più mitocondri, ribosomi ed altri organelli. Inoltre sono meccanicamente rigidi ed instabili (Olver, 2010). Gli “*stress reticulocytes*” sono quindi dei reticulociti immaturi che vengono rilasciati in circolo esclusivamente in risposta ad un grave stato anemico. Al microscopio con contrasto di fase risultano multilobulari e motili, all'opposto dei reticulociti maturi. In caso di anemia la loro sopravvivenza è aumentata (Riley et al., 2002). Il rilascio dei reticulociti da stress è potenziato dall'aumento dell'EPO, che permette una diminuzione delle cellule avventizie e della barriera delle cellule endoteliali che separa il midollo emopoietico dai seni (Harvey, 2008a).

Solitamente una porzione di questi macroreticulociti è rimossa rapidamente dal circolo, anche se è evidente nei gatti che alcuni maturano a RBCs macrocitici, con un'emivita relativamente normale (Harvey, 2008a).

I reticulociti da stress, al contrario dei reticulociti liberati in condizioni fisiologiche (che perdono le loro proprietà adesive legate alla fibronectina), mantengono i recettori per la fibronectina. Quando raggiungono la milza, avviene un legame con il sistema reticolo-endoteliale, con rimodellamento della membrana ed eliminazione delle proprietà adesive. In caso di grave emolisi, però, questa attività splenica viene sovrastata e diventa carente (Thachil, 2008).

## **Esami di laboratorio per lo studio del metabolismo del ferro**

### **Generalità**

Il metabolismo del ferro può essere indagato in ambito clinico valutando la presenza del metallo nel siero o nel midollo emopoietico, oppure gli effetti di una eventuale carenza a livello eritropoietico, utilizzando vari parametri eritrocitari e reticolocitari. In questo capitolo verranno presi in considerazione esclusivamente indagini già applicate e di consolidata utilità in medicina umana, riferendosi per quanto possibile alle informazioni presenti in medicina veterinaria.

Già in questa premessa possiamo introdurre il fondamentale concetto che l'unico *gold standard* per valutare gli stati carenziali e più in generale le riserve marziali è rappresentato in medicina umana dalla quantificazione microscopica dell'emosiderina nell'aspirato del midollo emopoietico (Clark, 2009). Tale soluzione presenta rilevanti limitazioni sia in medicina umana (Beutler, 2010) che veterinaria (Weiss, 2010) e pertanto è facile comprendere la costante ricerca scientifica di marcatori affidabili, da ottenere in modo non invasivo, per una corretta diagnosi di carenza di ferro.

### **Esami biochimici**

#### ***Sideremia***

Con il termine di sideremia si intende il  $Fe^{+++}$  legato alla transferrina. La metodica analitica più utilizzata prevede il rilascio del ferro dalla transferrina grazie alla diminuzione del pH del campione. Successivamente il ferro viene complessato con un cromogeno (Higgins et al., 2008).

L'uso della sideremia per individuare stati carenziali o anche di sovraccarico marziale è fortemente limitata dal fatto che si osserva una diminuzione della stessa sia in caso di reale carenza, ma anche in caso di stati infiammatori, nell'ambito della complessa reazione organica associata alla liberazione di citochine infiammatorie (Soeters & Grimble., 2009). Inoltre tende ad aumentare in caso di anemia emolitiche, diseritropoiesi, anemia

ipoplastica e aplastica, sovraccarico di ferro e in terapia cortisteroidea, almeno nel cane e nel cavallo (Weiss, 2010).

### ***Serum Iron Binding Capacity (Transferrina)***

La iron-binding capacity esprime la quantità di transferrina presente nel sangue circolante. La *capacità ferro legante totale* (TIBC = Total Iron Binding Capacity) si misura aggiungendo il ferro esogeno al campione in esame e determinando la quantità di ferro che si è legata alla transferrina. La *capacità ferro legante insatura* (UIBC = Unsaturated Iron Binding Capacity) si ottiene sottraendo la quantità di sideremia dalla TIBC. La *percentuale di saturazione* invece è il rapporto tra sideremia e la TIBC ( $Fe \cdot 100 / TIBC$ ).

Un aumento della TIBC talora può essere associata a deficienza di ferro, come tipico reperto dell'uomo, coniglio, maiale, cavallo e bovini. Nei cani con carenza di ferro solitamente è nella norma, se si eccettuano dei casi sperimentali in cani giovani (Harvey, 2008b).

La concentrazione sierica della TIBC può diminuire in caso di malnutrizione e/o infiammazione (Kovesdy, 2008) e diminuisce anche negli stati neoplastici (Robertson & Hutchison, 2009). In generale nelle malattie infiammatorie degli animali si presenta diminuito, oppure nella parte bassa dell'intervallo di riferimento (Weiss, 2010). In alcuni animali la TIBC aumenta nel sovraccarico di ferro ed in cani con epatopatie croniche (Harvey, 2008b).

### ***Ferritina***

La ferritina presente nel siero presenta un'origine e un meccanismo secretivo ancora da definire (Orino & Watanabe, 2008). Dal punto di vista diagnostico è di grande rilevanza perché la sua concentrazione sierica è proporzionale al ferro di deposito (El-Khatib, 2009): 1 mg/l di ferritina sierica corrispondono a 8–10 mg o 120 mcg di ferro di deposito/kg peso vivo (Cook, 2005).

Secondo alcuni ricercatori dovrebbe essere considerato il più potente marker per la diagnosi di carenza di ferro, ad eccezione delle popolazioni affette da stati infiammatori, epatopatie o malattie neoplastiche, perché la ferritina sierica è da considerare una proteina della fase acuta. Comunque, se valutato appropriatamente, può essere utilizzato anche in queste popolazioni (Wang et al., 2010). E' fondamentale quindi dosare contemporaneamente una proteina della fase acuta, preferibilmente affidandosi alla proteina C reattiva (CRP), che è generalmente considerata il miglior parametro dell'infiammazione. Non è stato però accuratamente definito un cut-off per questo scopo. In linea generale quando la CRP è < 30 mg/L, allora la ferritinemia può essere considerata "valida" per l'esplorazione delle riserve marziali. Si riferisce inoltre di uno studio nel quale la ferritina era considerata diagnostica di anemia da carenza di ferro se < 40 mcg/L in pazienti senza infiammazione e < 70 in quelli con infiammazione (Cook, 2005). Esiste inoltre uno studio sperimentale recente che documenta una correlazione diretta fra CRP e ferritina (Kovesdy, 2008).

Nel cane lo studio della ferritinemia è sicuramente meno avanzata rispetto alla medicina umana e ancora sono rari gli studi di validazione per quanto riguarda metodiche utilizzabili nell'ambito clinico (Caldin et al., 1999; Orino & Watanabe, 2008).

## **Esami ematologici tradizionali**

### ***Generalità***

Il ferro è fondamentale per la sintesi dell'emoglobina. La carenza di ferro comporta una progressiva diminuzione del volume cellulare e della componente di Hb, delineando così un pattern caratteristico, valutabile con un tradizionale esame emocromocitometrico. La presenza di ipocromia e microcitosi risulta quindi molto specifica ma la sensibilità è estremamente bassa, come dimostrato ampiamente in medicina umana e in forme sperimentali nel cane (Fry & Kirk, 2006), nelle forme che non hanno ancora portato ad una forma di anemia, mentre sarebbe fondamentale disporre di test che possano permettere

una diagnosi di carenza di ferro, che precede solitamente per mesi la comparsa dell'anemia (Harvey, 2008b; Beutler, 2010).

### ***Volume Corpuscolare Medio, MCV***

Viene calcolato da  $PCV \times 10 / RBC$  ed è espresso in femtolitri. Indica le dimensioni medie dei globuli rossi.

L'MCV non è sensibile per la diagnosi di microcitosi perché deve essere presente un numero relativamente grande di microciti per influenzare questo valore. (Harvey, 2008b).

Le principali cause di riduzione del MCV sono di natura genetica, nell'Akita Inu e nello Shiba Inu, la carenza di ferro, l'anemia da infiammazione cronica e più raramente l'eliptocitosi ereditaria, la diseritropoiesi e tossicità da farmaco o altre sostanze (Goodfellow et al., 2008).

### ***Contenuto Corpuscolare Medio (MCH) e Concentrazione Emoglobinica Cellulare Media (MCHC)***

Si tratta di due parametri calcolati. L'MCH esprime la quantità media dell'Hb cellulare, ovvero la quantità di  $Hb \times RBC$ . Si calcola con la seguente formula:  $Hb \text{ (gr/dL)} / RBC \times 10$  (Ryan, 2010). Fornisce scarse indicazioni supplementari rispetto a MCV ed MCHC, perché dipende sia dal volume che dalla concentrazione di Hb degli eritrociti. Solitamente si correla con l'MCV, ma non nel caso degli eritrociti macrocitici ipocromici (Harvey, 2008b). Anche per altri la stretta correlazione con l'MCV rende poco utile la valutazione del MCH (Ryan, 2010).

L'MCHC calcola la concentrazione media dell'Hb cellulare. La formula prevede:  $[Hb / (RBC \times MCV)] \times 1000$  e indica la quantità di Hb per unità di volume cellulare eritrocitario (Ryan, 2010). L'Hb utilizzato per il calcolo viene ottenuto con metodica colorimetrica e il parametro viene negativamente influenzato dalla presenza di emolisi e lipemia (Bauer & Moritz, 2008). Nelle carenze di ferro può essere normale se l'MCV è solo lievemente diminuito, mentre è sicuramente diminuito se l'MCV è a sua volta moderatamente/marcatamente ridotto (Harvey, 2008b). Comunque in caso di carenza di

ferro è l'ultimo degli indici eritrocitari a diminuire e la sua importanza clinica si riduce solitamente all'uso come controllo di qualità del campione, in particolare per quanto riguarda la sua turbidità (Ryan, 2010).

### **Esami ematologici eseguibili con il sistema ADVIA 2120®**

#### ***Generalità***

Il contaglobuli laser ADVIA 2120® (Siemens Medical Solutions) è un apparecchio destinato ai laboratori professionali che dispone di due differenti metodi per misurare l'Hb: una metodica colorimetrica che valuta la cianometemoglobina libera e una metodica innovativa che permette, grazie ad una tecnica citofluorimetrica *low-angle e high angle laser light scatter*, di misurare la concentrazione emoglobina e il volume cellulare "cellula per cellula". Con questa tecnica si distingue l'Hb cellulare da quella extracellulare, evitando così l'interferenza data dall'emolisi (Bauer & Moritz, 2008). Il sistema ADVIA 2120 rappresenta un'evoluzione del precedente apparecchio, con la caratteristica saliente di utilizzare una metodica colorimetrica che non richiede l'uso dei cianuri. (Bauer & Moritz, 2008).

L'Hb misurata con il metodo cianometemoglobinico è chiamata  $Hb_{total}$ , mentre quella valutata in citometria  $Hb_{cell}$ . È stato proposto anche un  $Hb_{delta}$  ( $Hb_{total} - Hb_{cellular}$ ) che permette di individuare la presenza di emolisi o di monitorare la presenza di Hb libera eterologa utilizzata a fini terapeutici (March et al., 2005).

La seconda peculiarità del sistema ADVIA è riferita alla identificazione dei reticolociti. La metodica utilizzata prevede di utilizzare una particolare soluzione tampone che fissi il pH e l'osmolalità a dei valori prefissati. Il tampone ha la funzione di facilitare la penetrazione negli eritrociti della Oxazina 750, un composto non fluorescente che si lega all'RNA presente nei reticolociti (Tvedten & Moritz, 2010). Utilizzando delle soglie pre-definite, è possibile separare tre popolazioni di reticolociti a seconda del loro contenuto di RNA (Riley et al., 2002).

Grazie alla presenza di un software dedicato e a prove di validazione, il sistema ADVIA è stato utilizzato per la valutazione dei campioni ematici canini, grazie anche alla realizzazione di opportuni intervalli di riferimento (Moritz et al., 2004; Furlanello et al., 2006).

### ***Corpuscolar Hemoglobin Concentration Mean, CHCM***

Concettualmente questo parametro possiede lo stesso significato del più noto MCHC, ma invece di essere frutto di un calcolo, presenta la media della concentrazione dell'emoglobina cellulare misurata in decine di migliaia di cellule (Mast et al., 2008).

### ***Cellular Hemoglobin, CH***

È un parametro calcolato (volume cellulare × Hb cellulare, ovvero CHCM × MCV) che esprime la quantità media di Hb contenuta nelle emazie mature (Mast et al., 2008). Per l'interpretazione di questo parametro si veda il prossimo paragrafo.

### ***Cellular Hemoglobin (retic.), CHr***

Si ottiene dalla moltiplicazione del CHCMr per MCVr (Vicinanza et al., 2005). Nella normalità il CHr dovrebbe essere superiore al CH degli eritrociti maturi. In caso di modificazioni a livello dell'assetto emoglobinico il CHr si differenzia significativamente dal CH. Contrariamente al CH, il CHr si riferisce ad una popolazione di cellule (reticolociti) numericamente molto più ristretta rispetto ai globuli rossi e, soprattutto, omogenea dal punto di vista temporale: infatti i reticolociti presentano tutti la stessa età rimanendo in circolo come tali per 24-48 ore. Per tale motivo il CHr misura accuratamente la disponibilità di ferro funzionale negli ultimi 3-4 gg. (Mast et al., 2008).

La diminuzione del CHr è espressione di una forma iniziale di carenza da ferro, quindi di una scarsa emoglobinizzazione, ed acquista il significato diagnostico di inizio di anemia ferropriva e il principale vantaggio di questa informazione riguarda la precocità della diagnosi. In sintesi, si può prevedere uno stato di carenza da ferro prima ancora che compaiano i segni clinici di questa patologia (Mast et al., 2008).

In una popolazione canina il 7% presentava una diminuzione del CHr. È interessante notare che > il 70% di questi presenta almeno una alterazione ematologica associata ad carenza di ferro (anemia e/o diminuzione della sideremia e/o della saturazione della transferrina), mentre nel 25% non si evidenzia una eritropoiesi carenziale. Per questi pazienti si può ipotizzare una carenza in fase precoce. Gli Autori concludono che la prevalenza di alterazioni ematologiche (vedi prima) nel gruppo con CHr diminuito è tale che la diminuzione di questo parametro si associa ad una carenza di ferro (Steinberg & Olver, 2005). Si può concludere che il CHr rappresenta il più sensibile indicatore delle riserve marziali in ambito clinico (Steinberg & Olver, 2005) come anche confermato da un recente studio, che ha dimostrato una sensibilità del 95.9% e una specificità del 90.5% per la diagnosi di carenza di ferro nel cane (Prins et al., 2009).

È interessante notare che i principali limiti nell'utilizzo clinico del CHr in medicina umana sono stati attribuiti ad evenienze molto rare o addirittura assenti in medicina veterinaria, quali le talassemie, le anemie megaloblastiche (Doretto e Cappelletti, 2008).

#### ***Mean Cellular Volume (retic.), MCVr***

E' stato dimostrato che il volume cellulare dei reticolociti tende a diminuire, dimostrando una microcitosi reticolocitaria prima che si osservi una microcitosi a carico degli eritrociti maturi (Weiss, 2010).

#### ***Hypo%, Hypo r %***

Con questa abbreviazione (relativa ad "Hypochromic") ci si riferisce alla misurazione della proporzione dell'ipocromia negli eritrociti e nei reticolociti. Se la biodisponibilità del ferro è normale/sufficiente, tale valore, espresso in percentuale, è < al 10% (Briggs, 2009).

Per la National Kidney Foundation. %HYPO > 10% è indicatore per la presenza di un deficit funzionale di ferro. Se il valore è < 10% ma la ferritina è bassa, allora si considera la quantità di ferro corporeo sufficiente ad una corretta emoglobinizzazione, però i depositi sono impoveriti (Doretto & Cappelletti, 2008).

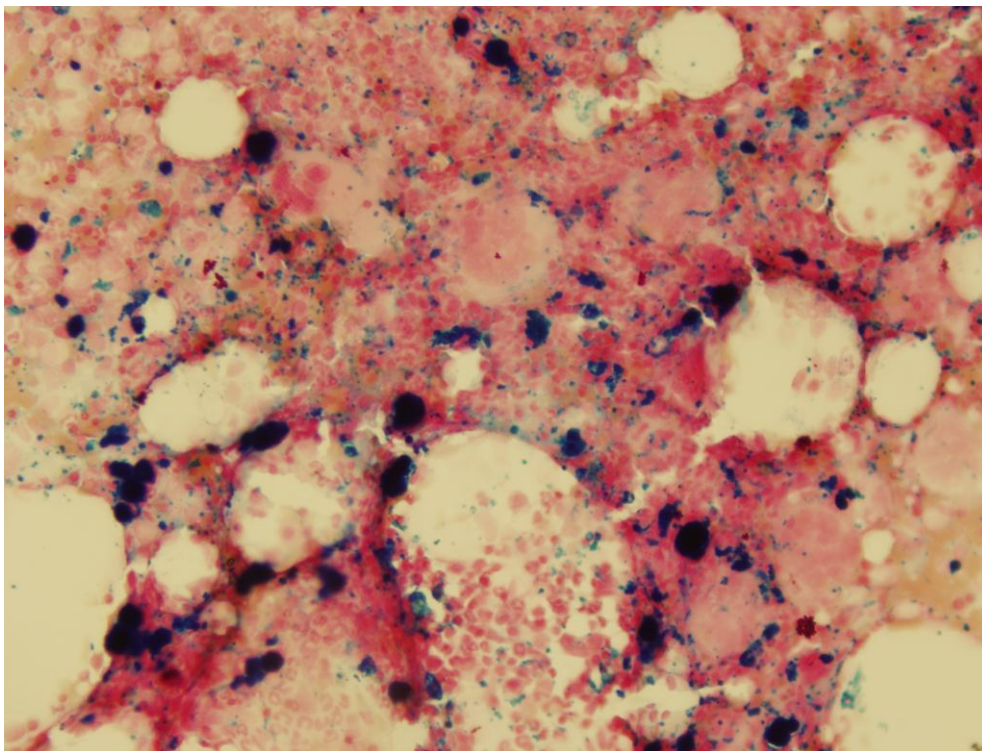
***Micro %, Micro r %***

Il sistema ADVIA fornisce la percentuale degli eritrociti e dei reticolociti microcitici. Questo parametri si è dimostrato utile in medicina umana per lo studio delle anemie carenziali e delle talassemie (Doretto & Cappelletti, 2008). In un modello sperimentale nel cane di anemia da carenza di ferro la valutazione del Micro r % non ha fornito indicazioni supplementari rispetto agli altri parametri considera (Fry & Kirk, 2006).

**Esame del midollo**

L'esame citopatologico del midollo può fornire indicazioni utili per la diagnosi di anemia carenziale: nelle forme più gravi gli eritroblasti possono essere più piccoli del normale e il citoplasma può presentare una minore basofilia (Beutler, 2010).

Più rilevanti sono le indagini dirette alla valutazione semiquantitativa del midollo dopo colorazione con Blu di Prussia. Tale tecnica permette di individuare il ferro presente nei macrofagi sia a partire da strisci midollari che da frammenti biotici (Beutler, 2010). L'emosiderina si colora all'interno dei macrofagi (Weiss, 2010) come si può osservare nella figura 5.



**Figura 5: Midollo emopoietico, colorazione di Pearls (40X)  
(per g.c. Dott.ssa Giorgia Mezzalana, Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco)**

Come regola generale, utilizzando strisci midollari, si devono esaminare solo preparati di buona qualità, che contengano almeno nove spicole midollari (Harvey, 2008b).

Anche se in passato la valutazione del ferro midollare ha rappresentato il *gold standard* per valutare le riserve marziali, vi sono rilevanti limitazioni a questo concetto, a partire dal fatto che la mancanza di ferro colorabile non implica un deficit reale e questo fenomeno è stato dimostrato nei felini (Weiss, 2010). Inoltre la stima è legata all'esperienza dell'operatore e presenta scarsa ripetibilità (Beutler, 2010).

## **Anemia da carenza di ferro**

### **Introduzione**

Il deficit di ferro (ID) è causato da un insufficiente apporto, rispetto alle richieste, di ferro all'eritrono e agli altri tessuti. In medicina umana rappresenta il più comune deficit nutrizionale nel mondo, sia nei Paesi sviluppati sia in via di sviluppo e rappresenta la principale causa di anemia. Le conseguenze si hanno non solo sul piano ematologico, talora anche gravi quali l'aumentata mortalità materna e neonatale o l'aggravamento di sottostanti patologie polmonari o cardiovascolari in conseguenza dell'ipossia, ma possono coinvolgere il sistema immunitario, endocrino, muscolare e le funzioni neurologiche (Doretto & Cappelletti, 2008). Per tale motivo alcuni Autori inseriscono l'anemia da carenza di ferro in un più ampio scenario di "*iron deficiency diseases*" (Yadav & Chandra, 2010).

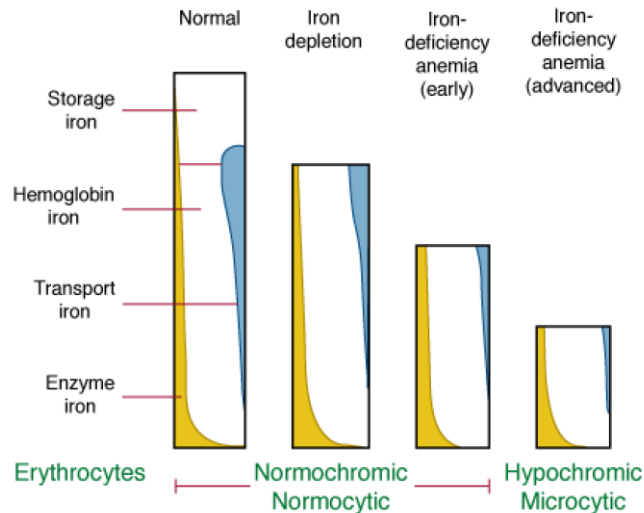
Nel cane la carenza di ferro è considerata una condizione non comune (Steinberg & Olver, 2005), mentre è considerata relativamente comune nei soggetti che vivono nelle regioni temperate dove le infestazioni parassitarie da ematofagi sono più gravi (Weiss, 2010).

### **Eziopatogenesi**

In medicina umana è causata prevalentemente da un apporto insufficiente di ferro rispetto ai fabbisogni. In medicina veterinaria il principale meccanismo è causato da emorragie del tratto gastroenterico causate da neoplasie, ulcere gastriche o endoparassiti (per esempio anchilostomi) e da massiva infestazione da pulci. In entrambi i casi la continua perdita di sangue conduce comunemente all'esaurimento delle riserve di ferro. Le altre cause di emorragia cronica, come le perdite ematiche urogenitali e le emorragie iatrogene, sono di più rara comparsa. La causa più comune della forma da carenza di ferro sintomatica nei cani esaminati per sintomi associati all'anemia, è sicuramente rappresentata da neoplasie gastroenteriche (Couto, 2008).

Il deficit di ferro si sviluppa tipicamente attraverso tre stadi sequenziali corrispondenti a livelli di gravità crescente, di cui l'anemia rappresenta solo lo stadio finale: deplezione dei

depositi (stadio I, prelatente), eritropoiesi ferro-carente (stadio II, latente o subclinico) e anemia sideropenica (IDA) (stadio III, manifesto), che sono presentati nella figura 6.



**Figura 6 Fasi progressive della carenza di ferro, da Beutler, 2010**

Nello stadio più precoce i depositi di ferro si esauriscono progressivamente (bilancio del ferro negativo), ma non ci sono effetti sulle funzioni essenziali del ferro perché è ancora sufficiente il ferro assorbito dall'intestino e quello rilasciato dall'eritrocateresi. Questa fase può essere caratterizzata da bassi livelli di ferritina sierica e di ferro (Doretto & Cappelletti, 2008; Weiss, 2010). L'evoluzione di questi e altri parametri è riassunta nella tabella 1

Analyte	Iron Deficiency	Iron-Deficient Erythropoiesis	Iron Deficiency Anemia
Bone marrow iron	Low	Low	Low
Serum ferritin	Low	Low	Low
Serum iron	Normal	Low	Low
Zinc protoporphyrin	Normal	High	High
Transferrin saturation	Normal	Low	Low
Blood hemoglobin	Normal	Normal	Low
Erythrocyte size	Normal	Normal	Low

**Tabella 1: Evoluzione dei parametri marziali nei 3 stadi di carenza di ferro, da Harvey, 2008a**

Quando i depositi sono completamente esauriti si passa al secondo stadio in cui si sviluppa un deficit di ferro con compromissione della sintesi emoglobinica e dei processi enzimatici metabolici tissutali che può portare a delle anomalie nelle funzioni fisiologiche; questa fase è caratterizzata da bassi livelli di sideremia e di saturazione della transferrina (TSAT), aumento della transferrina e della zinco protoporfirina. L'emoglobina e l'MCV sono diminuiti ma ancora nell'ambito di normalità e possono comparire nel sangue periferico delle emazie ipocromiche (Doretto & Cappelletti, 2008; Weiss, 2010).

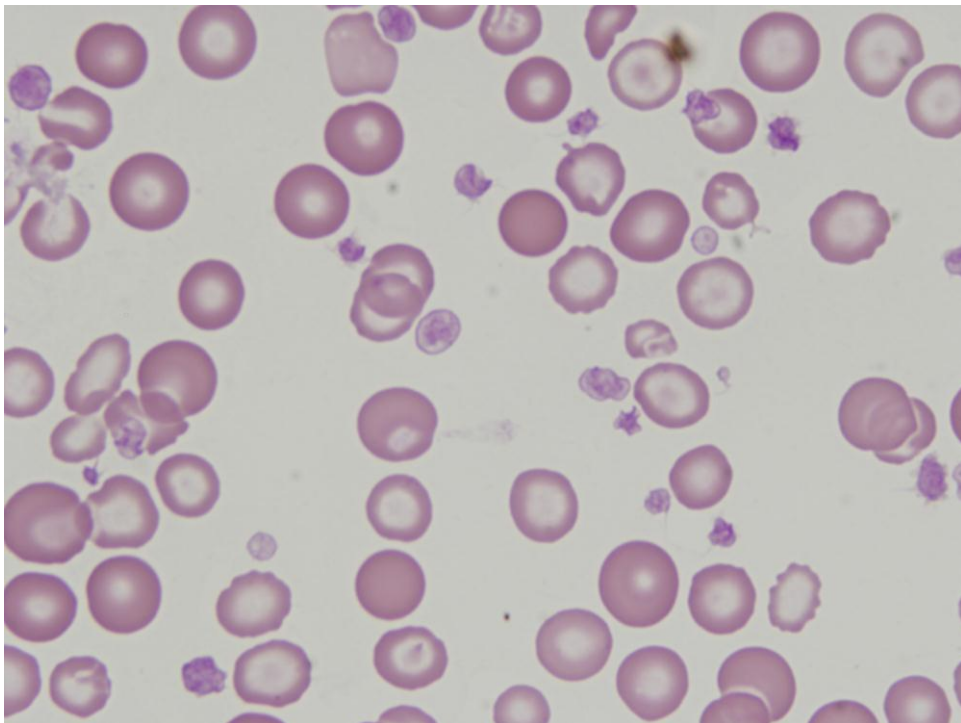
Nell'ultimo e più severo stadio, l'unico svelabile da una riduzione dell'emoglobinemia, l'apporto di ferro all'eritron è insufficiente a mantenere un'adeguata concentrazione di emoglobina, che scende sotto i valori normali, contestualmente alla diminuzione del MCV: si realizza una carenza assoluta con deplezione di ferro in tutti i distretti, che si manifesta come anemia sideropenica ipocromica microcitica, con valori di TSAT <15% e ferritina <12 µg/L. (Doretto & Cappelletti, 2008).

La microcitosi si verifica perché l'incapacità di incorporare adeguate quantità di ferro nell'eme comporta una inibizione alla maturazione eritrocitaria, portando ad una anemia microcitica ipocromica (Wrighting & Andrews, 2008). In particolare qualsiasi anomalia nell'eme o nella sintesi della globina determina un ritardo nel segnale di stop alla divisione cellulare, perché si presume che esista un valore critico di Hb cellulare che quando raggiunto determina uno stimolo di feedback che inibisce ulteriori divisioni mitotiche (Stenberg & Olver, 2005). Ciò comporta una o più divisioni cellulari extra durante la formazione della cellula eritroide, che risulterà microcitica (Harvey, 2008; Schaefer, 2009; Weiss, 2010). Secondo altri la microcitosi risulta da una difettosa emoglobinizzazione del citoplasma e considerando che l'Hb rappresenta la maggior parte del citoplasma stesso si può prevedere un'emazia di dimensioni minori e con forma anormale, ovale, ellittica o "*pencil-shaped*" (Beck, 2009).

## Diagnosi di laboratorio

### *Parametri ematologici*

Nei carnivori domestici la patogenesi dell'anemia è mista (emorragia, minore eritropoiesi e accorciamento dell'emivita eritroide) e ciò si riflette anche sulle caratteristiche ematologiche (figura 7). In linea generale la microcitosi si realizza dopo settimane o mesi di persistente carenza e tale reperto compare prima di una diminuzione del MCHC. L'anisocitosi valutata strumentalmente (RDW) solitamente è aumentata per la concomitante presenza di normociti e microciti (Weiss, 2010). È possibile individuare l'ipocromasia prima della diminuzione del MCHC (Schaefer, 2009).



**Figura 7: Striscio ematico di cane affetto da anemia da carenza di ferro (per g.c. Dott.ssa Silvia Tasca, Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco)**

Per quanto riguarda la progressione dell'anemia, in uno studio sperimentale nel cane si è notato che prima si manifesta la microcitosi reticolocitaria e successivamente la diminuzione del contenuto emoglobinico. In altri termini già al 7° giorno dopo l'induzione

della carenza di ferro l'MCVr si manifesta significativamente diminuito rispetto ai valori iniziali, mentre il CHr presenta una diminuzione significativa al 28° giorno. Tale tendenza si manifesta anche con i parametri correlati (Fry & Kirk, 2006).

### ***Parametri biochimici***

L'anemia si presenta rigenerativa nelle fasi iniziali, a causa della frequente associazione con sanguinamenti cronici. La rigenerazione tende a diminuire e a rendersi inadeguata negli stadi successivi (Weiss, 2010).

L'analisi dei parametri reticolocitari, come riportato in precedenza, permette una valutazione più accurata delle riserve marziali e dell'attività emopoietica (Weiss, 2010).

Per quanto riguarda i parametri biochimici e la loro evoluzione nella progressione della carenza di ferro si veda la tabella 1.

## **Anemia da infiammazione**

### **Introduzione**

La più comune forma di anemia negli animali (Waner & Harrus, 2000; Feldman, 2005; Ottenjann et al., 2006; Rebar, 2009; Schaefer, 2009) e la seconda in medicina umana, dopo le forme da carenza di ferro (Weiss & Goodnough, 2005) è associata alla presenza di uno stato infiammatorio sistemico. In medicina umana l'incidenza dell'anemia in pazienti affetti da infezioni, neoplasie e malattie auto-immuni può arrivare al 95%, con rilevanti effetti negativi sulla qualità della vita, risposta alle terapie, morbidità e mortalità (Weiss, 2009).

Già 60 anni fa era stata notata la diminuzione della sideremia nei primi giorni che seguono un'infiammazione acuta (Ganz & Nemeth, 2009); ancor prima era stata segnalata una condizione di anemia in malattie quali la febbre tifoide e il vaiolo (Miconi, 2007). Con il passare degli anni è stata indagata e delineata l'associazione tra un'attivazione cronica del sistema immunitario e la presenza di anemia (Weiss & Goodnough, 2005). La riduzione della biodisponibilità del ferro, sia circolante (diminuzione della sideremia) che di deposito, con sequestro nei macrofagi, che è alla base dell'anemia da infiammazione, deriva da un meccanismo protettivo elaborato dall'immunità innata, al fine di sottrarre il ferro ai batteri, per i quali risulta indispensabile per una crescita ottimale (Ganz, 2009).

La presentazione più studiata è quella che compare dopo 1-2 mesi dall'inizio di una malattia infettiva, infiammatoria o neoplastica. Il concetto di cronicità ha portato alla denominazione, ad oggi ampiamente utilizzata di *Anemia of Chronic Disease (ACD)*. Tale terminologia è stata successivamente discussa perché nella patogenesi il ruolo primario è dato dallo stato infiammatorio, mentre la cronicità non è un costante e fondamentale (Means, 2009), considerando che, ad esempio, nel gatto questa anemia compare entro 5-10 giorni dall'iniezione di trementina nel sottocute (Mahaffey & Smith, 1978), con una riduzione dell'ematocrito del 8% già dopo 2-3 dall'induzione della flogosi in un'altra sperimentazione (Weiss & Krehbiell, 1983). In questo capitolo si preferisce utilizzare il

termine di Anemia da Infiammazione (AI), adottato anche nella più recente review in medicina veterinaria (Fry, 2010); una lista dei termini impiegati nell'ultimo decennio, da considerare come sinonimi, è riportata nella Tabella 2.

### ***Denominazioni***

***Anemia of Chronic Diseases***

***Anemia of Inflammation***

***Cytokine-mediated Anemia***

***Anemia of Defective Iron Reutilization***

***Hypoferremic Anemia with Reticuloendothelial Siderosis***

***Thesauric Hypoferremic Anemia***

**Tabella 2: Sinonimi per la denominazione della sindrome anemia in corso di stato infiammatorio (compilata dal testo di Means, 2009).**

Con il passare degli anni si è così delineata la forte associazione tra una condizione di anemia e uno stato non tanto infettivo quanto infiammatorio. Infatti si è notato che patologie croniche, che in comune hanno una componente infiammatoria, sono molto spesso complicate da una anemia non rigenerativa, che può arrivare ad interessare una elevata percentuale di pazienti (fino al 95%) affetti da. Le categorie di patologie che si associano ad una condizione di anemia, non rigenerativa, da lieve a moderata, ad es. con emoglobina ematica compresa tra 7 e 12 gr/dL (Ganz & Nemeth, 2009), si è successivamente estesa agli stati neoplastici (Tilman Steinmetz et al., 2010), alle patologie gastro-enteriche (Gomollòn & Gisbert, 2009), epatiche (Means, 2009), alle cardiopatie croniche con insufficienza (O'Meara & de Denuis, 2010) fino all'età geriatrica (Price & Schrier, 2010). Anche la comune anemia presente nelle insufficienze renali croniche presenta caratteristiche simili a quelle riportate in altre condizioni, ovvero non è legata esclusivamente ad una carenza di eritropoietina, ma risente anche del negativo impatto sull'eritropoiesi di un concomitante stato infiammatorio (Lankhorst & Wish, 2010).

In medicina veterinaria la presenza di una condizione di anemia in pazienti affetti da uno stato infiammatorio è stata descritta principalmente in ambito sperimentale, a partire dalla sperimentazione di Cartwright et al. (1946), nella quale l'infiammazione veniva creata tramite l'inoculazione di una coltura di *S. aureus*. Avendo successivamente osservato la comparsa di anemia, gli Autori utilizzavano così il termine di Anemia da Infezione. In seguito venivano realizzati altri studi nei quali l'anemia originava da un'infiammazione creata sterilmente grazie all'inoculazione di sottocutanea di trementina (Yuile et al., 1953). Grazie a questo studio ed altre prove sperimentali, realizzate con infiammazioni sterili ed eseguite su cani (Feldman et al., 1981a; Feldman et al., 1981b) e gatti (Weiss & Krehbiel, 1983; Weiss et al., 1983) si poteva definire la presenza di una Anemia da Infiammazione, come parte essenziale di una risposta infiammatoria acuta. Nei trent'anni successivi l'anemia da infiammazione è entrata a far parte della letteratura veterinaria, ma sono mancati valutazioni sulla prevalenza della condizione in ambito clinico e sulle caratteristiche ematologiche al di fuori dell'ambito sperimentale. Un'eccezione si può trovare in uno studio nei gatti eseguito da Ottenjann et al. (2006), dove venivano indagati 21 soggetti affetti da ascessi o piotorace o steatonecrosi. Maggior interesse ha riscosso l'associazione tra anemia e stati neoplastici, che è stata dimostrata nell'emangiosarcoma, nelle leucemie, nei linfomi e nel mieloma multiplo (Abbo & Lucroy, 2007; Miller et al, 2009). E' degno di interesse considerare che anche l'anemia che compare negli stati neoplastici presenta un meccanismo patogenetico sovrapponibile a quello dell'anemia da infiammazione (Steinmetz et al., 2010).

### **Eziopatogenesi**

Si è potuto entrare correttamente nella patogenesi della AI solo dopo aver individuato e dettagliato il ruolo della risposta infiammatoria innata, che si basa primariamente sul rilascio di tre citokine infiammatorie: interleukina 1 (IL-1), interleukina 6 (IL-6) e il tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF-  $\alpha$ ) e sul rilascio di ormoni catabolici quali le catecolamine e i glucocorticoidi. Clinicamente la risposta si manifesta con infiammazione, anoressia,

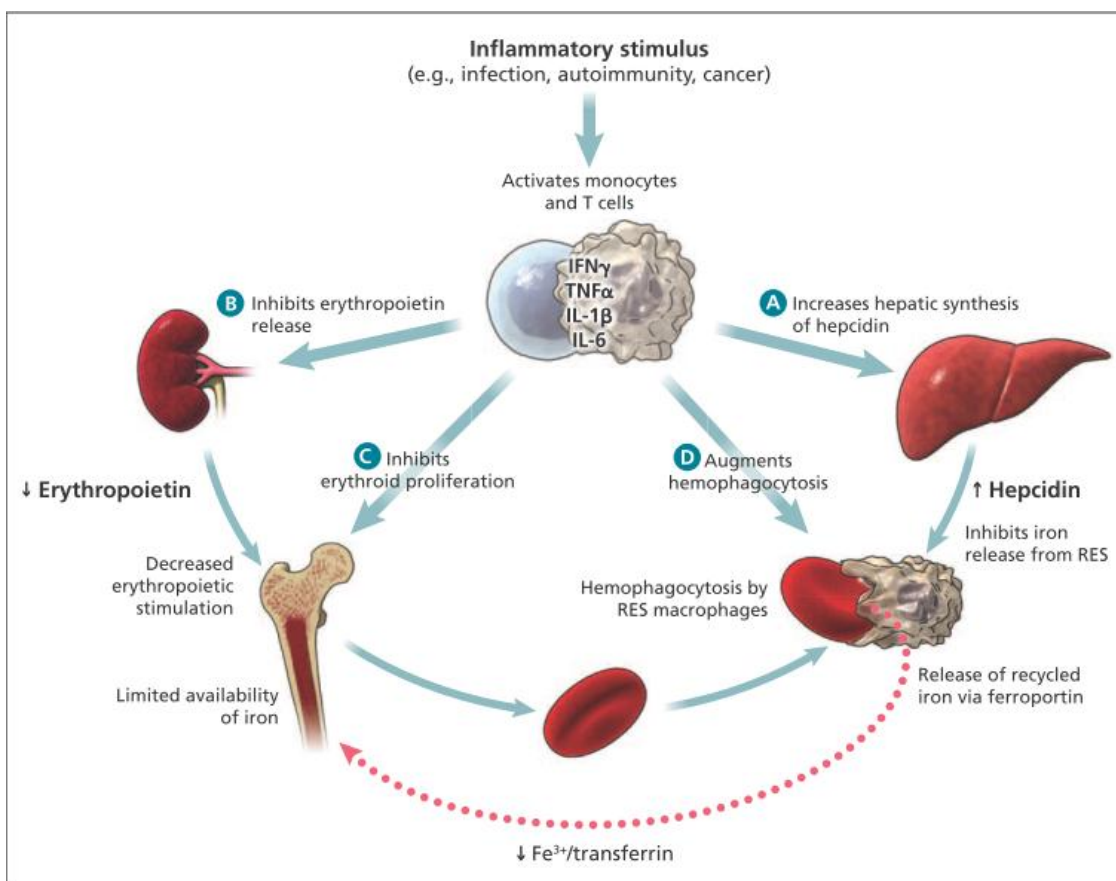
immobilità e aumento della permeabilità vascolare, edema tissutale, vasodilatazione, tachicardia ed aumento della gittata cardiaca. Da un punto di vista metabolico si genera una risposta “iperdinamica”, con aumentato turn-over delle proteine, dei lipidi e del glucosio. Il complesso di queste modificazioni, porta ad un decadimento della struttura muscolare, della sintesi di capelli, cute ed unghie, enterociti, emazie, ossa ed altre strutture (Soeters & Grimble, 2009). L’AI è quindi una manifestazione della risposta sistemica ad uno stress infiammatorio o immunologico, finalizzata a sottrarre il ferro ai patogeni (Means, 2009). Secondo alcuni Autori la complessità di questa risposta e la sua presenza in tutte le specie animali obbliga a considerarla un fenomeno protettivo (Zarychanski & Houston, 2008). Secondo altri, al contrario, l’anemia, che ad esempio si manifesta negli stati neoplastici, si correla con un peggioramento della qualità della vita (Ludwig, 2008).

Nella tabella 3 è riportata una sintesi degli effetti ematologici relativi ai principali mediatori dell’infiammazione.

<i>Mediatore</i>	<i>Rilasciato da</i>	<i>Effetti</i>
<b><i>Interleukina-1</i></b>	Macrofagi attivati	Stimola la produzione di ferritina, spostando il ferro da circolo alle cellule Inibisce la risposta alla eritropoietina (EPO) Inibisce la formazione e la secrezione di EPO
<b><i>Interleukina-6</i></b>	Macrofagi attivati	Stimola la produzione di ferritina, spostando il ferro da circolo alle cellule
<b><i>Tumor Necrosis <math>\alpha</math></i></b>	Macrofagi attivati	Stimola la produzione di ferritina, spostando il ferro da circolo alle cellule Inibisce la risposta alla eritropoietina (EPO) Inibisce la formazione e la secrezione di EPO
<b><i>Interferone</i></b>	Interleukina-1	Inibizione alla produzione di reticolociti nel midollo Inibisce la risposta alla eritropoietina (EPO)

**Tabella 3: Attività dei mediatori dell’infiammazione nei confronti dell’ematopoiesi (da Hassan, 2008)**

La sommatoria degli effetti dei mediatori dell’infiammazione è schematicamente rappresentata nella figura 8.



**Figura 8: Principali meccanismi fisiopatologici per l'induzione della AI (da Zarychanski & Houston, 2009).**

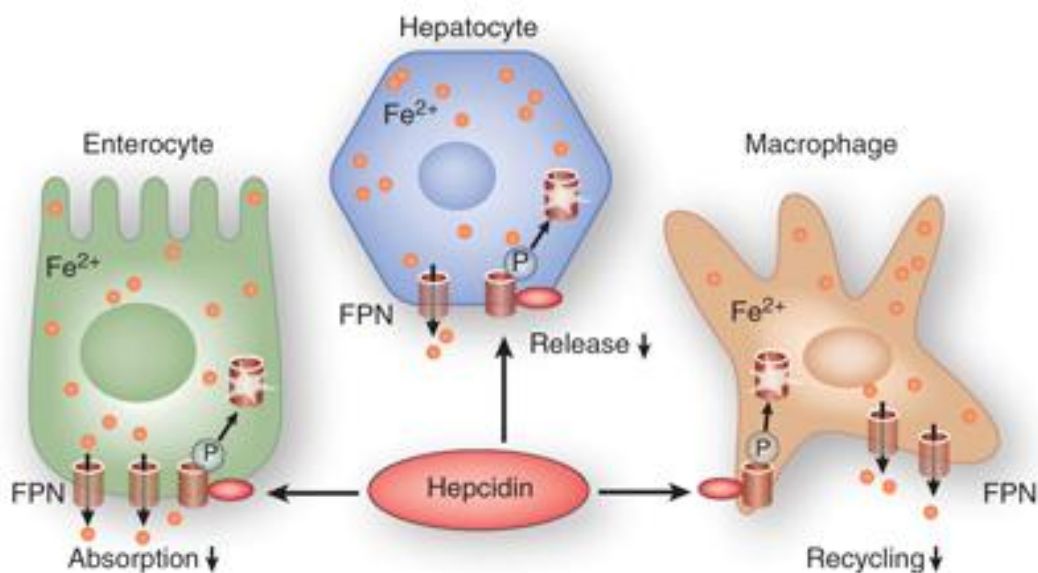
I tre principali meccanismi fisiopatologici, ai quali saranno destinati i prossimi paragrafi sono (Ganz & Nemeth, 2009; Raj, 2009; Weiss, 2009; Means, 2009):

1. Omeostasi del ferro patologica, secondaria principalmente alla secrezione di epcidina
2. Inibizione all'eritropoesi
3. Inibita risposta alla EPO

Ai tre meccanismi prima elencati si aggiunge un accorciamento dell'emivita eritrocitaria (Sihler & Napolitano, 2008; Price & Schrier, 2010) e un meno definito, ma importante effetto di espansione del volume plasmatico che può portare ad una rapida diminuzione dell'ematocrito, osservabile sperimentalmente con la somministrazione di concentrati di IL-6 a pazienti umani (van Gameren et al., 1994; Means, 2009).

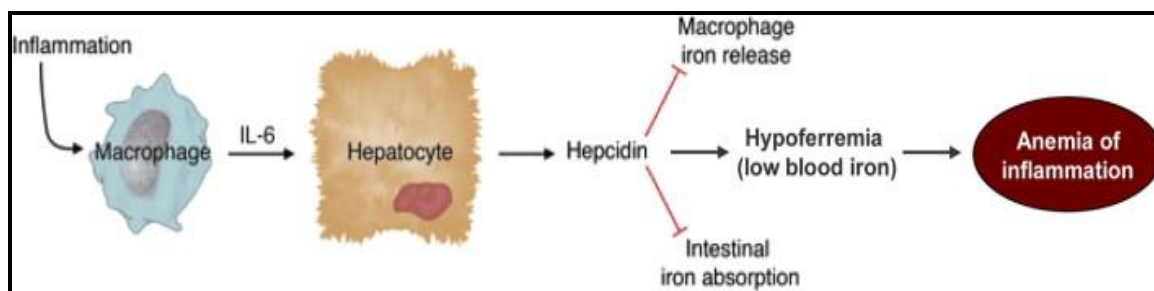
### ***Omeostasi del ferro patologica e ruolo dell'epcidina***

Precedentemente è stata dettagliata l'attività biologica dell'epcidina e gli stimoli che portano alla sua secrezione epatica ed è anche presentata in figura 9.



**Figura 9: Effetti dell'epcidina sul metabolismo del ferro. La ferroportina (FPN) è espressa sulla superficie degli enterociti, epatociti e macrofagi tissutali e il legame con l'epcidina ne inibisce l'attività, con conseguente (da destra a sinistra) minore assorbimento intestinale del ferro, minore rilascio del ferro dal fegato e inibizione al ricircolo del ferro contenuto nei macrofagi (da Cui Y et al., 2009).**

L'epcidina ha un ruolo primario nella induzione della AI (Handelman & Levin, 2008; Viatte & Valulont, 2009; Fry, 2010) e la secrezione epatica e macrofagica è proporzionale alla liberazione di IL-6 e alla presenza di lipopolisaccaridi, con IL-6 come principale mediatore (Wrighting & Andrews, 2008). Ad esempio si è notato che la somministrazione a pazienti oncologici di IL-6 ricombinante umana genera un'anemia a rapida insorgenza, dose-dipendente e progressiva (van Gameren et al., 1994). Il legame tra IL-6 ed epcidina è anche rappresentato nella figura 10.



**Figura 10: Ruolo dell'epcidina e di IL-6 nello sviluppo dell'anemia da infiammazione (da Raj, 2009).**

In breve, l'epcidina è un ormone peptidico prodotto dagli epatociti, che agisce da mediatore tra il sistema immunitario e il metabolismo del ferro. La secrezione di epcidina agisce sull'assorbimento del ferro nell'intestino, la mobilizzazione del ferro dai depositi epatici e il riciclo del ferro macrofagico. L'epcidina determina una diminuzione della ferroportina di membrana e in tal modo il ferro rimane confinato all'interno degli enterociti, dei macrofagi e degli epatociti (Raj, 2008). Il ferro quindi non è più biodisponibile e ciò interferisce con la crescita batterica (infezione) che potrebbe essere alla base dell'infiammazione (Ganz, 2009). La persistenza del processo invece conduce all'anemia, in quanto la mancata biodisponibilità di ferro va a mimare una carenza di ferro corporeo (Raj, 2009).

Il mancato riciclo del ferro, secondario all'attività dell'epcidina sui macrofagi, rappresenta il principale meccanismo patogenetico dell'anemia da infiammazione (Camaschella & Prati, 2010).

### ***Inibizione dell'eritropoiesi***

Le citokine infiammatorie esercitano un'azione inibente sul midollo emopoietico. La citokina più studiata è stata il TNF, prodotto dai macrofagi attivati ed è stata dimostrata in vitro la sua attività inibente nei confronti delle colonie eritroidi. L'EPO, a dosaggi più alti rispetto a quelli prodotti fisiologicamente, è solo parzialmente in grado di contrastare tale effetto (Adamson, 2008). Il TNF è comunque solamente una delle citokine espresse nell'ambito della risposta infiammatoria ai danni tissutali. È probabile che altre citokine,

espresse sia in ambito sistemico che locale (midollo emopoietico) possano interferire con l'eritropoiesi e generare una minore sensibilità alla EPO (Adamson, 2008).

È inoltre descritta una importante resistenza all'EPO da parte dei precursori eritroidi, con meccanismi ancora non ben chiariti. La resistenza all'EPO può aumentare fino all'80% in caso di infiammazione ed è interessante notare che tale incremento è direttamente proporzionale ai livelli sierici di proteina C reattiva (El-Khatib et al, 2006).

### ***Minore produzione di EPO***

I livelli di EPO non sono mai proporzionati al grado di anemia quando avviene un'attivazione della risposta infiammatorio. Questo fenomeno è stato osservato in particolare nell'anemia associata a stati oncologici (Adamson, 2008) ed inoltre è stato dimostrato nel gatto in modelli sperimentali di infiammazione (Weiss et al., 1983).

### ***Riduzione dell'emivita eritrocitaria***

È documentato che l'infiammazione possa causare un aumento della eritrofagocitosi. I meccanismi proposti considerano un danno membranario causato da TNF. Ciò si nota ad esempio nella malaria, dove i livelli di TNF sono molto elevati, oppure uno stress ossidativo con conseguente perossidazione dei lipidi di membrana (Sihler & Napolitano, 2008).

In modelli sperimentali di infiammazione, nel gatto, la diminuzione dell'emivita eritrocitaria rappresenta il principale meccanismo di anemia (Weiss & Krehbiel, 1983). Inoltre, anche se non tutti i pazienti con anemia da infiammazione sono febbrili, si deve considerare che la febbre di per sé si associa ad una riduzione dei tempi di sopravvivenza degli eritrocitici maturi (Feldman, 2005).

### **Diagnosi di laboratorio**

In linea generale la AI è caratterizzata dalla presenza di una anemia normocitica o microcitica, con sideremia diminuita e ferro midollare conservato (Raj, 2008). Bisogna però considerare che la patologia che è alla base del rilascio di citokine spesso determina anche fenomeni anemizzanti, quali ad es. emorragie croniche o acute, carenze nutrizionali,

insufficiente produzione di EPO ed altri. Per tale motivo il quadro ematologico presenta ampie variazioni individuali (Adamson, 2008).

Prevalenza e gravità dell'anemia sono legate proporzionalmente allo stadio della malattia (Weiss, 2008), ovvero alla gravità della patologia sottostante. Più gravi sono i sintomi (ad es. febbre, tremori e suppurazione) e maggiore sarà la gravità dell'anemia (Means, 2009). Un altro esempio è dato dall'artrite reumatoide, che rappresenta un modello spontaneo di anemia da infiammazione: esiste una correlazione tra gravità dell'anemia e quella dell'artrite, valutata tramite febbre, estensione delle tumefazioni articolari e dell'infiammazione (Means, 2009).

### ***Parametri ematologici***

Nella patogenesi dell'anemia la mancata biodisponibilità di ferro svolge un ruolo fondamentale. Pertanto il quadro ematologico sarà sovrapponibile a quello della carenza di ferro (Beck, 2009).

L'anemia solitamente è normocitica e normocromica (Fry, 2010), da lieve a moderata, non rigenerativa (Schaefer, 2009). Con il progredire della carenza funzionale di ferro si presenta prima l'ipocromia e poi la microcitosi, all'opposto di quanto avviene con la carenza di ferro assoluta (Means, 2009). La microcitosi compare nel 20-40% dei pazienti umani. L'ipocromia si osserva nel 23-50% in infezioni croniche, 50-100% delle artriti reumatoidi e nel 44-64% dei pazienti neoplastici. In generale è presente nel 40-70% delle AI (Means, 2009).

Il CHr è risultato simile alla norma in una popolazione di 32 esseri umani affetti da AI, mentre risultava significativamente diminuito in caso di carenza di ferro. Di conseguenza il CHr e il sTfR (che risulta aumentato nella carenza di ferro) sono risultati due parametri utili per distinguere tra la l'anemia da carenza di ferro e l'anemia infiammatoria (Markovic et al., 2007).

Non è noto il pattern di CHr e MCVr in medicina veterinaria nell'ambito dell'anemia da infiammazione (Prins et al., 2009).

### ***Parametri biochimici***

La sideremia è diminuita, mentre la ferritinemia varia da normale ad aumentata (Schaefer, 2009).

La transferrina è normale o diminuita, con saturazione diminuita. Il recettore solubile della transferrina è nella norma (Miconi, 2007).

### **La risposta di fase acuta: definizioni e monitoraggio**

#### ***Fisiopatologia della risposta di fase acuta***

La risposta della fase acuta descrive l'insieme dei processi aspecifici, fisiologici e biochimici in contrapposizione ad un'inflammatione (di origine infettiva o immuno-mediata) o ad un danno tissutale (trauma, chirurgia, neoplasie). Tale risposta è codificata dal sistema immunitario innato (Cray et al., 2009). Lo scopo di questa complessa reazione sistemica è di ristabilire l'omeostasi e di promuovere la guarigione

I primi segnali provengono dai tessuti danneggiati, dai quali partono degli stimoli, ad esempio peptidi bioattivi prodotti dai neuroni in risposta al dolore, oppure da proteine intracellulari provenienti dalle cellule danneggiate, che stimolano la produzione di molecole (citokine) in grado di trasdurre un segnale dall'esterno della cellula all'interno della stessa, tramite recettori (Eklund, 2009).

Come indicato nella figura 11, il sistema immunitario innato è in grado di inizializzare la produzione di proteine della fase acuta (APP) grazie alla liberazione di citokine e chemokine da parte di cellule attivate quali monociti, macrofagi, fibroblasti, cellule endoteliali, piastrine, cheratinociti e cellule T. I segnali pro-infiammatori prodotti comprendono Interleukina 1 (IL-1), Tumor Necrosis Factor alfa (TNF-alfa) e Interleukina 6 (IL-6) e agiscono a vari livelli in tutto l'organismo, inducendo anche la produzione delle APP (Cray et al., 2009).

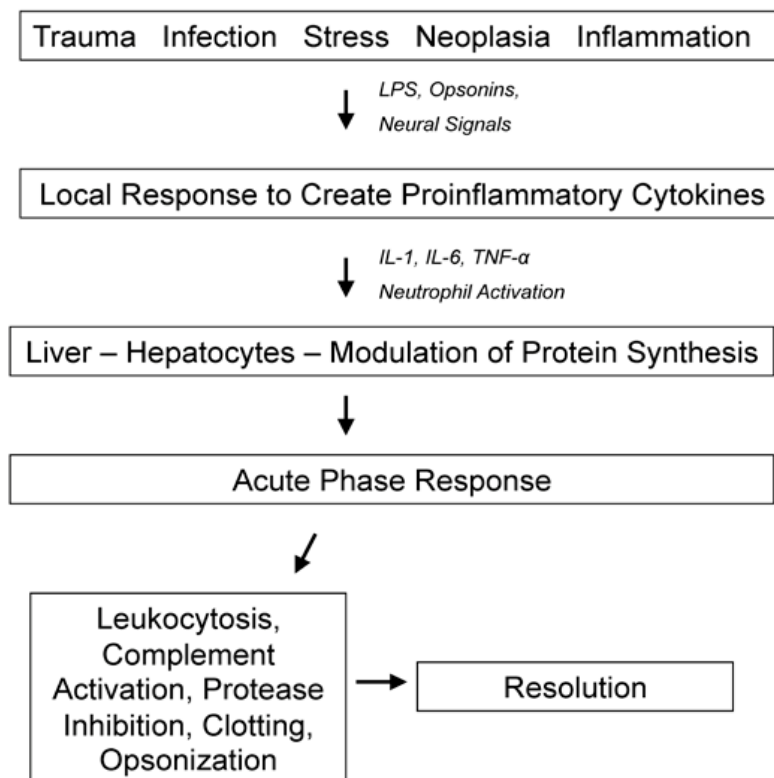


Figura 10: Reazione immune innata: la risposta di fase acuta (da Cray et al., 2009)

### ***Generalità sulle proteine di fase acuta***

La risposta del paziente quindi riguarda la up-regolazione di numerose proteine (oltre 200) prevalentemente di origine epatica, grazie alla liberazione di citokine da parte del sito patologico. In altri termini, in caso di danni tissutali e/o infiammazioni il sistema immunitario produce una “risposta della fase acuta”, modificando la concentrazione plasmatica di alcune proteine, chiamate “proteine della fase acuta” [*Acute Phase Proteins, APPs*] (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011). Le proteine della fase acuta possono essere utilizzare come biomarkers per valutare la risposta immunitaria primaria sistemica ad infezioni, infiammazioni e traumi (Eckersall & Bell, 2010).

Le APPs sono differenziabili in maggiori, moderate e minori utilizzando i parametri presentati nella tabella 4. Si deve notare che nelle varie specie animali esistono differenti pattern di secrezione delle APPs.

	<b>Maggiore</b>	<b>Moderata</b>	<b>Minore</b>
<b>Velocità di Incremento</b>	Rapida (entro 4-5h)	Meno rapida (entro 8-10h)	ND
<b>Concentrazione basale</b>	< 1 mcg/L	ND	ND
<b>Entità dell'incremento</b>	10-100	2-10. più spesso 2-3 volte	Aumentano del 50-100% rispetto al valore basale
<b>Picco e cinetica</b>	24-48h, con declino rapido nella fase di guarigione Emivita breve (ore)	2-3 gg., con decremento più lento rispetto ad una maggiore	ND
<b>Cane</b>	SAA, CRP	Hpt, FI	
<b>Gatto</b>	SAA, AGP**	Hpt, FI	
<b>Cavallo</b>	SAA	Hp, AGP, PCR	

**Tabella 4: Classificazione delle APPs, compilata in base a Ceron et al., 2008, Crisman et al., 2008, Eckersall & Bell, 2010. SAA: amiloide sierica, CRP: proteina C reattiva, AGP: alfglicoproteina acida, Hp: aptoglobina, FI: fibrinogeno**

L'utilità delle APPs in medicina canina è tale che ne viene consigliata in ambito clinico la misurazione routinaria, come parte integrante di ogni esame emocromocitometrico o profilo biochimico. Per incrementare il valore diagnostico e prognostico delle APPs si suggerisce di analizzare contemporaneamente almeno una APP positiva maggiore ed una moderata. Un esempio nel cane può essere rappresentato dalla CRP e dalla aptoglobulina [Haptoglobin, Hp] (Ceron et al., 2008). In questa introduzione verranno brevemente presentate queste due APPs.

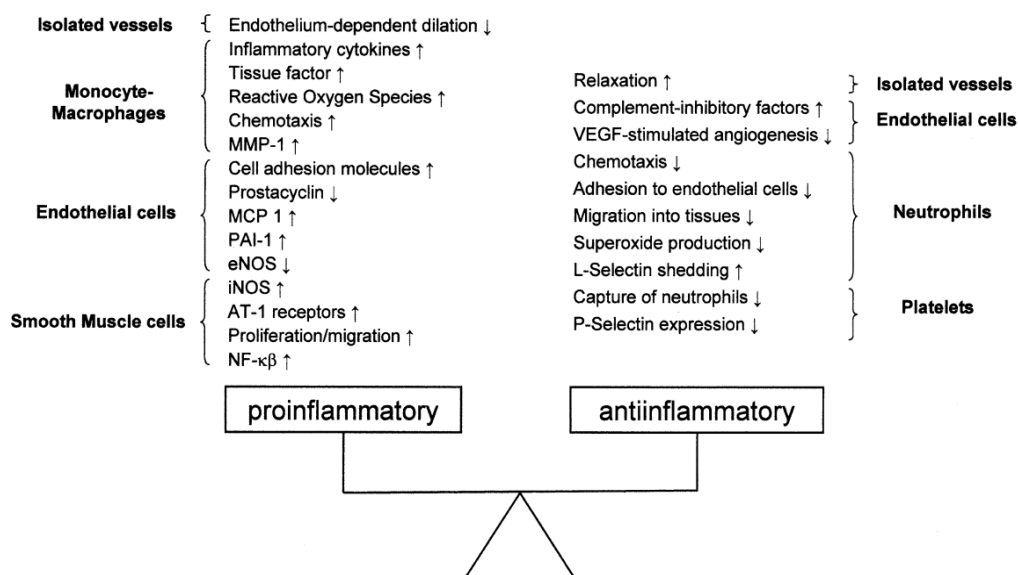
### ***Proteina C Reattiva, CRP***

La proteina C Reattiva (C-Reactive Protein, CRP) è stata la prima tra le APP ad essere descritta (Cray et al., 2009). E' una proteina che appartiene alla famiglia delle pentraxine, prodotta principalmente dal fegato ma anche da altre cellule (Eklund, 2009), presente anche in condizioni normali nel plasma. Oltre alla produzione epatica, viene descritta una liberazione da parte delle placche aterosclerotiche, da tessuto vascolare linfociti e monociti (Kop & Weinstein, 2007) . In particolare nelle placche la produzione avviene da parte delle cellule endoteliali, della muscolatura liscia e dai macrofagi. Inoltre viene prodotta da reni,

neuroni, macrofagi alveolari e tessuto adiposo (Jalal & Devaraj, 2009) . In conclusione, le sedi extraepatiche sono epitelio della ghiandola mammaria, condro e sinoviociti articolari, tessuto polmonare, intestino, adipociti, endometrio, leucociti e reni (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011)

Dal punto di vista strutturale, questa proteina altamente conservata nelle differenti specie si presenta come un disco ciclico composto di 5 identiche sub-unità glicosilate. Il PM è di 120 kD (Kop & Weinstein, 2007).

La funzione della CRP è di opsonizzare frammenti e polisaccaridi batterici, fungini e parassitari, stimolando in tal modo l'attivazione del complemento e la fagocitosi. E' anche in grado di modulare la produzione delle citokine e la chemotassi (Cray et al., 2009). Inoltre è segnalata l'interazione della proteina con le fosfolipine che emergono dalle membrane cellulari danneggiate ed apoptotiche. In tal modo la PCR facilita la clearance di molecole potenzialmente in grado di stimolare l'autoimmunità (Eklund, 2009). Come prima indicato, la principale funzione è di legarsi, con un processo calcio-dipendente, a numerosi micro-organismi che contengono fosforilcolina nelle loro membrane. Il legame che si forma è in grado di attivare il complemento, con deposizione di C3b, che rende opsonizzato l'agente infettivo (Delves, 2006). Un elenco più esteso delle attività pro-infiammatorie o anti-infiammatorie è riassunto nella figura 12.



**Figura 11: Potenziali attività della CRP su mononucleati, granulociti neutrofilici ed altri target (da Schwedler et al., 2006).**

La secrezione è indotta principalmente da tre citokine: Interleukina 1 (IL-1), Interleukina 6 (IL-6) [vedi altro file] e Interleukina 17 (IL-17), che è stata definita in tempi più recenti (Eklund, 2009). IL-6 è comunque il principale stimolo (Schwedler et al., 2006; Kop & Weinstein, 2007) sia in medicina umana che canina (Kjelgaard-Hansen, 2010). Le stesse citokine inducono la produzione di CRP sia in condizioni di infiammazione acuta che cronica (Eklund, 2009). Dopo stimolazione citokinica, negli esseri umani le concentrazioni plasmatiche aumentano di 100-1000 volte entro 24-72h; l'emivita è di 19h, sia in condizioni fisiologiche che patologiche (Schwedler et al., 2006). Nel cane l'incremento si osserva già entro 4h dallo stimolo infiammatorio e il picco si osserva approssimativamente dopo 24, con un rapido decremento dopo l'esaurimento dello stimolo infiammatorio. In ambito clinico si è notato infatti che la CRP tipicamente diminuisce entro 24 ore dall'inizio di una terapia anti-infiammatoria efficace (Kjelgaard-Hansen, 2010).

La CRP può essere misurata con varie metodiche quali RIA, immunonefelometria, immunoturbidometria, immunoluminometria ed ELISA (Kop & Weinstein, 2007; Klenner et al., 2010). Recentemente sono stati realizzati delle metodiche ad alta sensibilità, che permettano di utilizzare un valore limite inferiore di 0.3 mg ed una imprecisione minore

del 10% a concentrazioni inferiori a 1.0 mg/L (Kop & Weinstein, 2007). Il valore normale in medicina umana è di 0.3-1.7 mg/L (Bolahyrli et al., 2007) .

Per quanto riguarda la medicina canina è stato realizzato un test ELISA validato (Tridelta Phase range canine CRP kit®, Tridelta Development Ltd., Brey, Ireland) e un test immunoturbimetrico ampiamente utilizzato in medicina umana per la misurazione della CRP umana (CRP OSR 6147 Olympus Life and Material Science Europe GmbH, Lismeehan, O'Callaghan's Mills, Ireland), che si è dimostrato correlarsi bene ( $r = 0.98$ ) con il test ELISA specifico. Come standard viene utilizzato un pool di plasma canino ad elevate concentrazioni di CRP, con misurazione determinata con il test ELISA. Il test immunoturbidimetrico è stato utilizzato in altri lavori sperimentali pubblicati (Caldin et al., 2009). Precedentemente era stato individuato un test policlonale per la CRP (Kjelgaard-Hansen & Stine, 2011).

La CRP viene comunemente utilizzata in ambito medico come marker non specifico di infiammazione. Viene impiegata per la diagnosi e il follow-up di numerose patologie quali malattie infiammatorie sistemiche, neoplasie e patologie cardiovascolari. Misurazioni seriali permettono di riconoscere tra le concentrazioni sieriche di CRP e la gravità della patologia e la sua risposta ad un trattamento. La persistenza di valori elevati di CRP indicano la presenza di un'infezione incontrollata, oppure di un processo patologico non risolto (Bolahyrli et al., 2007). Vi sono anche esperienze sia in medicina umana che veterinaria riguardanti la misurazione della CRP secreta localmente, come marker regionale di attività infiammatoria (Kjelgaard-Hansen & Stine, 2011), ad esempio nel liquido cefalo-rachidiano (Martinez-Subiela et al., 2011).

In conclusione in medicina canina la CRP viene utilizzata da oltre trent'anni e viene considerata utile nella pratica clinica routinaria tanto quanto avviene nella medicina umana e si conferma un marker quantitativo di infiammazione e si correla con altri indici di malattia (Kjelgaard-Hansen, 2010).

L'utilità della CRP nella pratica clinica si può così riassumere (Kjelgaard-Hansen, 2010):

- componente di un panel di base, che aiuta ad individuare già alla prima visita la presenza di una infiammazione
- monitoraggio della malattia durante e dopo la terapia

### ***Aptoglobina, Hp, HPT***

L'aptoglobina è una proteina della fase acuta positiva, classificata nel cane come moderata. E' stato documentato un aumento in caso di traumi chirurgici, leishmaniosi, tripanosomiasi ed altre condizioni infiammatorie. Inoltre è presente una correlazione diretta con la presenza di corticosteroidi endogeni ed esogeni (Eckersall & Bell, 2010) e il suo incremento, associato ad una diminuzione della CRP, appartenente ad un recentemente descritto pattern ipercortisolemico del cane (Caldin et al., 2009).

## Parte Seconda

### Introduzione

Come riportato nella prima parte, l'associazione nel cane tra differenti stati infiammatori, sia in condizioni sperimentali che, più raramente spontanee, e la comparsa di uno stato di anemia, è stata segnalata fin dagli anni '40 (Cartwright et al., 1946). Come indicato però dal corrente testo di riferimento in ematologia veterinaria, "la relazione tra infiammazione e anemia in animali che presentano malattie spontanee ha ricevuto scarsa attenzione" (Fry, 2010). Tra le limitazioni che hanno impedito anche nel recente passato un approfondimento in questo senso sicuramente dobbiamo annotare la mancanza di un affidabile marcatore dell'infiammazione che potesse permettere di individuare e soprattutto quantificare la presenza di un'infiammazione. A titolo di esempio possiamo ad esempio considerare il lavoro di Neumann (2003), che ha arruolato 50 cani, utilizzando come criterio per una diagnosi di infiammazione una "combinazione tra diagnosi clinica e alterazioni della conta leucocitaria, sia totale che differenziale". Un simile approccio nella selezione dei casi è reso discutibile dal parametro di laboratorio considerato (conta leucocitaria), perché non rispecchia gli standard richiesti per monitorare una malattia infiammatoria: ad esempio, se si utilizza la numerosità dei leucociti per quantificare una risposta, quest'ultima può essere sottostimata nelle essudazioni gravi dove i granulociti neutrofili sono soggetti a consumo. Disponiamo adesso invece di un parametro, la proteina C reattiva, che essendo una proteina della fase acuta positiva primaria, permette di individuare uno stato infiammatorio e di poterne quantificare la gravità, che è direttamente proporzionale alle concentrazioni sieriche di questa pentraxina (Kjelgaard-Hansen & Jacobsen, 2011). La possibilità di misurare la CRP tramite una metodica affidabile, già da noi validata e utilizzata in altra sperimentazione (Caldin et al., 2009) ci ha permesso quindi di poter individuare e stadiare la presenza di una condizione infiammatoria. In questa popolazione si potrà individuare la prevalenza dell'anemia in una ampia popolazione di cani ammalati e la prevalenza della stessa in base all'entità dell'infiammazione. Inoltre per

la prima volta si analizzerà in questo contesto il comportamento di parametri volumetrici ottenuti con strumentazione laser ADVIA (MCV) e parametri emoglobinici quali il CH e il CHCM, sia negli eritrociti maturi che nei reticoloci. Tali parametri offrono maggiori indicazioni rispetto ai più noti ma ormai desueti parametri calcolati la valutazione del contenuto emoglobinico degli eritrociti maturi. Tali valori saranno comparati con alcuni parametri provenienti dal profilo reticolocitario, da noi eseguito su tutti i pazienti e non limitandosi a quelli affetti da anemia. Si potrà così valutare la risposta ematologica all'infezione anche valutando la componente reticolocitaria, nell'ottica di poter esplorare il metabolismo dell'eritrono anche nel brevissimo periodo, considerando che l'emivita nel sangue periferico di un reticolocita è di circa 24 ore (Christian, 2010). Verranno considerate altre proteine della fase acuta quali l'aptoglobina e il fibrinogeno. Inoltre si indagheranno i rapporti tra infiammazione e marker marziali sistemici, quali la sideremia e la ferritinemia. Infine verranno indagati due parametri biochimici, la natremia e l'osmolalità sierica misurata, considerando l'influenza della tonicità del plasma nella determinazione del volume eritrocitario (Beautyman & Bills, 1974; Boisvert et al., 1999; Zandecki et al., 2007, Tvedten, 2010).

### **Materiali e metodi**

Nel periodo compreso tra il 1 Gennaio 2005 e il 31 Dicembre 2010, presso la Clinica Veterinaria San Marco di Padova sono state eseguite 22669 prime visite a cani di proprietà. Per ogni animale è stata raccolta l'anamnesi ed eseguito un esame fisico. Contestualmente venivano eseguiti, a fini diagnostici, un panel di esami di laboratorio quali un esame emocromocitometrico con profilo reticolocitario, chimico clinico di routine, elettroforesi sierica, profilo coagulativo ed esame urine comprensivo di misurazione degli elettroliti urinari e determinazione delle frazioni di escrezioni degli stessi. Gli animali indagati sono stati riferiti per uno stato di malattia, individuato o sospettato dai proprietari, oppure osservato dal medico veterinario durante l'esame fisico.

### ***Creazione dei gruppi***

La prima parte dello studio è stata realizzata analizzando i dati di tutte le prime visite eseguite su animali ammalati in un periodo di tempo compreso tra il 1 Gennaio 2010 e il 31 Gennaio 2010.

La seconda parte dello studio ha previsto, nella popolazione canina osservata nel quinquennio 2005-2010, la ricerca di soggetti che presentavano uno stato di malattia, come delineato dall'anamnesi e/o dall'esame fisico, ma che riportavano valori di CRP compresi tra 0.01 e 0.22 mg/dl, ovvero all'interno dell'intervallo di riferimento, individuando 2930 cani. Sono stati quindi creati, utilizzando il database integrato da appositi codici, 3 differenti gruppi, che differiscono per valori di proteina C reattiva, come indicato nella tabella 5.

<b><i>Gruppo</i></b>	<b><i>Proteina C Reattiva sierica (mg/dL)</i></b>
<b>0</b>	0.01-0.22
<b>1</b>	0.23-2.22
<b>2</b>	2.23-6.66
<b>3</b>	6.67-26.40

**Tabella 5: Gruppi e relativi livelli sierici di CRP**

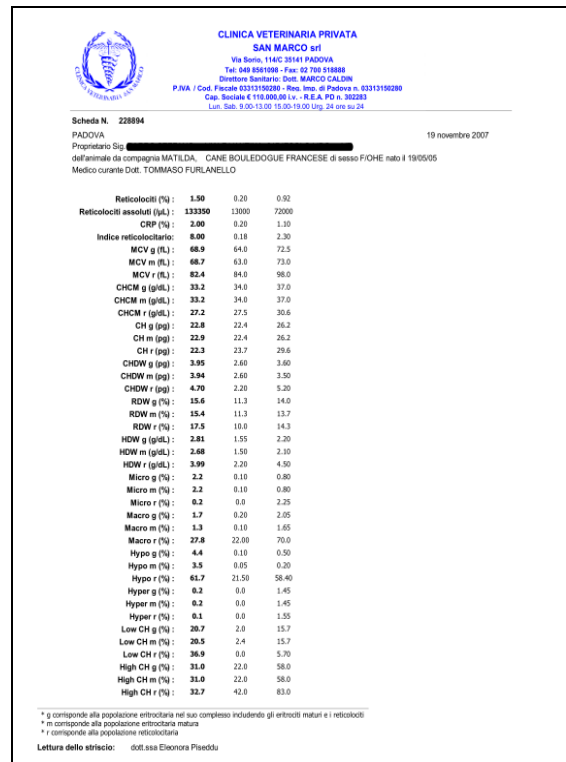
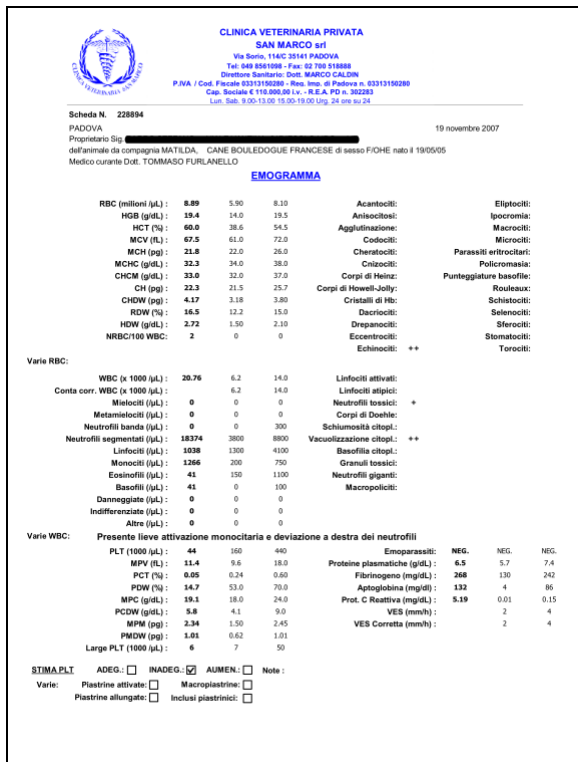
Partendo dai 2930 cani con valori normali di CRP, si è provveduto quindi ad individuare nei cani stratificati in base agli incrementi della CRP, soggetti comparabili per età, razza (quando non meticci) e sesso. In particolare per l'età veniva considerata accettabile una differenza di età  $\leq 3$  mesi. Per quanto riguarda i cani meticci veniva considerato accettabile una differenza di peso corporeo  $\pm 5$ kg.

La creazione di un cross-match che si associ a parametri così restrittivi, permette di annullare ogni differenza relativa al segnalamento, con particolare riguardo nei confronti dei parametri ematologici e marziali.

### ***Esame emocromocitometrico***

L'esame emocromocitometrico è stato eseguito con contaglobuli ADVIA 2120® Siemens, entro 1h dal campionamento. Lo strumento, grazie ad una tecnologia di citometria a flusso laser light-scattering e al concomitante uso di altri reagenti, di determinare separatamente volume, taglia, contenuto di RNA e di emoglobina, producendo dei parametri individuali sia per gli eritrociti maturi che per i reticolociti (Moritz et al., 2004).

Lo strumento quindi fornisce i seguenti parametri: conta eritrocitaria, concentrazione dell'emoglobina (metodica colorimetrica), ematocrito (calcolato), volume corpuscolare medio (Mean Corpuscular Volume, MCV), contenuto emoglobinico medio (Mean Corpuscular Hemoglobin, MCH, calcolato), concentrazione emoglobinica cellulare media (Mean Cellular Hemoglobin Concentration, MCHC, calcolato), concentrazione emoglobinica corpuscolare media (Corpuscular Hemoglobin Concentration Mean, CHCM), contenuto emoglobinico (CH), ampiezza della distribuzione eritrocitaria (*Red Cell Distribution Width*, RDW), ampiezza della distribuzione emoglobinica (Hgb Distribution Width, HDW), conta piastrinica (platelet count, PLT), volume piastrinico medio (Mean Platelet Volume, MPV), piastrinocrito (Plateletcrit, PCT), ampiezza della distribuzione piastrinica (Platelet Component Distribution Width, PCDW), mean platelet component concentration (MPC), conta leucocitaria totale (Total White Blood Count, WBC) e differenziale che comprende granulociti neutrofili, linfociti, monociti ed eosinofili. La conta differenziale e i citogrammi si ottengono dal canale della perossidasi. Per ogni campione è stato eseguito uno striscio a fresco, essiccato all'aria e successivamente colorato con coloratrice automatica 7120 Wescor®, utilizzando come reagenti Eosin (SS-035C), Thyazin (SS-035B), Light Eosinophilic Washer (SS-035A) [Delcon®]. L'esame microscopico, eseguito da medici veterinari specialisti, veniva utilizzato per valutare la presenza di emoparassiti, la morfologia eritrocitaria e leucocitaria ed eseguire una stima della conta piastrinica. Un esempio di un esame emocromocitometrico è riportato nella figura 13. Solo una parte di questi dati verrà presentata in questo studio.



**Figura 12: Esempio di esame emocromocitometrico. Notare a destra il profilo reticolocitario, eseguito anche se l'ematocrito è all'interno dell'intervallo di riferimento**

Per quanto riguarda i reticulociti, essi vengono individuati grazie ad un legame intracitoplasmatico tra l'Oxazina 750, un composto non fluorescente che si lega all'RNA presente nei reticulociti (Riley et al., 2001; Tvedten & Moritz, 2010). Si realizza quindi un'analisi complessa delle cellule contrassegnate dal legame con oxazina, valutandone sia il low scattering che l'high scattering e l'assorbanza relativa al contenuto di RNA. Possono così essere prodotti numerosi parametri misurati che integrano la conta percentuale e assoluta, quali il CH (CH reticolocitario, CHr), l'MCV (MCV reticolocitario, MCVr). Si rimanda alla parte prima per altre informazioni relative al profilo reticolocitario.

Gli intervalli di riferimento sono stati creati dall'Autore su una popolazione di 120 cani adulti e già utilizzati in altra pubblicazione (Furlanello et al., 2006).

Al fine di ridurre alcune variabilità legate a razza, sesso ed età dei pazienti studiati, per la definizione di anemia negli studi di prevalenza, si utilizzerà un cut-off di 13.0 gr/dL che è inferiore rispetto al limite minimo dell'intervallo di riferimento (14.0 gr/dL).

### ***Esame biochimico***


Il profilo biochimico veniva eseguito con analizzatore Olympus AU 2700. Nella tabella 6 è riportato l'elenco degli analiti utilizzati e il metodo analitico.

<b>Parametro</b>	<b>Metodo</b>
Albumina	Bromocresol green
Alanina-aminotransferasi	IFCC Reference Method, modificato con l'esclusione di P-5-P
Fosfatasi alcalina, ALKP	IFCC Method
Amilasi	CNPG3
Ammonia	Spettrofotometrica, con alfa-chetoglutarato come substrato
Aspartate-aminotransferasi	IFCC Reference Method, modificato con l'esclusione di P-5-P
Bicarbonatoe	Enzymatica
Proteina C-Reattiva (C-Reactive protein, CRP)	Immuno-turbidimetric assay
Calcio	Arsenazo
Cloro	ISE, indiretto
Colesterolo	CHO-POD
Colinesterasi	GSCC 1994
Creatine kinase	IFCC
Creatinina	IDMS Traceable
Ferritina	Immuno-turbidimetric assay
Gamma-Glutamyltransferase, GGT	IFCC
Glucosio	HK G6P-DH
Aptoglobina	Immunoturbidimetric assay
Ferro	TPTZ Ferene
Lattati	Trinder Method
Lactate-dehydrogenase, LDH	IFCC
Lipasi	Colorimetrica (Imamura)
Magnesio	Xylidyl blue
Fosforo	Molybdate, UV
Potassio	ISE indirect
Sodio	ISE indirect
Bilirubina totale	DPD
Proteine totali	Biureto
Trigliceridi	GPO-POD
Unsaturating iron binding capacity, UIBC	Nitroso- PSAP
Urea	Urease/GLDH

**Tabella 6: elenco, in ordine alfabetico, degli analiti che compongono il profilo biochimico. Determinazioni eseguite con analizzatore Olympus AU 2700**

Il profilo biochimico comprende anche la osmolalità sierica misurata, determinata con osmometro OM 6050-1/OM 6050-2 Arkray®.

Dal 2008 il profilo è stato integrato da una valutazione fotometrica semiquantitativa degli interferenti (lipemia, ittero ed emolisi). In figura 14 si riproduce un profilo biochimico standard.


 <b>CLINICA VETERINARIA PRIVATA SAN MARCO srl</b> Via Sorio, 114/C 35141 PADOVA Tel: 049 8561998 - Fax: 049 7969254 Direttore Sanitario: Dott. MARCO CALDIN P.IVA / Cod. Fiscale 03313150280 - Res. Imp. di Padova n. 03313150280 Cap. Sociale € 110.000,00 Lv. - R.E.A. PD n. 302283 Lun. Sab. 9.00-13.00 15.00-19.00 Usp. 24 ore su 24			
Scheda N. 490849			
PADOVA		30 giugno 2010	
Proprietario Sig. [REDACTED]			
dell'animale da compagnia KORA, CANE LABRADOR RETRIEVER sesso: F/I nato il 14/05/2007			
Medico curante dott. TOMMASO FURLANELLO			
<b>PROFILO BIOCHIMICO</b>			
Intervallo di riferimento			
		min	max
CPK (IU/L) :	274	42	155
AST (IU/L) :	118	21	44
ALT (IU/L) :	142	22	78
ALP (IU/L) :	72	16	119
GGT (IU/L) :	9,0	1,2	10,9
Colinesterasi (IU/L) :	9243	3347	7074
Bilirubina Totale (mg/dL) :	0,37	0,11	0,31
Proteine Totali (g/dL) :	4,5	5,7	7,1
Albumine (g/dL) :	1,7	2,7	3,6
Globuline (g/dL) :	2,8	2,6	3,9
Rapporto A/G:	0,61	0,79	1,35
Colesterolo (mg/dL) :	93	156	369
Trigliceridi (mg/dL) :	53	30	112
AMILASI (IU/L) :	500	338	1101
LIPASI (IU/L) :	107	121	725
Urea (mg/dL) :	35	16	49
Creatinina (mg/dL) :	0,96	0,83	1,42
Glucosio (mg/dL) :	112	88	119
Calcio (mg/dL) :	8,6	9,2	11,1
Fosforo (mg/dL) :	4,3	2,3	5,0
Magnesio (mg/dL) :	0,76	0,67	0,94
Sodio (mEq/L) :	142	143	151
Potassio (mEq/L) :	4,7	3,9	5,1
Rapporto Na/K:	30,2	28,5	37,4
Cloro (mEq/L) :	108	109	118
Cloro corretto (mEq/L) :	110,7	109,1	115,9
Lattato (mmol/L) :	5,5	1,00	3,50
HCO-3 (mmol/L) :	22,9	18,4	24,8
Divario Anionico:	16,2	13,1	19,4
Osmol. sier. mis. (mOsm) :	287	296	309
Osmol. sier. calc. (mOsm) :	276	277	291
Div. Osmolale:	11	12	24
Ferro totale (µg/dL) :	24	95	226
UIBC (µg/dL) :	338	182	306
TIBC (µg/dL) :	362	318	479
Saturazione (%) :	6,6	28,2	56,8
Aptoglobina (mg/dL) :	34	1	96
Ferritina (ng/ml) :	249,0	85	286
Prot. C Reattiva (mg/dL) :	0,74	0,01	0,22
LDH (IU/L) :	72	50	150
Valutazione fotometrica semiquantitativa dei seguenti interferenti:			
Lipemia: NORMALE			
Ittero: NORMALE			
Emolisi: NORMALE			
(*) valido per animali adulti.			

**Figura 13: fac-simile di profilo biochimico**

La ferritinemia sierica è stata misurata con una metodica valutata per la specie canina (Caldin et al., 1999).

### ***Profilo coagulativo***

Il profilo coagulativo veniva eseguito su coagulometro STA COMPACT – 2 TM Roche STAGO®, con reagenti STA Roche per quanto riguarda tempo di protrombina, tempo di trombina, tempo di tromboplastina parziale attivata e fibrinogeno. D-Dimeri e antitrombina venivano eseguiti con l'analizzatore Olympus. Si riporta in figura 15 un profilo coagulativo standard.

 <b>CLINICA VETERINARIA PRIVATA SAN MARCO srl</b> Via Sorio, 154/C 35141 PADOVA Tel: 049 8561098 - Fax: 049 7969254 Direttore Sanitario: Dott. MARCO CALDIN P.IVA / Cod. Fiscale 03313150280 - Reg. Imp. di Padova n. 03313150280 Cap. Sociale € 110.000,00 i.v. - R.E.A. PD n. 362283 Lun. Sab. 9.00-13.00 15.00-19.00 Urg. 24 ore su 24			
Scheda N. 80615			
PADOVA		30 giugno 2010	
Proprietario: _____			
dell'animale da compagnia KORA, CANE LABRADOR RETRIEVER sesso: Ff nato il 14/05/2007			
Medico curante dott. TOMMASO FURLANELLO			
<u>PROFILO EMOSTATICO</u>			
		Intervallo di riferimento	
		min	max
Tempo di tromboplastina parziale attivata - aPTT (sec.) :	<b>12.2</b>	10.2	12.3
Tempo di protrombina - PT (sec.) :	<b>8.9</b>	6.8	8.6
Tempo di trombina - TT (sec.) :	<b>12.4</b>	11.8	15.7
Fibrinogeno ( mg/dL ) :	<b>120</b>	152	284
Prodotti di degradazione della fibrina/fibrinogeno - FDPs (µg/mL) :	<b>&gt;5</b>	< 5	
D-Dimeri della fibrina (µg/mL) :	<b>0.16</b>	0.01	0.34
Antitrombina (%) :	<b>66</b>	110	167
Note:			

**Figura 14: copia di profilo coagulativo**

La determinazione dei D-Dimeri plasmatici è stata realizzata con test validato per la specie canina (Caldin et al., 2000).

### ***Altre indagini***

Per scelta del medico veterinario responsabile di ogni singolo paziente, venivano scelti indagini di approfondimento sia nell'ambito della patologia clinica (ad esempio esami cito/istopatologici, microbiologici, sierologici) e di diagnostica per immagini

(ecotomografie, tomografia computerizzata multidetettore ed altre). Questi dati non verranno presentati.

### ***Archiviazione dei dati***

I casi sono archiviati in un database dedicato, che comprende ogni informazione, a partire dall'anamnesi fino alle immagini cito/istopatologiche (P.O.A. - System 6.0® e segg., software per ambulatori e cliniche veterinarie, Ing. L.Coppola, Mestre-Venezia).

### ***Analisi statistica***

E' stato utilizzato il test Kolmogorov-Smirnov per testare la normalità dei dati. Le variabili normalmente distribuite sono state analizzate mediante test ANOVA e post test per confronti multipli di Tukey. Le variabili distribuite non normalmente sono state invece analizzate utilizzando il test non parametrico di Kruskal-Wallis seguito dalla procedura per confronti multipli secondo il principio di Bonferroni. Per ogni singolo parametro il tipo di test utilizzato è indicato in figura o tabella.

La soglia di significatività statistica è stata settata per valori di  $p < 0.05$

Il software utilizzato è Analyse-it®, v 2.21 Excel 12+

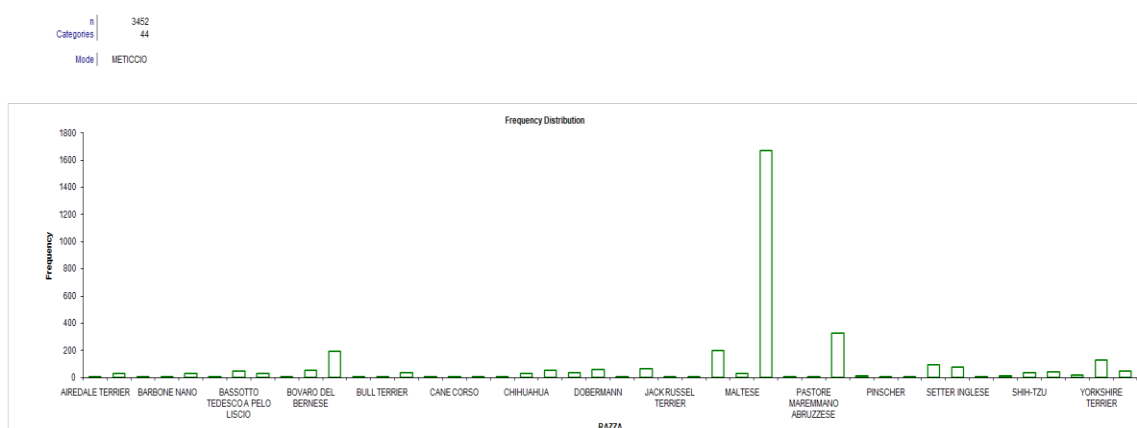
## Risultati

### *Prevalenza dell'anemia in una popolazione di cani ammalati presentati per indagini cliniche*

Nell'anno 2010 sono stati eseguiti 3579 esami emocromocitometrici su un pari numero di cani portati come prima visita presso la Clinica. Utilizzando un cut-off di 13 per quanto riguarda l'emoglobinemia, risultano anemici 839 cani, con una prevalenza del 23,4%.

### *Segnalamento*

L'analisi dei pazienti permette di identificare un cross-match per 863 cani, portando così il numero complessivo di soggetti arruolati in 3452, equamente distribuiti nei quattro gruppi. Complessivamente sono rappresentate 43 razze canine e il gruppo dei cani meticci. Quest'ultimo era il più rappresentato 1668 soggetti (48.3%), seguito dal pastore tedesco (328 cani, 9.5%) e dal labrador retriever (200, 5.8%). In figura 16 è rappresentata graficamente la distribuzione dei soggetti nell'ambito delle razze.



**Figura 15: Razze d'appartenenza dei 3452 cani arruolati. Per il dettaglio vedi la tabella 7.**

La correttezza della procedura di cross-match è facilmente osservabile nella tabella 7, dove sono rappresentate tutte le razze d'appartenenza.

RAZZA	n	Proportion
AIREDALE TERRIER	4	0.001
ALANO	28	0.008
BARBONE MEDIO	4	0.001
BARBONE NANO	4	0.001
BARBONE TOY	28	0.008
BASSET HOUND	8	0.002
TEDESCO A PELO LISCIO	48	0.014
BEAGLE	32	0.009
BICHON FRISE	4	0.001
BOVARO DEL BERNESE	52	0.015
BOXER	192	0.056
TEDESCO DRAHTHAAR	4	0.001
BULL TERRIER	4	0.001
BULLDOG INGLESE	36	0.010
BULLMASTIFF	4	0.001
CANE CORSO	4	0.001
CARLINO	8	0.002
KING CHARLES SPANIEL	4	0.001
CHIHUAHUA	28	0.008
OCKER SPANIEL INGLESE	56	0.016
DALMATA	36	0.010
DOBERMANN	60	0.017
CONTINENTALE PAPILLON	4	0.001
GOLDEN RETRIEVER	64	0.019
JACK RUSSEL TERRIER	8	0.002
KING CHARLES SPANIEL	4	0.001
LABRADOR RETRIEVER	200	0.058
MALTESE	28	0.008
METICCIO	1668	0.483
PASTORE BELGA	4	0.001
MAREMMANO ABRUZZESE	8	0.002
PASTORE TEDESCO	328	0.095
PECHINESE	12	0.003
PINSCHER	4	0.001
RHODESIAN RIDGEBACK	4	0.001
ROTTWEILER	92	0.027
SETTER INGLESE	80	0.023
SETTER IRLANDESE	8	0.002
SHAR PEI	12	0.003
SHIH-TZU	36	0.010
SIBERIAN HUSKY	40	0.012
IGHLAND WHITE TERRIER	20	0.006
YORKSHIRE TERRIER	132	0.038
ZWERGPINSCHER	48	0.014

**Tabella 7: Dettaglio delle razze d'appartenenza**

Sono presenti nei quattro gruppi complessivamente 1776 femmine e 1676 maschi, come indicato nella figura 17.

Test	Describe - Summary
Performed by	SESSO Utente

n	3452
Categories	2
Mode	F



SESSO	n	Proportion
F	1776	0.514
M	1676	0.486

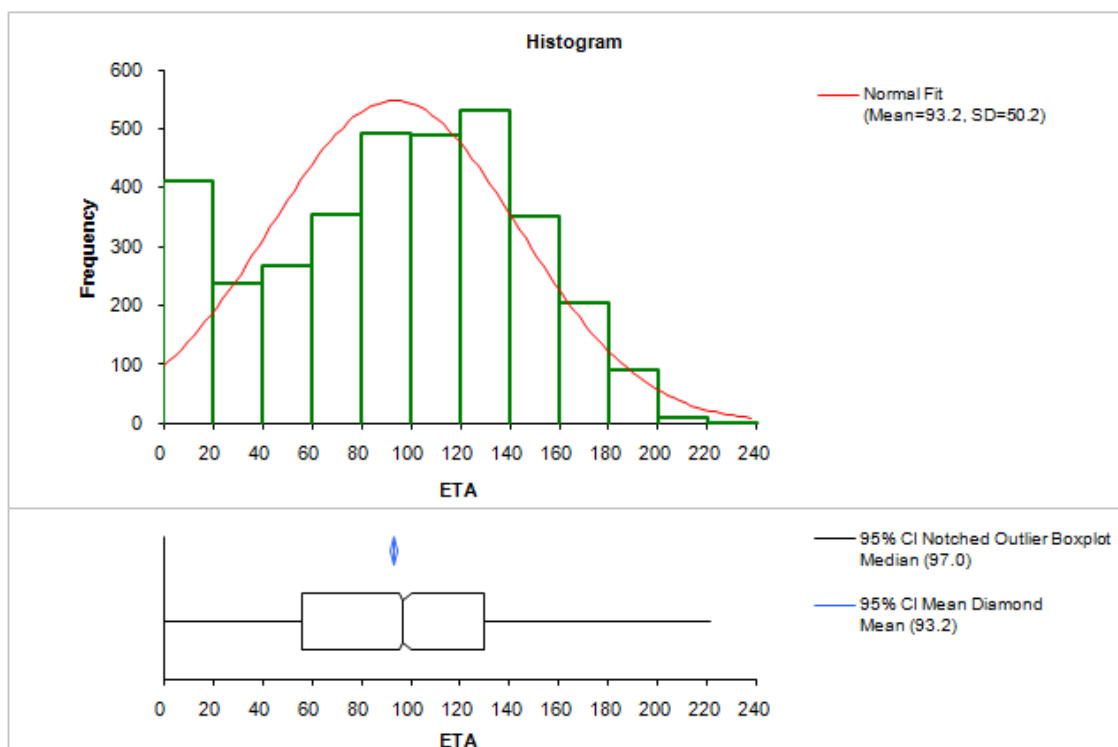
**Figura 16: distribuzione in base al sesso**

In relazione all'età si osserva la presenza di cani di età compresa tra 1 mese e 221, con una media di 93.2 mesi. La distribuzione delle età, in mesi, e alcune valutazioni statistiche sono indicate nella figura 18.

**Analyse-it** v2.22

Test Describe - Summary

Performed by ETA Utente Date 6 gennaio 2011



n	3452	Median	97.0
Mean	93.2	95.4% CI	95.0 to 100.0
95% CI	91.6 to 94.9	Range	221
SE	0.85	IQR	74.0
Variance	2522.7	Percentile	
SD	50.2	0th	0.0 (minimum)
95% CI	49.1 to 51.4	25th	56.0 (1st quartile)
CV	53.9%	50th	97.0 (median)
Skewness	-0.15	75th	130.0 (3rd quartile)
Kurtosis	-0.86	100th	221.0 (maximum)
Shapiro-Wilk W	0.97		
p	<0.0001		

**Figura 17: Distribuzione delle età (in mesi)**

Nota: in un numero ridotto di casi alcuni dati sono sporadicamente mancanti. Il numero di casi effettivamente utilizzati per ogni singolo test è indicato nelle tabelle.

### Conta eritrocitaria

Considerando la conta eritrocitaria si osserva una significativa diminuzione con l'aumentare dello stato infiammatorio fino al gruppo 2 (CRP compresa tra 10.02 e 30.00 mg/dL). A valori superiori non si osserva una differenza significativa e la conta eritrocitaria si assesta a valori vicini al limite minimo della normalità (5.70-8.56 milioni/ $\mu$ L). Nella figura 19 si può osservare una rappresentazione a box e le tabelle 8 e 9 presentano rispettivamente i valori numerici e i risultati statistici di significatività.

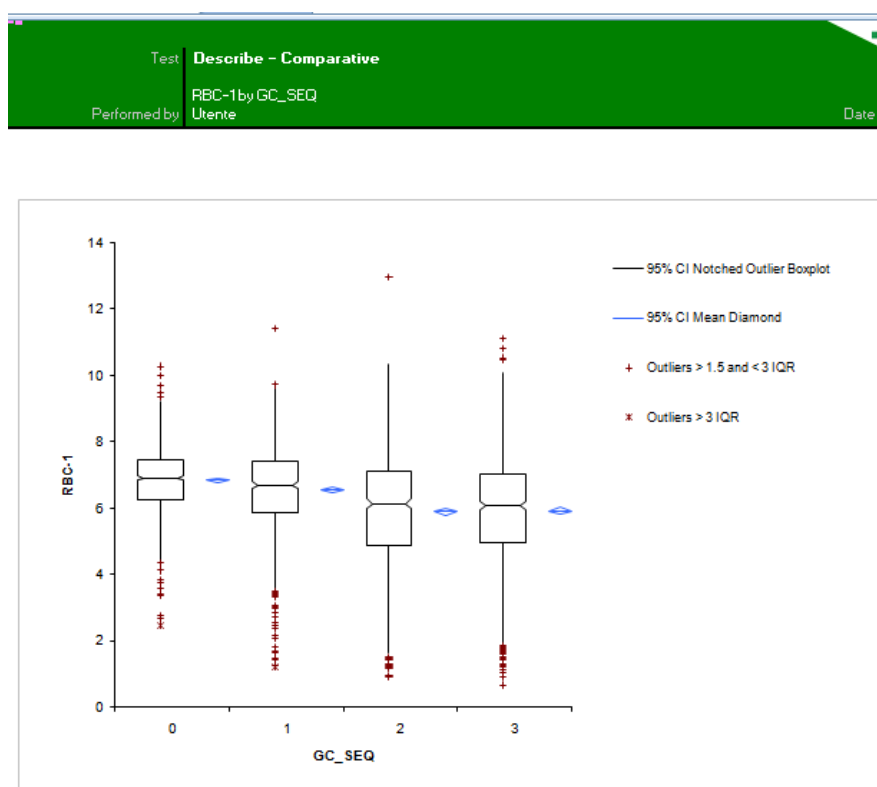


Figura 18: Conta eritrocitaria in relazione al grado di infiammazione

RBC-1byGC_SEQ	n	Mean	95% CI		SE	SD
0	859	6.841	6.774	to 6.907	0.0340	0.9960
1	857	6.550	6.462	to 6.639	0.0450	1.3171
2	858	5.894	5.779	to 6.009	0.0587	1.7204
3	861	5.922	5.805	to 6.039	0.0595	1.7468

RBC-1byGC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI		3rd Quartile	Max	IQR
0	859	2.45	6.230	6.910	6.840	to 7.000	7.460	10.27	1.230
1	857	1.21	5.860	6.690	6.600	to 6.790	7.400	11.43	1.540
2	858	0.93	4.889	6.140	5.970	to 6.310	7.090	12.96	2.201
3	861	0.67	4.970	6.070	5.940	to 6.220	7.043	11.11	2.073

**Tabella 8: Conta eritrocitaria in relazione al grado di infiammazione: valori medi, mediani e SD**

RBC-1 by GC_SEQ	n	Rank sum	Mean rank
0	859	1778086.0	2069.95
1	857	1602438.0	1869.82
2	858	1260470.0	1469.08
3	861	1260336.0	1463.80

n	3435 (cases excluded: 17 due to missing values)
Kruskal-Wallis' statistic	238.88
$\chi^2$ statistic	238.88
DF	3
p	<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)

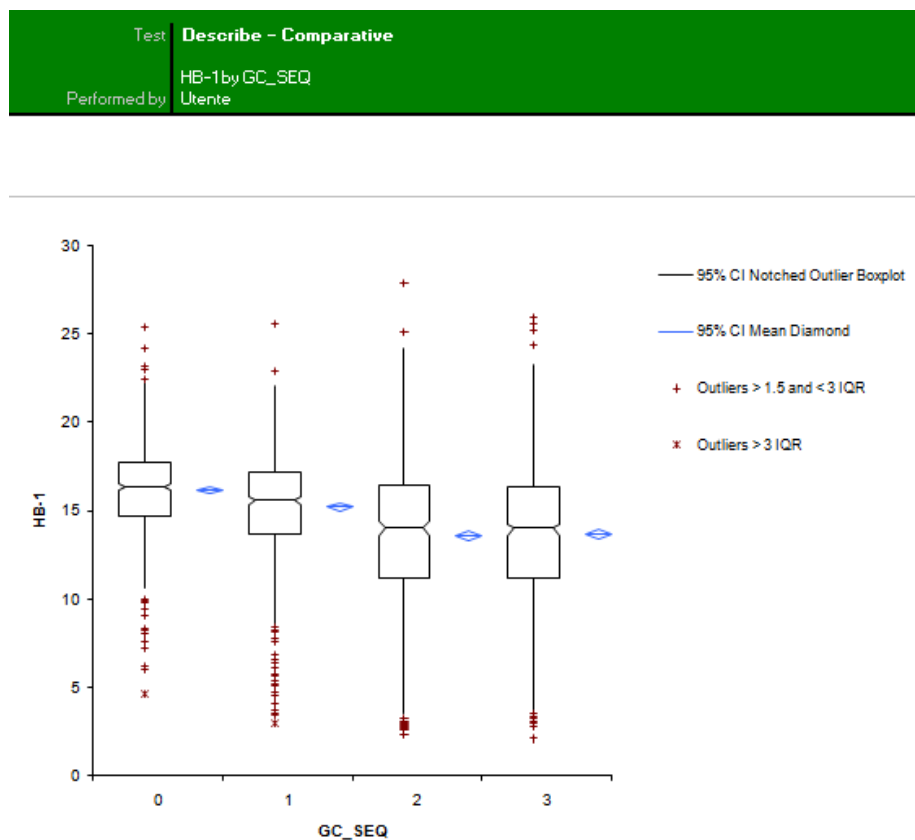
  

Bonferroni		
Contrast	Difference	p
0 v 1	200.1261	<0.0001
0 v 2	600.8695	<0.0001
0 v 3	606.1439	<0.0001
1 v 2	400.7434	<0.0001
1 v 3	406.0178	<0.0001
2 v 3	5.2744	1.0000

**Tabella 9: Conta eritrocitaria in relazione al grado di infiammazione: parametri di significatività**

## Emoglobina

Come si può evincere chiaramente dalla figura 20, con il progredire dell'infiammazione si osserva una diminuzione dell'emoglobinemia (tabella 10), che è definita significativa dall'analisi presentata nella tabella 11.



**Figura 19: Emoglobinemia in rapporto con l'entità dello stato infiammatorio**

Nella tabella 10 si possono osservare i valori medi e mediani e la SD. Nei gruppi 2 e 3 l'emoglobinemia si presenta inferiore al limite minimo dell'intervallo di riferimento (14.1 g/dL).

HB-1byGC_SEQ	n	Mean	95% CI		SE	SD
0	859	16.13	15.97 to 16.30		0.084	2.474
1	857	15.20	14.99 to 15.41		0.106	3.105
2	858	13.59	13.32 to 13.86		0.139	4.067
3	861	13.64	13.37 to 13.92		0.141	4.149

HB-1byGC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	859	4.6	14.70	16.30	16.20 to 16.50	17.70	25.4	3.00
1	857	3.0	13.70	15.60	15.30 to 15.80	17.20	25.6	3.50
2	858	2.3	11.19	14.05	13.60 to 14.40	16.40	27.9	5.21
3	861	2.1	11.20	14.00	13.60 to 14.20	16.30	25.9	5.10

**Tabella 10: Valori medi e mediani dell'emoglobinemia**

n | 3435 (cases excluded: 17 due to missing values)

HB-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0	859	16.13	0.084	0.120	2.47
1	857	15.20	0.106	0.120	3.11
2	858	13.59	0.139	0.120	4.07
3	861	13.64	0.141	0.120	4.15

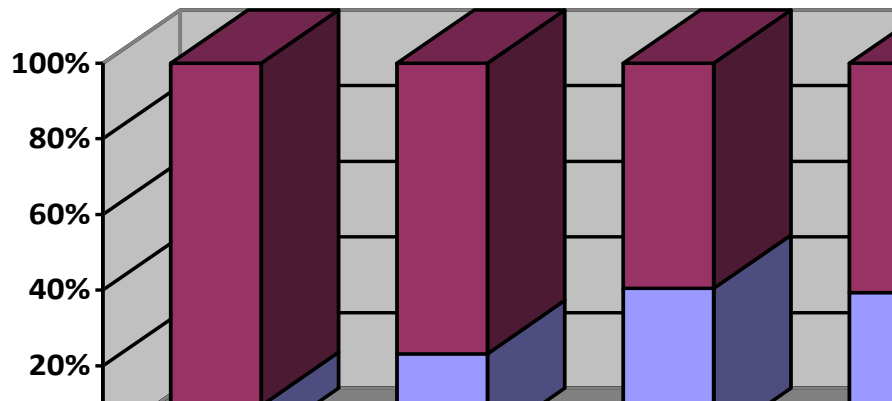
Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	3986.43	3	1328.81	107.33	<0.0001
Residual	42476.68	3431	12.38		
Total	46463.10	3434			

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
0 v 1	0.94	0.50 to 1.37	(significant)
0 v 2	2.54	2.11 to 2.98	(significant)
0 v 3	2.49	2.06 to 2.93	(significant)
1 v 2	1.61	1.17 to 2.04	(significant)
1 v 3	1.55	1.12 to 1.99	(significant)
2 v 3	-0.05	-0.49 to 0.38	

**Tabella 11: Significatività della diminuzione dell'emoglobinemia in rapporto allo stato infiammatorio**

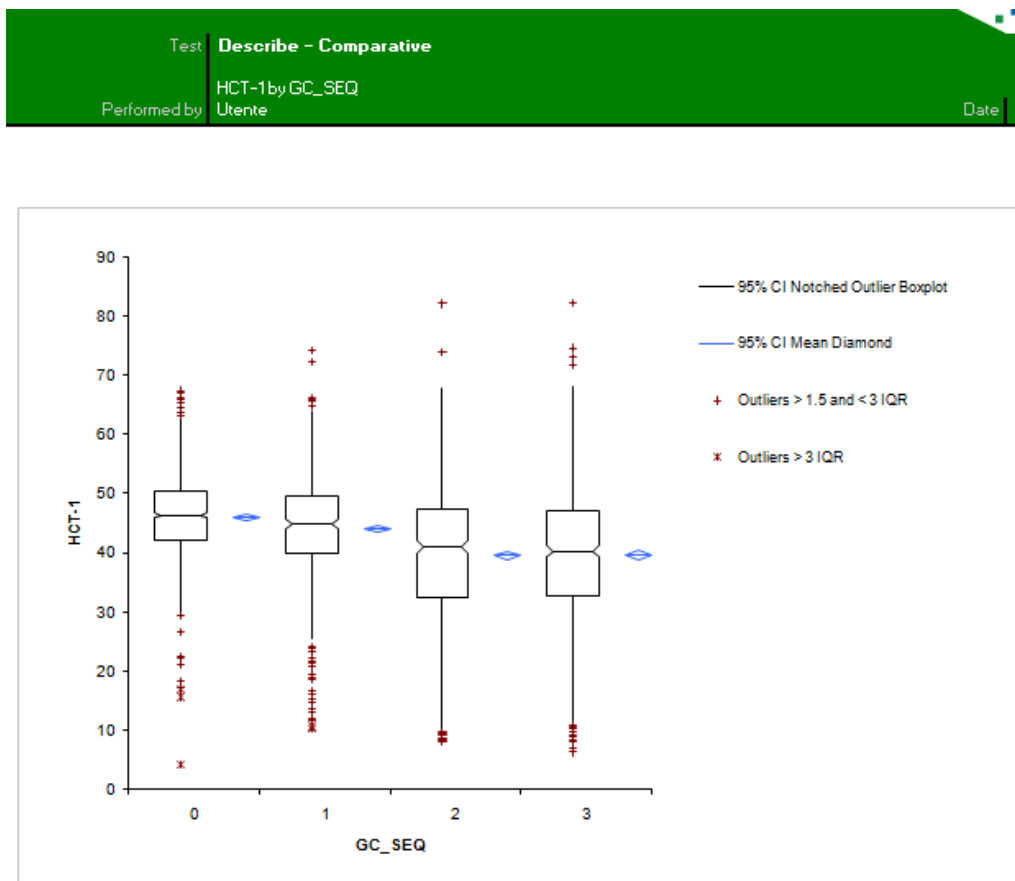
Utilizzando un cut-off di 13 gr/dL, è stata individuata una progressiva prevalenza dell'anemia dal Gruppo 0 (82/863; 9,5%), al Gruppo 1 (163/863; 18,8%) al 2 (666/863; 40,5%). Nel Gruppo 3 la prevalenza è lievemente minore (340/863; 39,4%) rispetto al Gruppo precedente (tabella 12).



**Tabella 12: prevalenza percentuale dell'anemia nei 4 gruppi**

### ***Ematocrito (HCT)***

Anche per l'ematocrito (figura 21) si osserva la stessa tendenza già descritta per quanto riguarda la conta eritrocitaria. Come presentato nella tabella 12 sia i valori medi che mediani rimangono superiori rispetto al limite minimo dell'intervallo di riferimento, ma si osserva con una significativa diminuzione dell'ematocrito, con assestamento nei gruppi 2 e 3 (tabella 13)



**Figura 20: Evoluzione dell'ematocrito in relazione allo stato infiammatorio**

HCT-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	859	46.02	45.54 to 46.49	0.242	7.100
1	857	44.12	43.53 to 44.71	0.301	8.813
2	858	39.53	38.76 to 40.29	0.391	11.452
3	861	39.59	38.82 to 40.37	0.395	11.586

HCT-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	859	4.3	42.12	46.20	45.90 to 46.90	50.48	67.4	8.37
1	857	10.2	39.90	45.00	44.10 to 45.70	49.60	74.2	9.70
2	858	8.0	32.50	40.90	39.80 to 42.00	47.30	82.1	14.80
3	861	6.3	32.70	40.10	39.30 to 41.40	47.10	82.2	14.40

**Tabella 13: Valori medi e mediani dell'HCT e SD in rapporto allo stato infiammatorio**

n | 3435 (cases excluded: 17 due to missing values)

HCT-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0	859	46.02	0.242	0.338	7.10
1	857	44.12	0.301	0.339	8.81
2	858	39.53	0.391	0.339	11.45
3	861	39.59	0.395	0.338	11.59

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	27646.67	3	9215.56	93.66	<0.0001
Residual	337583.96	3431	98.39		
Total	365230.63	3434			

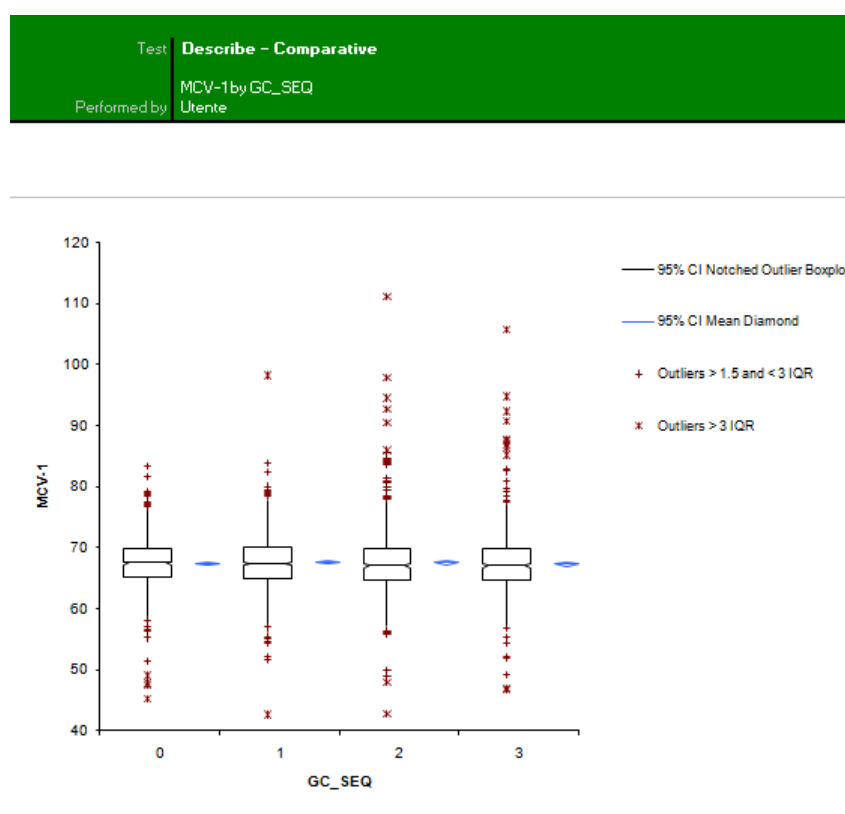
  

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
0 v 1	1.89	0.66 to 3.13	(significant)
0 v 2	6.49	5.26 to 7.72	(significant)
0 v 3	6.43	5.20 to 7.66	(significant)
1 v 2	4.60	3.37 to 5.83	(significant)
1 v 3	4.53	3.30 to 5.76	(significant)
2 v 3	-0.07	-1.30 to 1.16	

**Tabella 14: Livelli di significatività dell'HCT in rapporto allo stato infiammatorio**

**MCV**

L'MCV presenta, in particolare nei valori medi (figura 22), una tendenza alla riduzione che però non si presenta significativa dal punto di vista statistico (tabella 14 e 15). I valori medi e mediani sono all'interno dei valori di riferimento in tutti i gruppi (63.1-72.6 fl).



**Figura 21: Box-plot relativi all'MCV in rapporto allo stato infiammatorio**

MCV-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	859	67.41	67.15 to 67.68	0.135	3.956
1	857	67.56	67.27 to 67.86	0.151	4.434
2	858	67.47	67.13 to 67.82	0.177	5.180
3	861	67.26	66.92 to 67.60	0.172	5.060

MCV-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	859	45.3	65.12	67.50	67.20 to 67.60	69.70	83.4	4.58
1	857	42.6	64.90	67.40	67.10 to 67.70	70.10	98.2	5.20
2	858	42.7	64.60	67.00	66.70 to 67.30	69.90	111.1	5.30
3	861	46.7	64.57	67.00	66.70 to 67.30	69.70	105.7	5.13

**Tabella 15: Valori medi e mediani dell'MCV (fL) in rapporto allo stato infiammatorio**

n | 3435 (cases excluded: 17 due to missing values)

MCV-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0	859	67.41	0.135	0.160	3.96
1	857	67.56	0.151	0.160	4.43
2	858	67.47	0.177	0.160	5.18
3	861	67.26	0.172	0.160	5.06

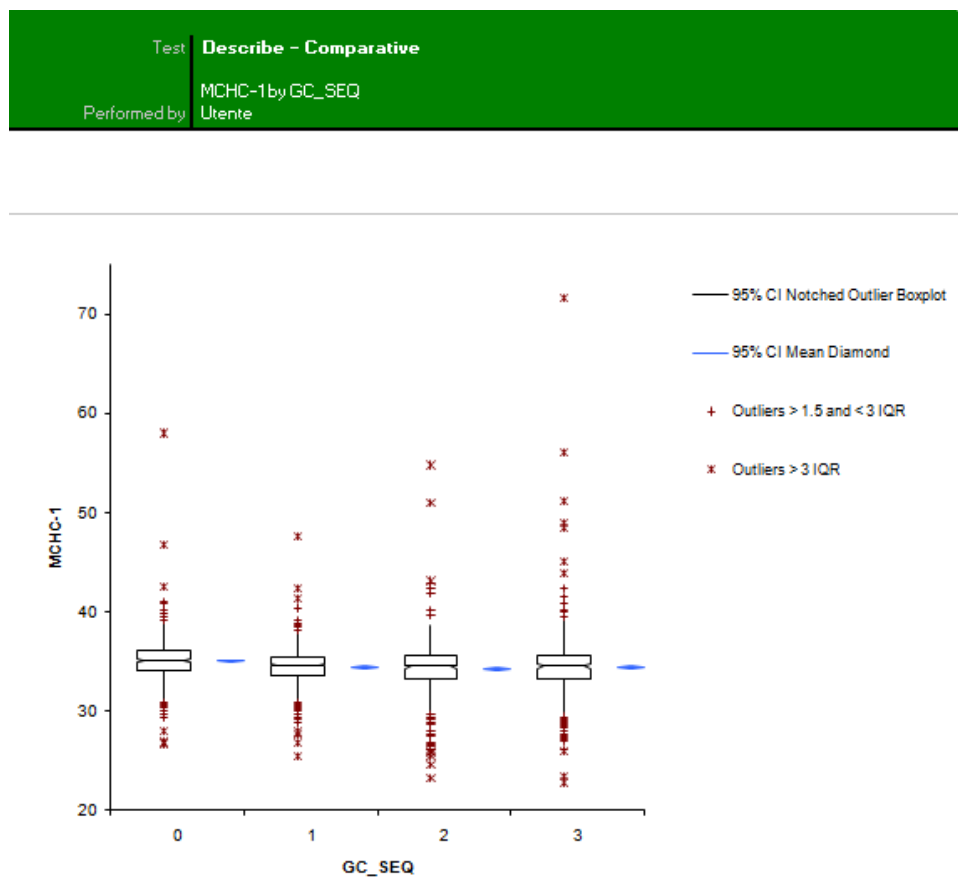
Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	42.46	3	14.15	0.65	0.5860
Residual	75270.22	3431	21.94		
Total	75312.68	3434			

Tukey Contrast	Difference	95% CI
0 v 1	-0.15	-0.73 to 0.43
0 v 2	-0.06	-0.64 to 0.52
0 v 3	0.15	-0.43 to 0.73
1 v 2	0.09	-0.49 to 0.67
1 v 3	0.31	-0.28 to 0.89
2 v 3	0.21	-0.37 to 0.79

**Tabella 16: Livelli di significatività del MCV in rapporto allo stato infiammatorio**

**MCHC**

L'MCHC diminuisce progressivamente con l'aumentare dell'infiammazione (figura 23 e tabella 16), con una differenza significativa tra lo stato di malattia in assenza di aumento della CRP sierica e i gruppi 1, 2, e 3, anche se non tra questi gruppi (tabella 17). I valori medi e mediani rimangono all'intervallo di riferimento (33.3-36.8 gr/dL).



**Figura 22: Variazioni del MCHC in relazione con lo stato infiammatorio**

MCHC-1by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	859	35.04	34.31 to 35.16	0.063	1.833
1	857	34.42	34.31 to 34.54	0.060	1.767
2	858	34.27	34.12 to 34.43	0.080	2.329
3	861	34.39	34.21 to 34.58	0.095	2.775

MCHC-1by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	859	26.7	34.10	35.10	34.90 to 35.20	36.10	58.0	2.00
1	857	25.5	33.60	34.60	34.50 to 34.70	35.40	47.6	1.80
2	858	23.2	33.20	34.50	34.30 to 34.60	35.60	54.8	2.40
3	861	22.8	33.20	34.50	34.30 to 34.70	35.60	71.6	2.40

**Tabella 17: Valori medi e mediani del MCHC (gr/dL) in rapporto con lo stato infiammatorio**

n | 3435 (cases excluded: 17 due to missing values)

MCHC-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0	859	35.04	0.063	0.076	1.83
1	857	34.42	0.060	0.076	1.77
2	858	34.27	0.080	0.076	2.33
3	861	34.39	0.095	0.075	2.77

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	303.19	3	101.06	20.61	<0.0001
Residual	16825.52	3431	4.90		
Total	17128.71	3434			

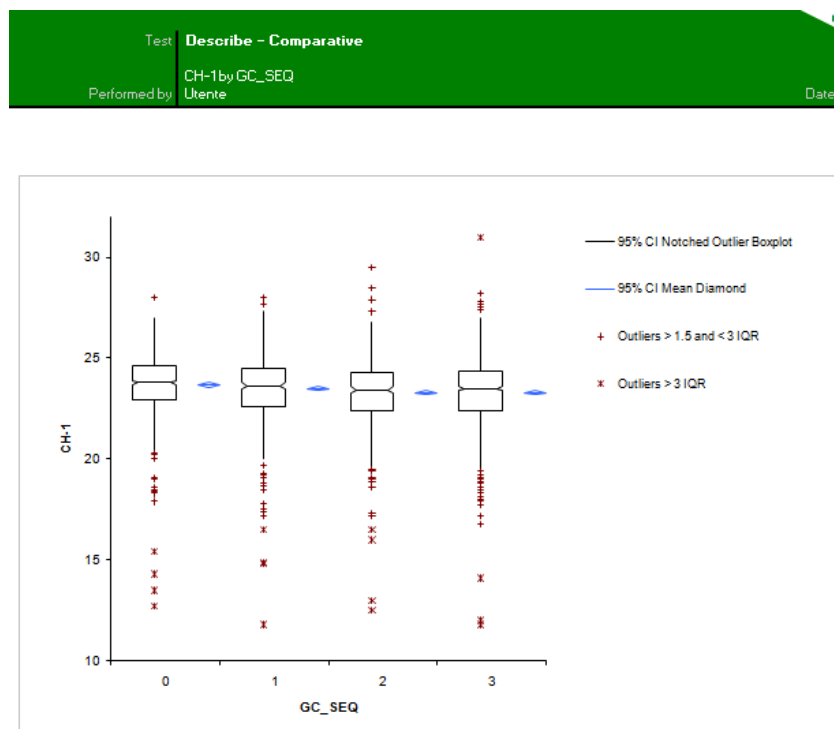
  

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
0 v 1	0.61	0.34 to 0.89	(significant)
0 v 2	0.76	0.49 to 1.04	(significant)
0 v 3	0.64	0.37 to 0.92	(significant)
1 v 2	0.15	-0.12 to 0.43	
1 v 3	0.03	-0.24 to 0.31	
2 v 3	-0.12	-0.39 to 0.15	

**Tabella 18: Livelli di significatività relativi alle variazioni del MCHC nell'infiammazione**

**CH**

Si osserva una lieve diminuzione del CH con il progredire dell'infiammazione (figura 24 e tabella 18). La differenza è significativa considerando il gruppo 0 e paragonandolo al 2 e al 3 (tabella 19). Valori medi e mediani sono all'interno dell'intervallo di riferimento (22-26 pg).



**Figura 23: Variazioni del CH in rapporto allo stato infiammatorio**

CH-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	719	23.69	23.57 to 23.80	0.058	1.542
1	828	23.49	23.38 to 23.60	0.057	1.638
2	786	23.29	23.18 to 23.41	0.058	1.632
3	855	23.30	23.19 to 23.42	0.060	1.745

CH-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	719	12.7	22.90	23.80	23.70 to 23.90	24.60	28.0	1.70
1	828	11.8	22.60	23.60	23.50 to 23.80	24.50	28.0	1.90
2	786	12.5	22.40	23.40	23.30 to 23.60	24.30	29.5	1.90
3	855	11.8	22.40	23.50	23.40 to 23.60	24.38	31.0	1.98

**Tabella 19: Valori medi e mediani del CH (pg) in rapporto allo stato infiammatorio**

CH-1 by GC_SEQ		n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0		719	23.69	0.058	0.061	1.54
1		828	23.49	0.057	0.057	1.64
2		786	23.29	0.058	0.059	1.63
3		855	23.30	0.060	0.056	1.74

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	77.55	3	25.85	9.55	<0.0001
Residual	8616.90	3184	2.71		
Total	8694.45	3187			

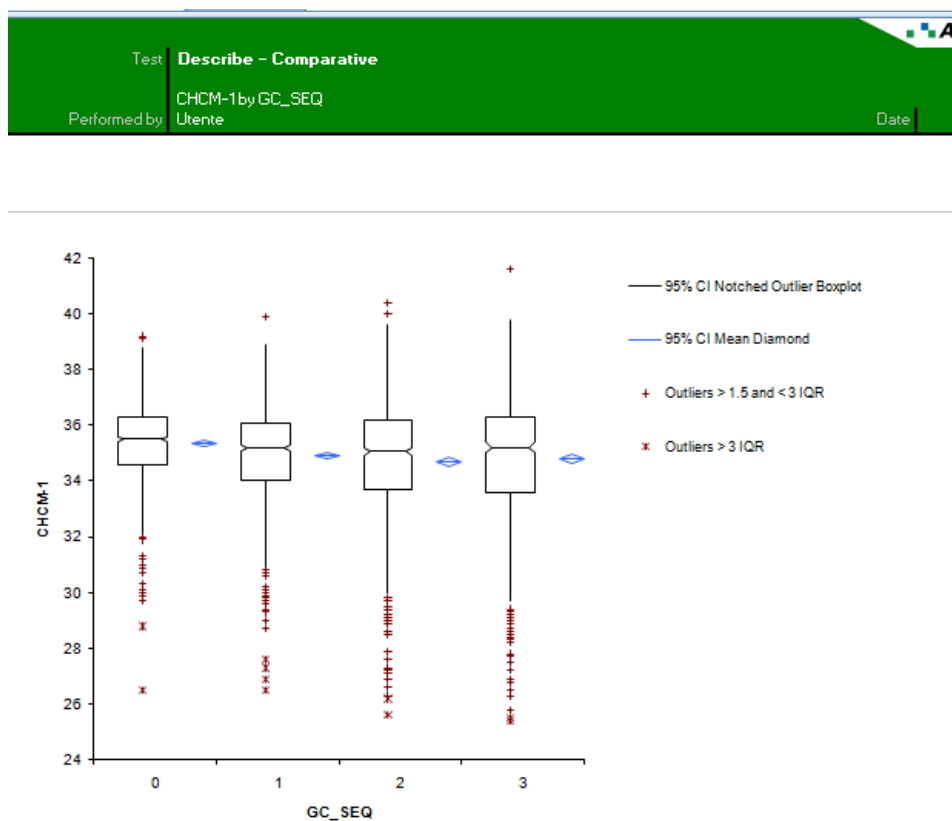
  

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
0 v 1	0.20	-0.02 to 0.41	
0 v 2	0.39	0.17 to 0.61	(significant)
0 v 3	0.38	0.17 to 0.60	(significant)
1 v 2	0.19	-0.02 to 0.40	
1 v 3	0.18	-0.02 to 0.39	
2 v 3	-0.01	-0.22 to 0.20	

**Tabella 20: Livelli di significatività del CH in rapporto allo stato infiammatorio**

**CHCM**

Il contenuto emoglobinico corpuscolare medio diminuisce progressivamente con l'incremento della flogosi (figura 25), con valori medi e mediani ancora compresi all'interno dell'intervallo di riferimento (34.3-37.8 g/dL, tabella 20). Si osserva comunque una significatività statistica confrontando il gruppo 0 con i gruppi nei quali si registra un incremento della CRP sopra i livelli basali (tabella 21).



**Figura 24:Variazioni del CHCM in relazione a differenti livelli di infiammazione**

CHCM-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	718	35.34	35.23 to 35.45	0.056	1.503
1	828	34.91	34.78 to 35.03	0.064	1.831
2	786	34.69	34.54 to 34.84	0.078	2.186
3	855	34.80	34.65 to 34.95	0.078	2.273

CHCM-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	718	26.5	34.60	35.50	35.40 to 35.60	36.30	39.2	1.70
1	828	26.5	34.00	35.20	35.10 to 35.30	36.10	39.9	2.10
2	786	25.6	33.70	35.10	34.90 to 35.20	36.20	40.4	2.50
3	855	25.4	33.60	35.20	35.00 to 35.40	36.30	41.6	2.70

**Tabella 21: Valori medi e mediani del CHCM in relazione a differenti gradi di infiammazione**

n | 3187 (cases excluded: 265 due to missing values)

CHCM-1 by GC_SEQ	n	Rank sum	Mean rank
0	718	1271212.5	1770.49
1	828	1292035.0	1560.43
2	786	1178543.0	1499.42
3	855	1338287.5	1565.25

Kruskal-Wallis' statistic | 36.67

$\chi^2$  statistic | 36.67

DF | 3

p | <0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)

Bonferroni Contrast	Difference	p
0 v 1	210.0622	<0.0001
0 v 2	271.0724	<0.0001
0 v 3	205.2424	<0.0001
1 v 2	61.0102	1.0000
1 v 3	-4.8198	1.0000
2 v 3	-65.8300	0.8733

**Tabella 22: Livelli di significatività delle variazioni del CHCM in relazione a differenti livelli di infiammazione**

### Conta reticolocitaria

La conta reticolocitaria (figura 26) presenta scarse variazioni nei quattro gruppi (tabella 23). Manca una valenza statistica (tabella 24).

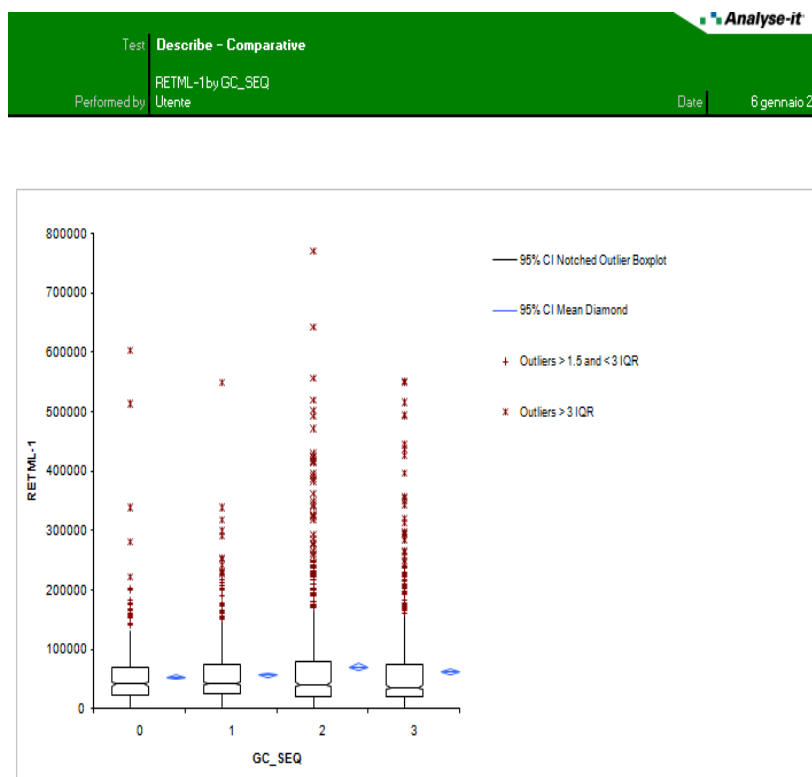


Figura 25 : Conta reticolocitaria in relazione con lo stato infiammatorio

RETML-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	678	52842.00	49285.37 to 56398.64	1811.400	47166.014
1	818	56458.55	53041.98 to 59875.11	1740.595	49782.244
2	781	69656.40	63406.58 to 75906.22	3183.794	88975.503
3	850	61110.34	56217.85 to 66002.83	2492.656	72672.772

RETML-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	678	2142.0	23178.00	41342.50	38019.00 to 45435.00	69758.25	603687.0	46580.25
1	818	2970.0	24786.00	42273.00	38624.00 to 45120.00	74066.67	548680.0	49280.67
2	781	253.0	20524.00	40977.00	37184.00 to 44720.00	79584.67	769980.0	59060.67
3	850	1720.0	19166.17	36072.00	33450.00 to 39678.00	74721.25	551507.0	55555.08

Tabella 23: Valori medi e mediani (per microl) dei reticolociti

RETML-1 by GC_SEQ	n	Rank sum	Mean rank
0	678	1066139.5	1572.48
1	818	1318672.5	1612.07
2	781	1231171.5	1576.40
3	850	1274644.5	1499.58

n | 3127 (cases excluded: 325 due to missing values)

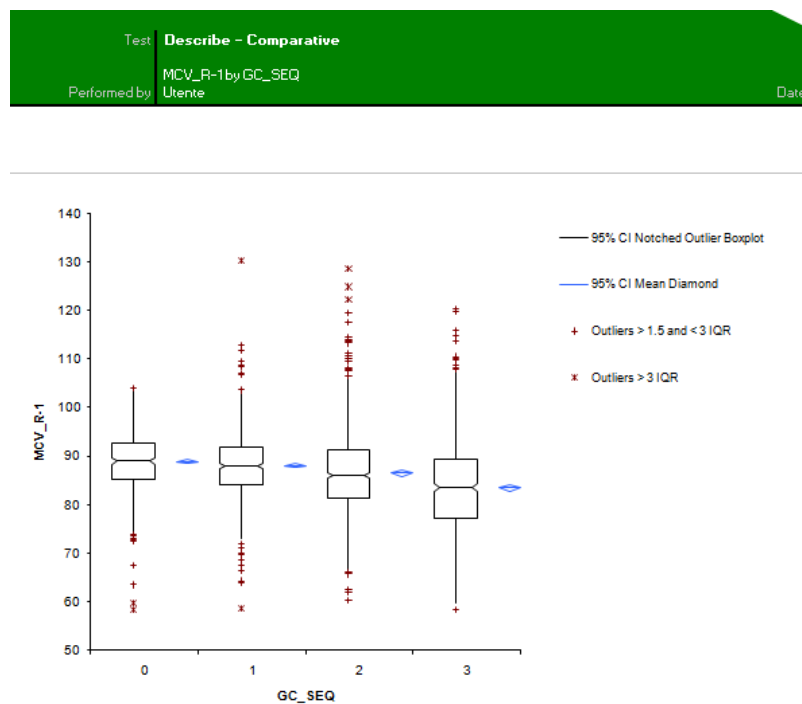
Kruskal-Wallis' statistic	6.85
$\chi^2$ statistic	6.85
DF	3
p	0.0767 (chisqr approximation, corrected for ties)

Bonferroni Contrast	Difference	p
0 v 1	-39.5919	1.0000
0 v 2	-3.9268	1.0000
0 v 3	72.8954	0.7005
1 v 2	35.6651	1.0000
1 v 3	112.4873	0.0658
2 v 3	76.8222	0.5157

**Tabella 24: Correlazioni statistiche della conta reticolocitaria in relazione a differenti gradi di infiammazione**

**MCVr**

Il volume reticolocitario medio dei reticolociti manifesta una chiara tendenza alla microcitosi (figura 27), con valori medi e mediani (tabella 25) ancora compresi nell'intervallo di riferimento (83.0-97.3 fL), ma con significativa diminuzione dal punto di vista statistico (tabella 26).



**Figura 26: MCVr in relazione allo stato infiammatorio**

MCV_R-1by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	675	88.85	88.41 to 89.30	0.226	5.880
1	814	88.03	87.58 to 88.48	0.229	6.538
2	764	86.46	85.82 to 87.10	0.324	8.956
3	848	83.45	82.83 to 84.08	0.317	9.235

MCV_R-1by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	675	58.4	85.22	89.00	88.30 to 89.50	92.68	104.0	7.47
1	814	58.7	84.20	88.05	87.40 to 88.50	91.90	130.2	7.70
2	764	60.2	81.30	86.10	85.50 to 86.70	91.30	128.6	10.00
3	848	58.3	77.04	83.55	82.70 to 84.50	89.26	120.2	12.22

**Tabella 25: Valori medi e mediani del MCVr (fL) in relazione allo stato infiammatorio**

n		3101 (cases excluded: 351 due to missing values)				
MCV_R-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD	
0	675	88.85	0.226	0.303	5.88	
1	814	88.03	0.229	0.276	6.54	
2	764	86.46	0.324	0.284	8.96	
3	848	83.45	0.317	0.270	9.24	

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	13500.96	3	4500.32	72.78	<0.0001
Residual	191498.45	3097	61.83		
Total	204999.41	3100			

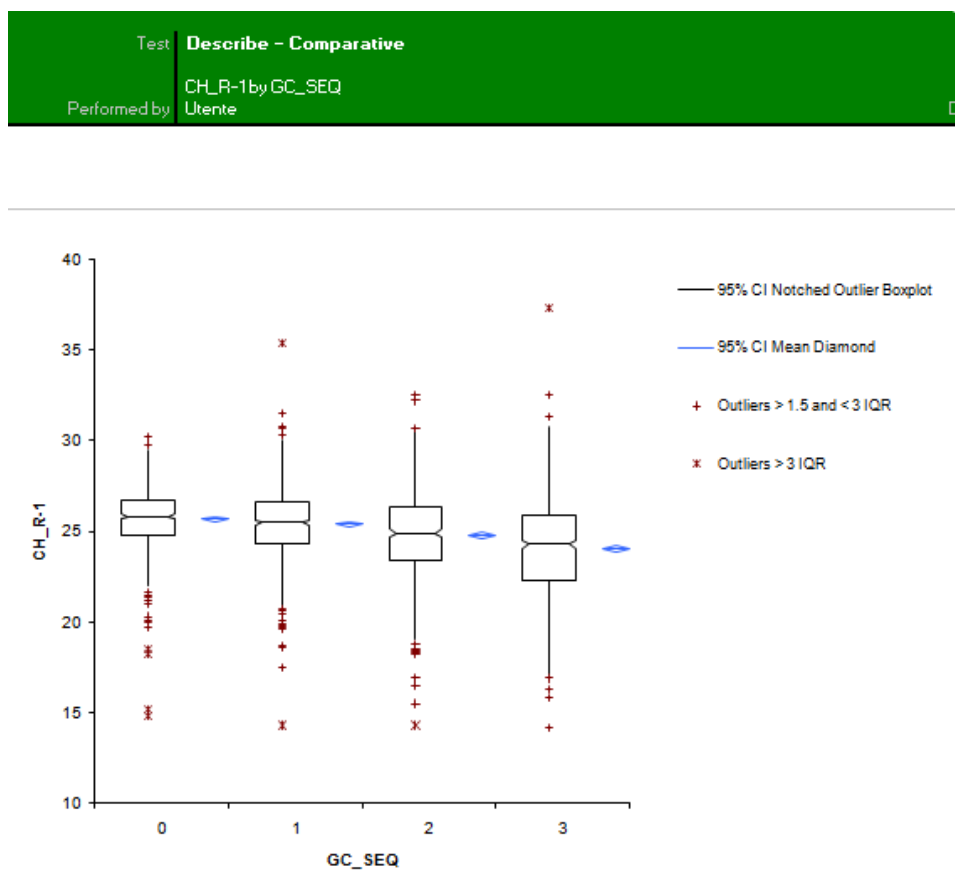
  

Tukey			
Contrast	Difference	95% CI	
0 v 1	0.82	-0.23 to 1.87	
0 v 2	2.39	1.32 to 3.46	(significant)
0 v 3	5.40	4.36 to 6.44	(significant)
1 v 2	1.57	0.55 to 2.59	(significant)
1 v 3	4.58	3.59 to 5.57	(significant)
2 v 3	3.01	2.00 to 4.01	(significant)

**Tabella 26: Livelli di significatività relativi alle variazioni del MCVr in corso di infiammazione**

**CHr**

Il contenuto emoglobinico reticolocitario diminuisce progressivamente con l'incremento della flogosi (figura 28), con valori medi e mediani ancora compresi all'interno dell'intervallo di riferimento (24.0-27.9 pg, tabella 27). Si osserva comunque una significatività statistica confrontando il gruppo 0 e i gruppo 2 e 3 (tabella 28).



**Figura 27: Variazioni del CHr in rapporto con differenti condizioni infiammatorie**

CH_LR-1byGC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	675	25.68	25.55 to 25.81	0.065	1.684
1	814	25.41	25.28 to 25.53	0.066	1.875
2	764	24.78	24.62 to 24.95	0.084	2.323
3	848	24.06	23.89 to 24.24	0.089	2.591

CH_LR-1byGC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	675	14.8	24.80	25.80	25.70 to 26.00	26.70	30.2	1.90
1	814	14.3	24.30	25.50	25.30 to 25.60	26.60	35.4	2.30
2	764	14.3	23.40	24.90	24.70 to 25.10	26.30	32.5	2.90
3	848	14.2	22.30	24.30	24.00 to 24.50	25.90	37.3	3.60

**Tabella 27: Valori medi e mediani del CHR (pg) in rapporto con differenti gradi di infiammazione**

n | 3101 (cases excluded: 351 due to missing values)

CH_LR-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0	675	25.68	0.065	0.083	1.68
1	814	25.41	0.066	0.076	1.87
2	764	24.78	0.084	0.078	2.32
3	848	24.06	0.089	0.074	2.59

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	1216.45	3	405.48	86.17	<0.0001
Residual	14573.51	3097	4.71		
Total	15789.95	3100			

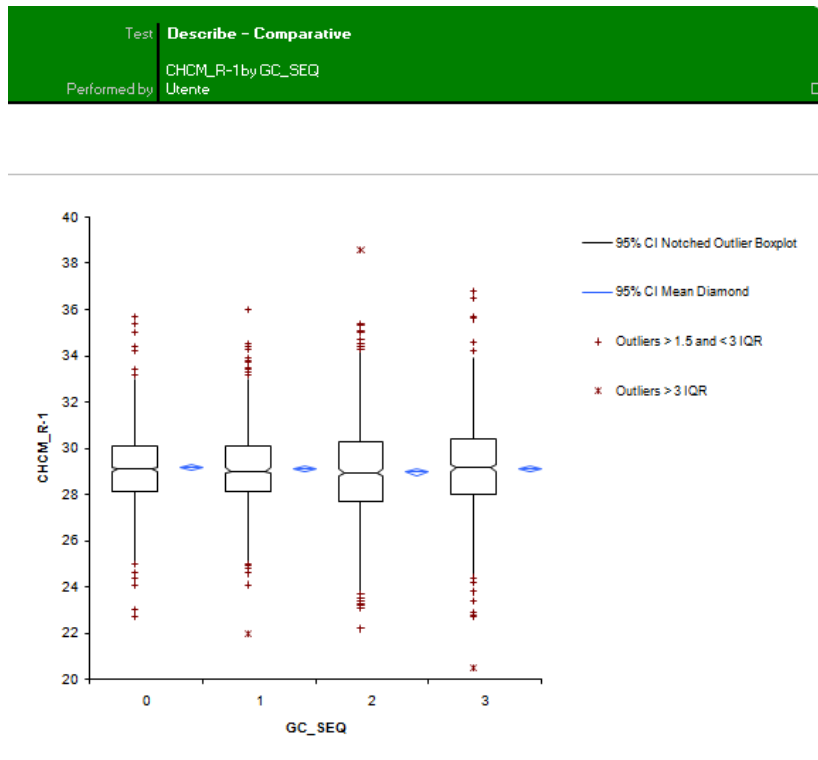
  

Tukey Contrast	Difference	95% CI	
0 v 1	0.28	-0.01 to 0.57	
0 v 2	0.90	0.60 to 1.19	(significant)
0 v 3	1.62	1.33 to 1.91	(significant)
1 v 2	0.62	0.34 to 0.90	(significant)
1 v 3	1.34	1.07 to 1.61	(significant)
2 v 3	0.72	0.44 to 1.00	(significant)

**Tabella 28: Livelli di significatività delle variazioni del CHR in rapporto con differenti gradi di infiammazione**

### CHCMr

Il contenuto emoglobinico corpuscolare medio reticolocitario diminuisce progressivamente con l'aumento dell'infiammazione, fino al gruppo 2. Nel gruppo 3 invece si annota un lieve incremento dei valori medi e con l'incremento della flogosi (figura 29 e tabella 29). La differenza non è però significativa (tabella 30).



**Figura 29: Variazioni del CHCMr in relazione ai differenti livelli di infiammazione**

CHCM_R-1byGC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	675	29.15	29.02 to 29.27	0.064	1.658
1	814	29.12	29.01 to 29.24	0.058	1.641
2	764	28.97	28.82 to 29.11	0.074	2.047
3	848	29.12	28.99 to 29.25	0.067	1.953

CHCM_R-1byGC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	675	22.7	28.10	29.10	29.00 to 29.20	30.10	35.7	2.00
1	814	22.0	28.10	29.00	28.90 to 29.20	30.10	36.0	2.00
2	764	22.2	27.70	28.90	28.80 to 29.10	30.30	38.6	2.60
3	848	20.5	28.00	29.20	29.00 to 29.30	30.40	36.8	2.40

**Tabella 29: Valori medi e mediani del CHCMr (gr/dL)**

n | 3101 (cases excluded: 351 due to missing values)

CHCM_R-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD
0	675	29.15	0.064	0.071	1.66
1	814	29.12	0.058	0.064	1.64
2	764	28.97	0.074	0.067	2.05
3	848	29.12	0.067	0.063	1.95

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	15.83	3	5.28	1.56	0.1968
Residual	10468.65	3097	3.38		
Total	10484.48	3100			

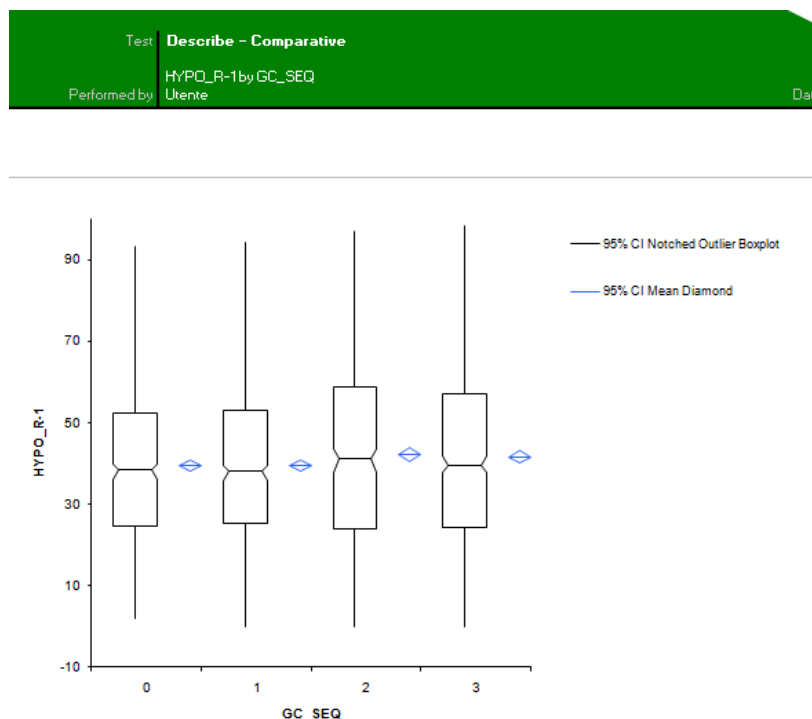
  

Tukey Contrast	Difference	95% CI
0 v 1	0.02	-0.22 to 0.27
0 v 2	0.18	-0.07 to 0.43
0 v 3	0.03	-0.22 to 0.27
1 v 2	0.16	-0.08 to 0.40
1 v 3	0.00	-0.23 to 0.23
2 v 3	-0.16	-0.39 to 0.08

**Tabella 30: Livelli di significatività del CHCMr in relazione a differenti condizioni infiammatorie**

### Hypo r %

La percentuale di reticolociti ipocromici rimane stabile nel gruppo 0 e 1 (figura 30) e aumenta in modo statisticamente significativo nei gruppi 2 e 3 (tabella 31 e 32).



**Figura 30: Variazioni dei reticolociti ipocromici (Hypo r %) in relazione a differenti stati di infiammazione**

HYPQ_R-1by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	675	39.52	38.08 to 40.95	0.730	18.973
1	814	39.47	38.15 to 40.80	0.675	19.263
2	764	42.19	40.61 to 43.78	0.807	22.302
3	848	41.54	40.09 to 42.99	0.741	21.566

HYPQ_R-1by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	675	1.9	24.52	38.40	35.90 to 39.70	52.20	93.1	27.68
1	814	0.0	25.29	38.20	35.60 to 39.60	53.11	94.1	27.82
2	764	0.0	23.94	41.15	37.70 to 43.40	58.72	97.0	34.78
3	848	0.0	24.10	39.50	37.90 to 41.80	57.10	98.2	33.00

**Tabella 31: Valori medi e mediani relativi alla percentuale di reticolociti ipocromici in relazioni a differenti stati infiammatori**

n		3101 (cases excluded: 351 due to missing values)				
HYPO_R-1 by GC_SEQ	n	Mean	SE	Pooled SE	SD	
0	675	39.52	0.730	0.794	18.97	
1	814	39.47	0.675	0.723	19.26	
2	764	42.19	0.807	0.746	22.30	
3	848	41.54	0.741	0.708	21.57	

Source of variation	Sum squares	DF	Mean square	F statistic	p
GC_SEQ	4467.25	3	1489.08	3.50	0.0149
Residual	1317713.57	3097	425.48		
Total	1322180.82	3100			

Tukey		95% CI		
Contrast	Difference			
0 v 1	0.04	-2.72 to 2.80		
0 v 2	-2.68	-5.48 to 0.12		
0 v 3	-2.02	-4.76 to 0.71		
1 v 2	-2.72	-5.39 to -0.05		(significant)
1 v 3	-2.07	-4.67 to 0.54		
2 v 3	0.65	-1.99 to 3.30		

**Tabella 32: Significatività delle variazioni di Hypo r %**

### Micro r%

La percentuale di reticolociti microcitici rimane stabile nel gruppo 0 e 1 (figura 31) e aumenta in modo statisticamente significativo nei gruppi 2 e 3 (tabella 33 e 34).

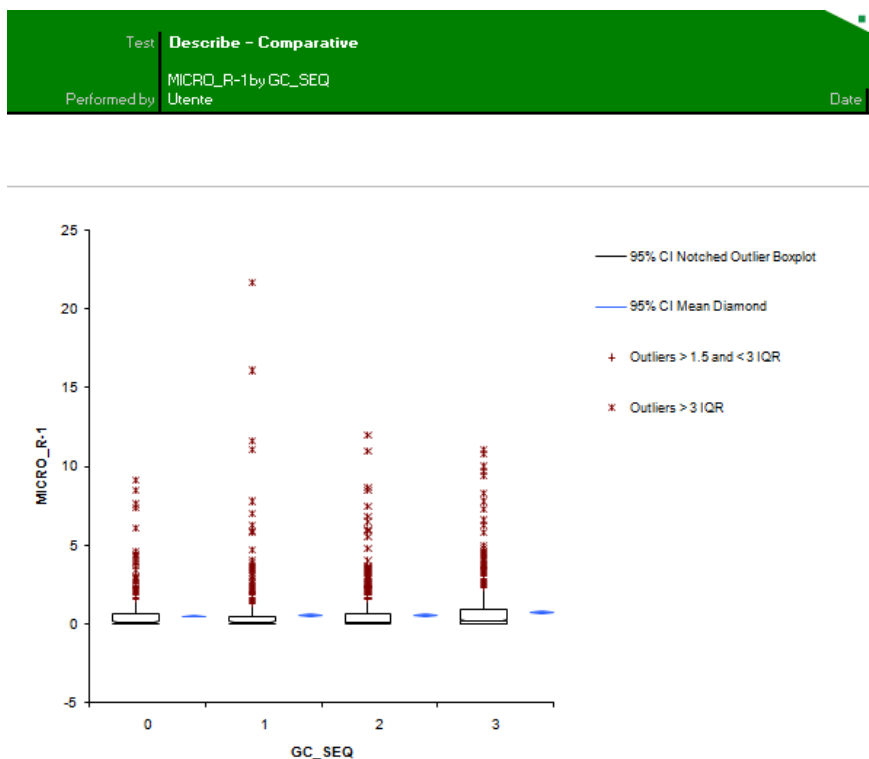


Figura 31: Percentuale di reticolociti microcitici in differenti livelli di infiammazione

MICRO_R-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	675	0.50	0.42 to 0.57	0.039	1.016
1	814	0.51	0.42 to 0.61	0.048	1.357
2	764	0.59	0.50 to 0.67	0.045	1.240
3	848	0.77	0.67 to 0.86	0.049	1.414

MICRO_R-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	675	0.0	0.00	0.10	0.00 to 0.20	0.60	9.1	0.60
1	814	0.0	0.00	0.10	0.00 to 0.20	0.50	21.7	0.50
2	764	0.0	0.00	0.10	0.00 to 0.10	0.60	12.0	0.60
3	848	0.0	0.00	0.20	0.20 to 0.30	0.90	11.1	0.90

Tabella 33: Valori medi e mediani relativi alla percentuale di reticolociti microcitici

MICRO_R-1 by GC_SEQ		n	Rank sum	Mean rank
0		675	1014701.0	1503.26
1		814	1226619.5	1506.90
2		764	1145783.0	1499.72
3		848	1422547.5	1677.53

Kruskal-Wallis' statistic	25.93
X <sup>2</sup> statistic	25.93
DF	3
p	<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)

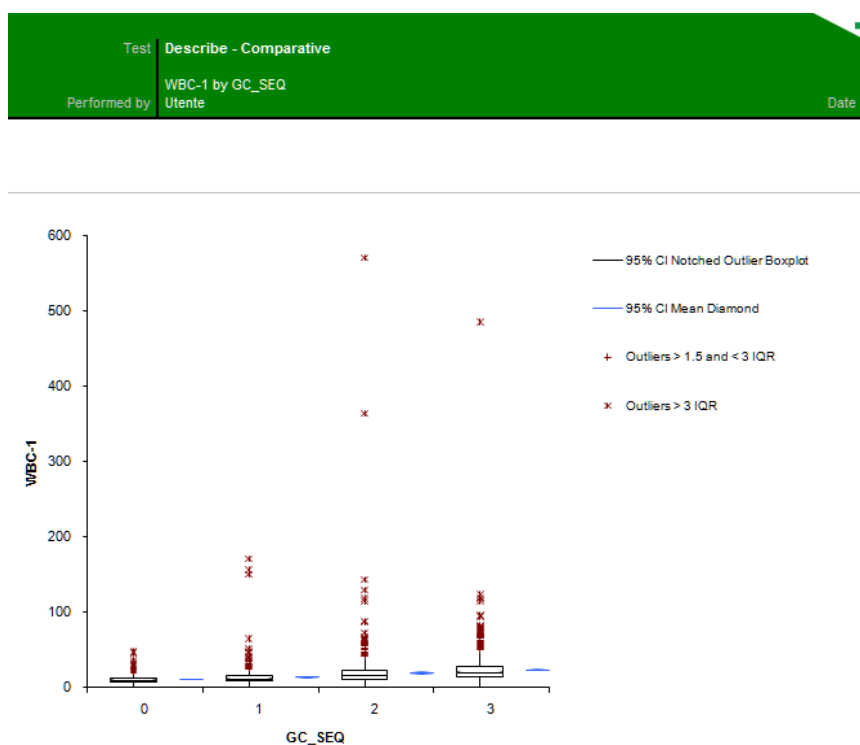
  

Bonferroni		
Contrast	Difference	p
0 v 1	-3.6428	1.0000
0 v 2	3.5448	1.0000
0 v 3	-174.2717	0.0004
1 v 2	7.1876	1.0000
1 v 3	-170.6289	0.0002
2 v 3	-177.8165	0.0002

**Tabella 34: Livelli di significatività statistica delle variazioni percentuali dei reticolociti microciti in relazione a differenti livelli di infiammazione**

## Leucociti

La conta leucocitaria, espressa in cellule x 1000/ $\mu$ L, presenta un progressivo incremento (figura 32) in relazione all'innalzarsi della CRP. Da notare che nei gruppo 0 e 1, la conta media e mediana (tabella 35) risulta all'interno dell'intervallo di riferimento (6.2-14.0). L'incremento è significativo in tutti i gruppi (tabella 36).



**Figura 32: Conta leucocitaria assoluta in differenti livelli di infiammazione**

WBC-1 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	859	10.596	10.293 to 10.899	0.1544	4.5261
1	857	13.523	12.802 to 14.245	0.3674	10.7564
2	858	20.121	18.377 to 21.866	0.8887	26.0321
3	861	23.557	22.083 to 25.030	0.7506	22.0257

WBC-1 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	859	1.97	7.730	9.830	9.430 to 10.010	12.538	47.16	4.808
1	857	2.10	8.947	11.430	11.130 to 11.930	15.417	170.70	6.470
2	858	0.90	10.838	15.920	15.080 to 16.690	23.183	570.10	12.344
3	861	0.53	13.927	19.820	18.900 to 20.800	28.107	485.20	14.180

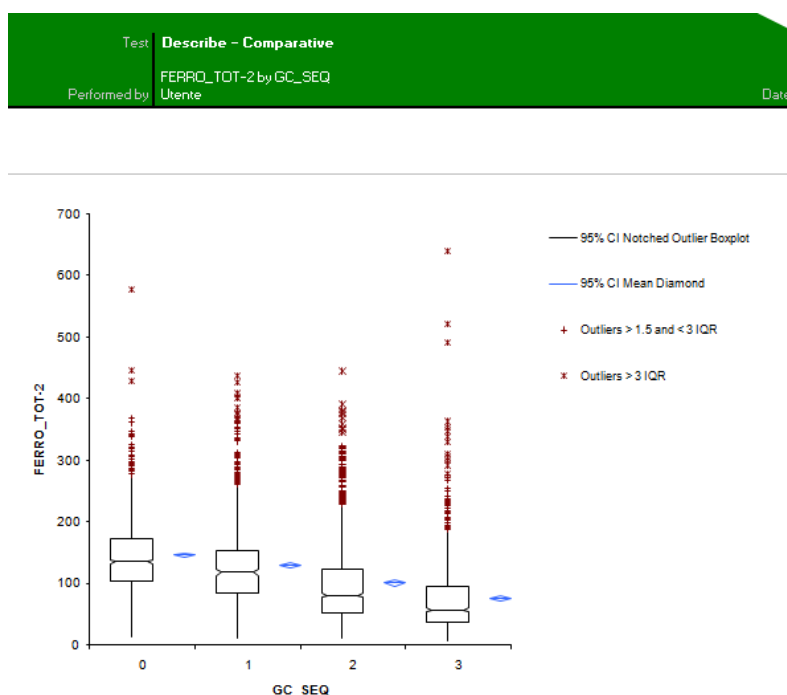
**Tabella 35: Valori medi e mediani dell'infiammazione in relazione a differenti livelli di infiammazione**

n		3435 (cases excluded: 17 due to missing values)		
WBC-1 by GC_SEQ				
	n	Rank sum	Mean rank	
0	859	939981.0	1094.27	
1	857	1258379.5	1468.35	
2	858	1717339.5	2001.56	
3	861	1985630.0	2306.19	
Kruskal-Wallis' statistic		767.07		
X <sup>2</sup> statistic		767.07		
DF		3		
p		<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni				
Contrast	Difference	p		
0 v 1	-374.0806	<0.0001		
0 v 2	-907.2876	<0.0001		
0 v 3	-1211.9169	<0.0001		
1 v 2	-533.2070	<0.0001		
1 v 3	-837.8363	<0.0001		
2 v 3	-304.6293	<0.0001		

**Tabella 36: Livelli di significatività della conta leucocitaria in rapporto con uno stato infiammatorio di progressiva intensità**

## Sideremia

La sideremia diminuisce in modo evidente (figura 33) proporzionalmente rispetto all'incremento dello stato infiammatorio: i cani del gruppo 3 ad esempio presentano valori medi di sideremia che sono circa il 50% rispetto a quelli appartenenti al gruppo 0 (tabella 37). E' evidente la correlazione statistica tra l'incremento dell'infiammazione e la diminuzione della sideremia (tabella 38).



**Figura 33: Variazioni della sideremia in rapporto all'incremento dello stato infiammatorio**

FERRO_TOT-2 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	862	145.8	141.7 to 149.8	2.05	60.22
1	863	130.0	125.5 to 134.6	2.32	68.17
2	861	100.5	95.8 to 105.2	2.41	70.81
3	862	76.0	71.8 to 80.3	2.16	63.31

FERRO_TOT-2 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	862	14	104.0	135.0	131.0 to 139.0	173.0	577	69.0
1	863	11	84.0	118.0	113.0 to 122.0	154.0	437	70.0
2	861	11	53.0	80.0	77.0 to 84.0	123.0	445	70.0
3	862	7	36.0	57.0	54.0 to 61.0	96.0	640	60.0

**Tabella 29: Valori medi e mediani della sideremia (mcg/dL) in relazione con crescenti livelli di infiammazione**

n		3448 (cases excluded: 4 due to missing values)		
FERRO_TOT-2 by GC_SEQ				
	n	Rank sum	Mean rank	
0	862	2003561.0	2324.32	
1	863	1748299.0	2025.84	
2	861	1271641.0	1476.93	
3	862	922575.0	1070.27	
Kruskal-Wallis' statistic		817.59		
X <sup>2</sup> statistic		817.59		
DF		3		
p		<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni				
Contrast	Difference	p		
0 v 1	298.4778	<0.0001		
0 v 2	847.3817	<0.0001		
0 v 3	1254.0441	<0.0001		
1 v 2	548.9040	<0.0001		
1 v 3	955.5663	<0.0001		
2 v 3	406.6623	<0.0001		

**Tabella 30: Livelli di significatività della sideremia in relazione all'incremento dello stato infiammatorio**

### Ferritinemia

La ferritinemia aumenta in modo proporzionale all'incremento della CRP (figura 34, tabella 39) in tutti i gruppi, con evidente significatività statistica (tabella 40). La ferritinemia media è superiore all'intervallo di riferimento (85-286 ng/ml) nei gruppi 2 e 3 (tabella 39).

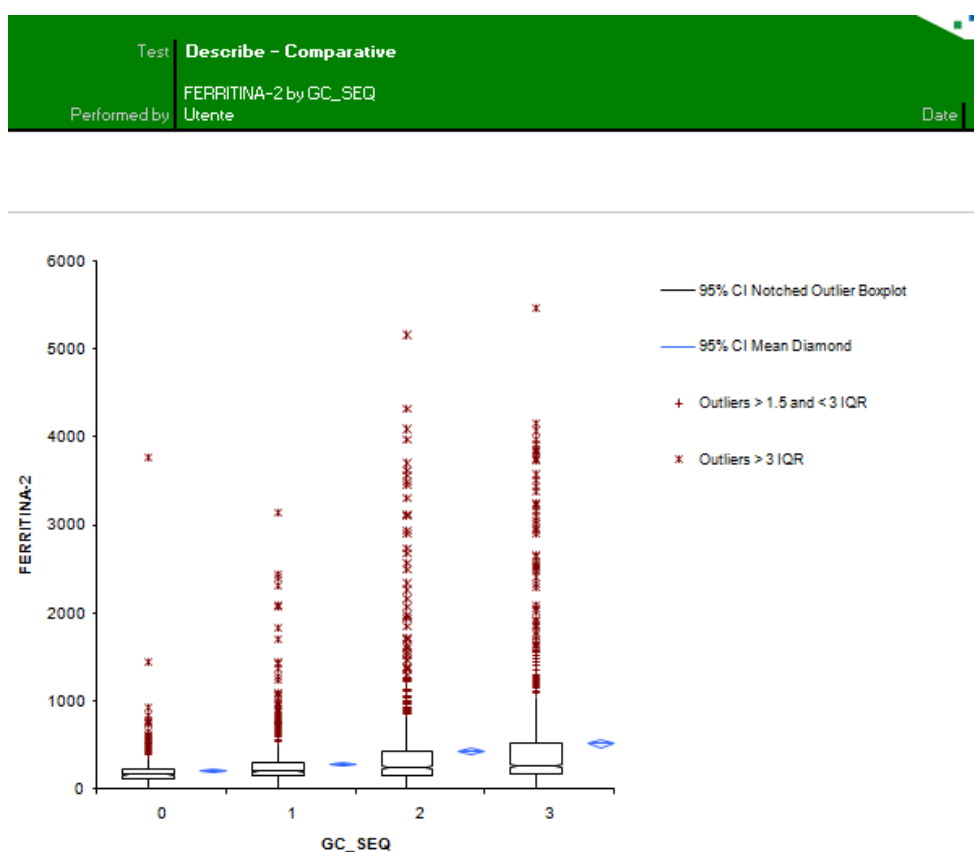


Figura 28: Variazioni della ferritinemia in rapporto con l'entità dello stato infiammatorio

FERRITINA-2 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	644	200.7	185.7 to 215.6	7.60	192.87
1	796	275.1	255.7 to 294.5	9.89	279.09
2	748	429.5	387.0 to 472.1	21.67	592.78
3	845	516.2	468.4 to 564.0	24.35	707.74

FERRITINA-2 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	644	22	119.0	161.0	156.0 to 167.0	222.6	3760	103.6
1	796	1	147.0	198.0	190.0 to 205.0	302.6	3139	155.6
2	748	8	154.4	245.0	225.0 to 263.0	435.0	5161	280.6
3	845	22	168.0	270.0	250.0 to 283.0	523.3	5470	355.3

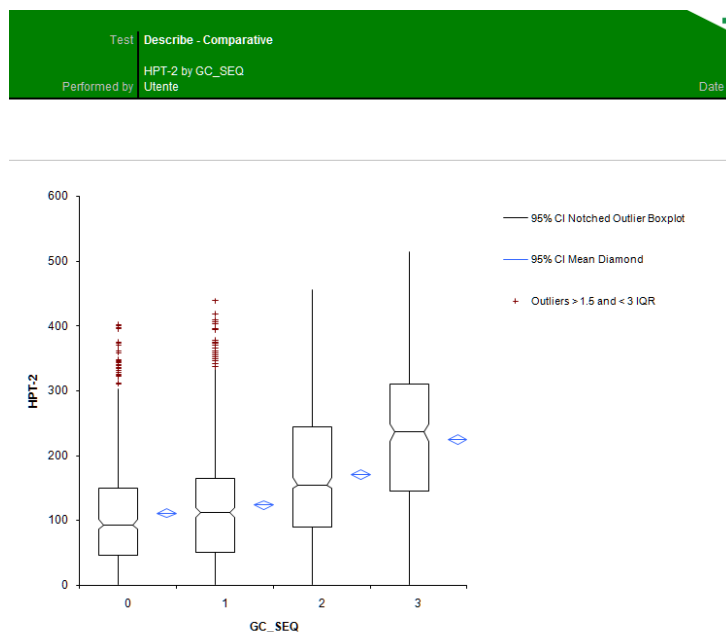
Tabella 39: Valori medi e mediani della ferritinemia (ng/ml) in rapporto all'entità dello stato infiammatorio

n	3033 (cases excluded: 419 due to missing values)		
FERRITINA-2 by GC_SEQ			
	n	Rank sum	Mean rank
0	644	705999.5	1096.27
1	796	1139673.5	1431.75
2	748	1247536.0	1667.83
3	845	1507852.0	1784.44
Kruskal-Wallis' statistic			
	257.21		
X <sup>2</sup> statistic			
	257.21		
DF			
	3		
p			
	<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni			
Contrast	Difference	p	
0 v 1	-335.4781	<0.0001	
0 v 2	-571.5564	<0.0001	
0 v 3	-688.1677	<0.0001	
1 v 2	-236.0782	<0.0001	
1 v 3	-352.6896	<0.0001	
2 v 3	-116.6114	0.0337	

**Tabella 40: significatività statistica della ferritinemia in rapporto con crescenti livelli di infiammazione**

### ***Aptoglobina (HPT)***

L'aptoglobina sierica aumenta progressivamente ed in modo significativo in relazione all'aumento della CRP (figura 35 e tabella 41 e 42). Il valore medio è superiore all'intervallo di riferimento (1-96 mg/dL) in tutti i gruppi, il mediano nei gruppi 1, 2, e3.



**Figura 295: Comportamento dell'HPT sierica in rapporto con differenti stati infiammatori**

HPT-2 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	648	110.9	104.2 to 117.7	3.44	87.65
1	798	123.7	117.2 to 130.1	3.27	92.48
2	751	170.4	162.9 to 177.8	3.80	104.16
3	844	224.9	217.6 to 232.3	3.74	108.67

HPT-2 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	648	1	46.4	93.0	87.0 to 102.0	149.6	402	103.2
1	798	1	51.0	111.5	104.0 to 119.0	165.1	439	114.1
2	751	1	90.0	155.0	149.0 to 167.0	244.0	456	154.0
3	844	1	145.0	237.5	222.0 to 249.0	310.0	514	165.0

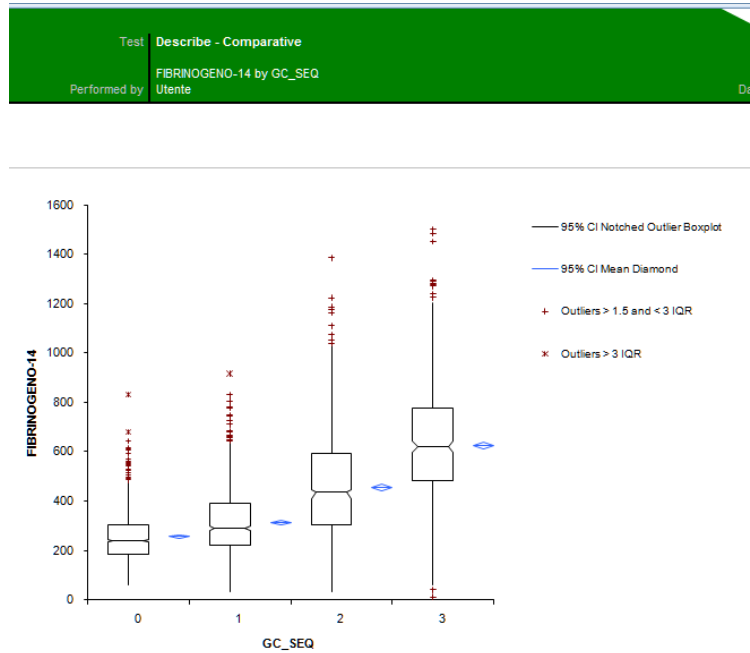
**Tabella 41: Valori medi e mediani dell'HPT (mg/dL) in relazione a differenti stati infiammatori, classificati in base ai livelli di CRP**

n	3041 (cases excluded: 411 due to missing values)		
HPT-2 by GC_SEQ	n	Rank sum	Mean rank
0	648	720766.5	1112.29
1	798	980486.0	1228.68
2	751	1215600.0	1618.64
3	844	1708508.5	2024.30
Kruskal-Wallis' statistic	515.50		
X <sup>2</sup> statistic	515.50		
DF	3		
p	<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni			
Contrast	Difference	p	
0 v 1	-116.3852	0.0360	
0 v 2	-506.3478	<0.0001	
0 v 3	-912.0052	<0.0001	
1 v 2	-389.9626	<0.0001	
1 v 3	-795.6200	<0.0001	
2 v 3	-405.6574	<0.0001	

**Tabella 42: Livelli di significatività dell'HPT in relazione a progressivi valori di CRP**

## Fibrinogeno

Il fibrinogeno plasmatico aumenta progressivamente (figura 36) e significativamente nei gruppi in rapporto con l'aumento dell'infiammazione definito dalla CRP (tabella 43 e 44).



**Figura 36: Fibrinogenemia in rapporto a differenti stati infiammatori definiti da progressivi valori di CRP**

FIBRINOGENO-14 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	849	256.83	250.15 to 263.51	3.403	99.141
1	851	315.31	306.26 to 324.36	4.612	134.538
2	854	456.73	442.03 to 471.43	7.488	218.826
3	856	625.31	609.49 to 641.14	8.063	235.913

FIBRINOGENO-14 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	849	60.0	185.67	240.00	233.00 to 246.00	306.00	832.0	120.33
1	851	35.0	221.17	290.00	282.00 to 300.00	390.00	918.0	168.83
2	854	35.0	304.92	435.00	410.00 to 448.00	595.08	1386.0	290.17
3	856	12.3	483.00	620.00	599.00 to 644.00	777.00	1500.0	294.00

**Tabella 43: Valori medi e mediani della fibrinogenemia plasmatica (in mg/dL)**

FIBRINOGENO-14 by GC_SEQ		n	Rank sum	Mean rank
0		849	823257.0	969.68
1		851	1131189.5	1329.25
2		854	1668714.0	1954.00
3		856	2192594.5	2561.44

Kruskal-Wallis' statistic	1299.95
X <sup>2</sup> statistic	1299.95
DF	3
p	<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)

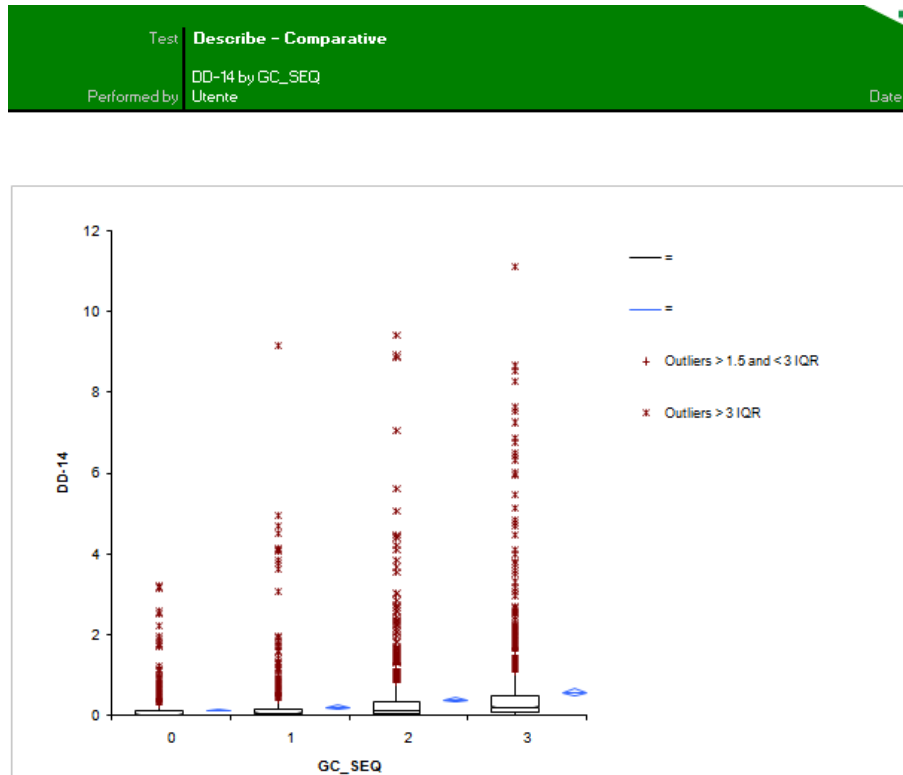
  

Bonferroni		
Contrast	Difference	p
0 v 1	-359.5689	<0.0001
0 v 2	-984.3192	<0.0001
0 v 3	-1591.7637	<0.0001
1 v 2	-624.7503	<0.0001
1 v 3	-1232.1948	<0.0001
2 v 3	-607.4445	<0.0001

**Tabella 31: Livelli di significatività della fibrinogenemia in relazione a differenti valori di CRP**

### ***D-Dimeri plasmatici***

I D-Dimeri plasmatici presentano un netto incremento con l'innalzarsi dello stato infiammatorio (figura 37 e tabella 45). L'incremento è significativo dal punto di vista statistico in tutti i gruppi (tabella 46).



**Figura 37: D-Dimeri plasmatici in relazione a differenti livelli di infiammazione**

DD-14 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	846	0.127	0.107 to 0.148	0.0105	0.3058
1	852	0.209	0.169 to 0.249	0.0203	0.5933
2	853	0.390	0.332 to 0.449	0.0298	0.8700
3	855	0.573	0.494 to 0.653	0.0404	1.1799

DD-14 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	846	0.01	0.010	0.020	0.010 to 0.030	0.110	3.20	0.100
1	852	0.01	0.010	0.060	0.050 to 0.070	0.150	9.16	0.140
2	853	0.01	0.040	0.120	0.100 to 0.130	0.353	9.41	0.313
3	855	0.01	0.080	0.200	0.180 to 0.220	0.480	11.12	0.400

**Tabella 45: D-Dimeri plasmatici (mcg/mL) in relazioni a differenti livelli di infiammazione**

n		3406 (cases excluded: 46 due to missing values)		
DD-14 by GC_SEQ				
	n	Rank sum	Mean rank	
0	846	1024221.5	1210.66	
1	852	1262164.5	1481.41	
2	853	1613801.0	1891.91	
3	855	1901934.0	2224.48	
Kruskal-Wallis' statistic		535.96		
$\chi^2$ statistic		535.96		
DF		3		
p		<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni				
Contrast	Difference	p		
0 v 1	-270.7500	<0.0001		
0 v 2	-681.2484	<0.0001		
0 v 3	-1013.8205	<0.0001		
1 v 2	-410.4983	<0.0001		
1 v 3	-743.0705	<0.0001		
2 v 3	-332.5721	<0.0001		

**Tabella 46: Livelli di significatività statistica in relazione a differenti intensità della flogosi**

## Natremia

La natremia aumenta nel gruppo 1 rispetto allo 0, poi si osserva una diminuzione dei valori medi e mediani tra il gruppo 1 e 2 ed infine il gruppo 3 presenta livelli simili al gruppo 2 (figura 38 e tabella 47). E' significativo l'incremento tra il gruppo 0 e 1 e il decremento dall'gruppo 1 al 2 (figura 48).

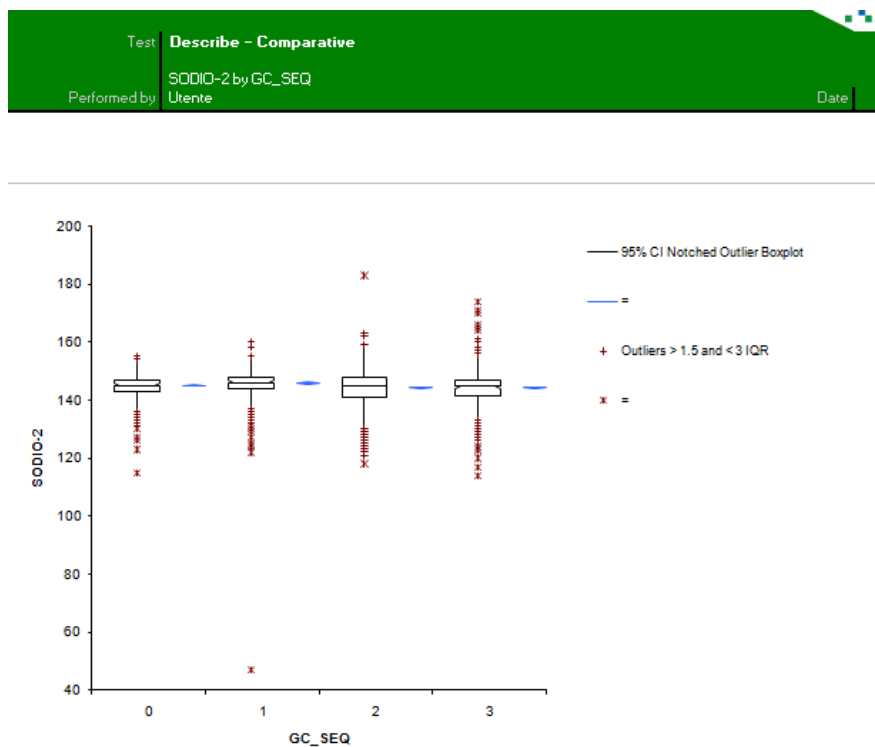


Figura 38: Variazioni della natremia in rapporto con differenti livelli di infiammazione

SODIO-2 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	862	144.30	144.64 to 145.16	0.132	3.884
1	863	145.92	145.57 to 146.27	0.179	5.255
2	862	144.16	143.76 to 144.56	0.203	5.948
3	861	144.19	143.79 to 144.59	0.203	5.943

SODIO-2 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	862	115.0	143.00	145.00	145.00 to 146.00	147.00	155.0	4.00
1	863	47.0	144.00	146.00	146.00 to 147.00	148.00	160.0	4.00
2	862	118.0	141.00	145.00	145.00 to 145.00	148.00	183.0	7.00
3	861	114.0	141.67	145.00	144.00 to 145.00	147.00	174.0	5.33

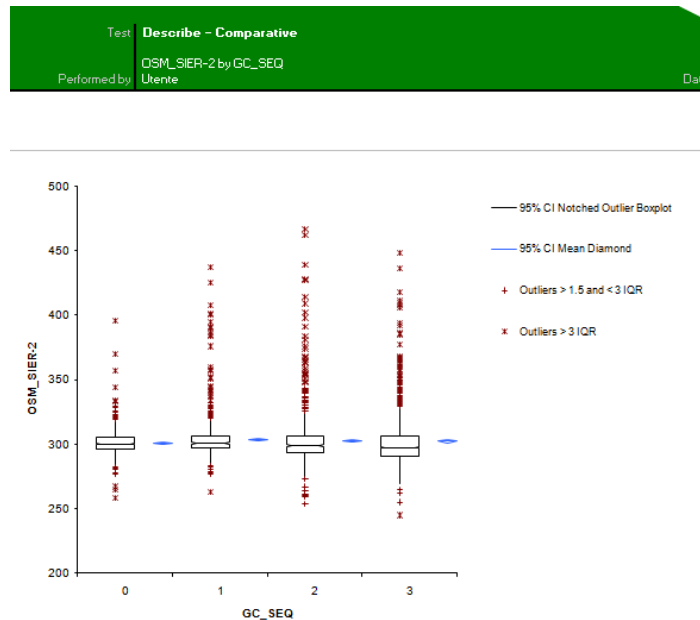
Tabella 47: Valori medi e mediani della natremia (mEq/L) in rapporto con crescenti livelli di infiammazione

n		3448 (cases excluded: 4 due to missing values)		
SODIO-2 by GC_SEQ				
	n	Rank sum	Mean rank	
0	862	1467682.5	1702.65	
1	863	1725781.0	1999.75	
2	862	1403830.0	1628.57	
3	861	1348782.5	1566.53	
Kruskal-Wallis' statistic				
	96.67			
$\chi^2$ statistic				
	96.67			
DF				
	3			
p				
	<0.0001	(chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni				
Contrast	Difference	p		
0 v 1	-297.0983	<0.0001		
0 v 2	74.0748	0.6975		
0 v 3	136.1177	0.0235		
1 v 2	371.1731	<0.0001		
1 v 3	433.2160	<0.0001		
2 v 3	62.0429	1.0000		

**Tabella 48: Livelli di significatività della natremia in rapporto con crescenti livelli di infiammazione**

### Osmolalità sierica misurata

Si osserva un modesto incremento tra il gruppo 0 e il gruppo 1 e una diminuzione significativa paragonando quest'ultimo con il 2. Il gruppo 3 presenta valori di osmolalità sierica simili a quello del gruppo 2 (figura 39 e tabelle 49 e 50).



**Figura 39: Livelli di osmolalità sierica misurata rapportata a differenti intensità dello stato infiammatorio**

OSM_SIER-2 by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	846	300.9	300.2 to 301.5	0.31	9.14
1	853	303.6	302.5 to 304.6	0.52	15.21
2	851	302.6	301.2 to 303.9	0.70	20.43
3	841	302.4	300.9 to 303.9	0.75	21.65

OSM_SIER-2 by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	846	258	296.0	300.0	300.0 to 301.0	305.0	396	9.0
1	853	263	297.0	301.0	300.0 to 302.0	306.0	437	9.0
2	851	254	293.0	293.0	298.0 to 300.0	306.0	467	13.0
3	841	245	291.0	297.0	297.0 to 298.0	306.0	448	15.0

**Tabella49: Valori medi e mediani dell'osmolalità sierica misurata in relazione con differenti intensità dello stato infiammatorio**

n	3391 (cases excluded: 61 due to missing values)		
OSM_SIER-2 by GC_SEQ	n	Rank sum	Mean rank
0	846	1483860.5	1753.97
1	853	1603930.5	1880.34
2	851	1389206.0	1632.44
3	841	1274139.0	1515.03
Kruskal-Wallis' statistic	65.62		
X <sup>2</sup> statistic	65.62		
DF	3		
p	<0.0001 (chisqr approximation, corrected for ties)		
Bonferroni			
Contrast	Difference	p	
0 v 1	-126.3683	0.0435	
0 v 2	121.5327	0.0591	
0 v 3	238.9437	<0.0001	
1 v 2	247.9011	<0.0001	
1 v 3	365.3120	<0.0001	
2 v 3	117.4109	0.0767	

**Tabella 50: Livelli di significatività delle variazioni dell'osmolalità sierica misurata in rapporto con differenti livelli di infiammazione**

## **Discussione e conclusioni**

Già nel 1946 era stata descritta la comparsa di ipoferremia ed anemia nei cani da esperimento dopo aver provocato un ascesso sterile (Cartwright et al., 1946). Tale fenomeno è stato successivamente motivato dall'attivazione di un processo estremamente complesso ed "antico" dal punto di vista evuzionistico, presente in tutte le specie animali, pesci compresi (Zarychanski & Houston, 2008). La capacità di utilizzare il ferro dell'ospite si collega direttamente alla sopravvivenza e patogenicità di batteri, funghi e parassiti, con l'eccezione di *B. burgdorferi*. Ne consegue che sottrarre il ferro ad agenti infettivi invasori rappresenta una strategia difensiva importante, chiamata "immunità nutrizionale" (Gantz, 2009, Nairz et al., 2010). Il ferro viene sequestrato nel sistema reticolo-endoteliale grazie alla liberazione dell'epcidina da parte degli epatociti, che a loro volta sono stimolati principalmente dalla interleukina 6. Altri fattori che collaborano alla genesi dell'anemia sono l'azione inibente esercitata dalle citokine e dalle APPs sulla proliferazione e differenziazione delle cellule eritroidi e un'inadeguata produzione di EPO, associata ad una sua minore attività biologica. Infine si deve considerare una riduzione dell'emivita reticolocitaria (Weiss, 2008, Price & Schrier, 2010).

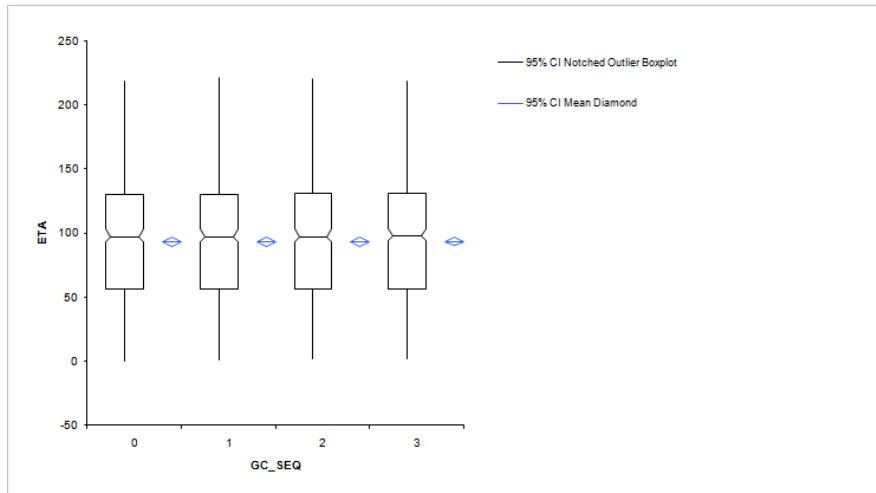
In medicina umana l'infiammazione viene considerata la principale causa di anemia dopo le forme carenziali sideropeniche (Ganz, 2010; Metha & Hoffbrand, 2011). Si presenta nel 8-95% dei pazienti che soffrono di infezioni neoplasie e malattie autoimmuni (Weiss, 2008).

Nel cane l'anemia da carenza di ferro è considerata relativamente frequente nelle regioni temperate dove sono comuni infestazioni gravi da parassiti ematofagi (Harvey, 2008, Weiss, 2010) ma sicuramente non riveste il ruolo epidemico descritto in medicina umana, dove viene riscontrata almeno nel 16% delle donne in età riproduttivo nel mondo occidentale e con prevalenze molto superiori nei Paesi sottosviluppati (Clark, 2008). Ne consegue che, almeno dal punto di vista teorico, l'anemia da infiammazione nel cane dovrebbe essere considerata una patologia di primaria importanza. In realtà le informazioni disponibili nella letteratura veterinaria provengono quasi esclusivamente da

modelli sperimentali di infiammazione, i più recente dei quali risalgono al 1983 (Weiss & Krehbiel, 1983, Weiss et al., 1983) oppure a infezioni, sempre sperimentali, come ad esempio quelle indotte da *Anaplasma platys* (Baker et al., 1988). Correttamente, a nostro avviso nel attuale testo di riferimento per l'ematologia veterinaria si segnala che, nonostante sia opinione generale che l'anemia da infiammazione sia un'entità clinica comune, la relazione tra anemia ed infiammazione ha ricevuto scarsa attenzione (Fry, 2010). Lo scopo del presente lavoro è stato quindi quello di definire la prevalenza dell'anemia in una popolazione non selezionata di cani portati alla visita presso una Clinica Veterinaria e successivamente di delineare un'associazione tra infiammazione ed anemia. Utilizzando come parametro la concentrazione dell'Hgb e fissando a 13 gr/dL la soglia per definire uno stato di anemia, si è notato che è da considerare anemico il 23.4% dei cani indagati per ragioni cliniche. E' complesso paragonare questo rilevante dato con quanto presente in letteratura, considerando l'influenza del segnalamento dei soggetti e le motivazioni che hanno portato all'esecuzione del test. In un laboratorio di analisi, considerando 1022 campioni, presumibilmente provenienti sia da animali ammalati che sani, si presentava uno stato di anemia nel 7.7% dei casi (Comazzi et al., 2004). In due differenti popolazioni di cani esaminate alla Michigan State University l'anemia era presente nel 13-29% dei casi (Weiss & Tvedten, 2004). L'anemia in animali portati alla visita deve essere considerata un evento frequente e deve attirare l'attenzione del clinico, sia perché, come vedremo oltre, si associa spesso ad una patologia infiammatoria, sia perché, come ad esempio dimostrato in oncologia umana, determina una diminuzione della qualità della vita (Ludwig, 2008). Il proseguimento dello studio ha riguardato l'associazione tra anemia e l'infiammazione. Per indagare l'impatto della flogosi sull'eritrono, si è reso necessario selezionare un biomarker che potesse esprimere in senso anche quantitativo l'intensità della stessa e che fosse slegato dall'evento causale dell'infiammazione stessa. La CRP risponde a questi requisiti, considerando è stato dimostrato l'incremento in seguito a numerose patologie, con valori proporzionali alla

gravità e all'intensità della malattia di fondo (Gebhardt et al., 2009), come ad esempio dimostrato nelle artriti immunomediate (Kjelgaard-Hansen et al., 2006).

Definita la CRP sierica come marcatore di infiammazione, sono stati creati 4 gruppi, differenziati per i valori di CRP (vedi tabella 5), con il gruppo 0 che corrisponde all'intervallo di riferimento, mentre nel gruppo 1 sono presenti valori superiori fino a 10 volte il limite massimo, nel 2 sono inseriti valori di 10-30 volte superiori e infine nel gruppo 3 sono inseriti i valori compresi tra 30 e 120 volte rispetto alla normalità. Partendo dal dato della CRP, i 22669 cani esaminati presso la Clinica Veterinaria San Marco venivano stratificati nei quattro gruppi. Il Gruppo 0 era rappresentato da 2930 cani considerati ammalati dal proprietario o dal medico veterinario che aveva eseguito la prima visita. Le condizioni patologiche di fondo non vengono qui presentate; comunque anche altri Autori sono stati in grado di definire una popolazione di cani ammalati e che presentavano valori sierici di CRP nella norma (Nakamura et al., 2008). Grazie ad uno specifico database, appositamente adattato a tale scopo, si potevano selezionare 863 cani nel gruppo 0 per i quali erano disponibili cani simili per razza, sesso ed età. In mancanza di un corrispettivo per razza, veniva selezionato un meticcio, che fosse comparabile per età e sesso, ammettendo una differenza di peso di  $\pm 5$ kg. Un esempio che testimonia la qualità del processo comparativo è osservabile nella tabella 51, dove si può notare l'equivalenza del peso (valori medi e mediani) nei quattro gruppi.



ETA by GC_SEQ	n	Mean	95% CI	SE	SD
0	863	93.3	89.9 to 96.6	1.71	50.22
1	863	93.2	89.8 to 96.6	1.71	50.25
2	863	93.2	89.9 to 96.6	1.71	50.17
3	863	93.3	89.9 to 96.7	1.71	50.35

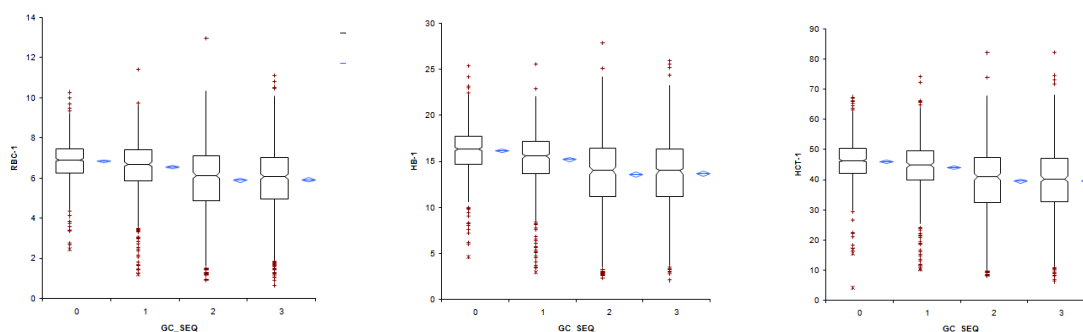
  

ETA by GC_SEQ	n	Min	1st Quartile	Median	95% CI	3rd Quartile	Max	IQR
0	863	0	56.0	97.0	93.0 to 103.0	130.0	219	74.0
1	863	1	56.0	97.0	93.0 to 103.0	130.0	221	74.0
2	863	2	56.0	97.0	93.0 to 103.0	131.0	220	75.0
3	863	2	56.0	98.0	94.0 to 103.0	131.0	219	75.0

**Tabella 51: Comparazione del peso dei cani presenti nei quattro gruppi distinti per livelli di infiammazione**

La qualità del cross-match, che prevede la presenza di animali pressoché identici distribuiti uniformemente nei quattro gruppi, ha permesso di eliminare alcuni dei principali *bias* legati, ad esempio alle differenze emato-biochimiche relative all'età. E' stato infatti descritto che esistono significative variazioni relative alle caratteristiche ematologiche tra gli animali pediatrici e gli adulti e anche tra giovanissimi animali, ma appartenenti a razze differenti (Bird, 2011).

Per quanto riguarda la valutazione degli eritrociti maturi in relazione all'aumentare dell'intensità della infiammazione, si nota una progressiva diminuzione sia per quanto riguarda la conta eritrocitaria, che l'emoglobinemia che l'ematocrito. Le immagini dei relativi boxplot è riportata nella figura 39.



**Figura 40: Boxplot delle variazioni della conta eritrocitaria (dx), dell'emoglobinemia (centro) e dell'ematocrito (sx)**

Per quanto riguarda la relazione con gli intervalli di riferimento, si osserva che la conta eritrocitaria rimane all'interno dei valori della normalità, seppure in prossimità del limite minimo. L'emoglobinemia media è inferiore all'intervallo già nel gruppo 1, mentre la mediana lo diventa dal gruppo 2 compreso. L'ematocrito è all'interno dell'intervallo in tutti i gruppi. Considerando che per definire una condizione di anemia è sufficiente la diminuzione al di sotto dell'intervallo di uno dei tre parametri fin qui descritti (Means & Glader, 2009) e l'Organizzazione Mondiale della Sanità considera prioritario l'utilizzo proprio dell'emoglobinemia per definire l'anemia (Ervasti, 2008), possiamo concludere che è stabilita nel cane un'associazione tra infiammazione ed anemia, di progressiva gravità con l'aumentare della flogosi. A nostra conoscenza, nella letteratura veterinaria consultata, non era mai stato stabilito un legame tra gravità della flogosi ed intensità della stessa, mentre ciò è un concetto ben definito in medicina umana (Weiss, 2008; Means, 2009). Per una corretta classificazione dell'anemia si rende necessario un approccio tramite vari parametri, quali le caratteristiche volumetriche degli eritrociti, le concentrazioni emoglobiniche e l'intensità della rigenerazione. Ulteriori informazioni possono provenire dalla morfologia eritrocitaria e dell'eziologia sottostante (Tvedten, 2010).

Per quanto riguarda il volume eritrocitario (MCV), si osserva che tale parametro presenta una diminuzione modesta dei valori medi e mediani, non associati però ad una significatività. Per quanto riguarda il contenuto emoglobinico medio cellulare (MCHC), si osserva una diminuzione, ma rimanendo all'interno dell'intervallo di riferimento. Questo

parametro, risultato di due differenti calcoli, però riveste uno scarso interesse per valutare l'emoglobinizzazione eritrocitaria e in medicina umana viene solitamente utilizzato solo per valutare la turbidità del campione (Ryan, 2010). Il sistema ADVIA 2120® fornisce un parametro chiamato CH, dettagliato precedentemente, che viene derivato dalla media del contenuto emoglobinico delle singole cellule moltiplicato per popolazione eritrocitaria e viene ritenuto di maggiore valenza diagnostica sia in medicina umana (Bovy et al., 2007; Ryan, 2010) che veterinaria (Prins et al., 2009; Tvedten, 2010). Nella nostra popolazione il CH diminuisce in modo modesto, con una significatività solamente in associazione ai gradi maggiori di infiammazione. Anche la valutazione del CHCM, che esprime la concentrazione emoglobinica cellulare media (Bauer & Moritz, 2008) diminuisce con l'aumentare della flogosi, sempre rimanendo all'interno dell'intervallo di riferimento. Analizzando i dati fino ad ora descritti, possiamo concludere che l'infiammazione determina un'anemia lieve, normocromica e normocitica e ciò coincide con la presentazione attesa dell'anemia da infiammazione in medicina umana (Raj, 2008, Weiss, 2009, Price & Schrier, 2010) e veterinaria (Waner & Harrus, 2000; Harvey, 2008b; Couto, 2008; Fry, 2010).

La patogenesi dell'anemia può essere esplorata analizzando la conta reticolocitaria assoluta, che rappresenta il parametro più efficiente per valutare la risposta rigenerativa (Riley et al., 2002). In medicina veterinaria inoltre mancano studi adeguati che giustifichino l'uso dei parametri calcolati quali la conta reticolocitaria corretta e l'indice reticolocitario (Tvedten, 2010). Nella nostra popolazione si può osservare che la conta reticolocitaria rimane pressoché invariata con il progredire dell'infiammazione ma anche dell'anemia. Un limite all'interpretazione di questo dato è determinata dal fatto che non è stata inserita nella valutazione statistica la distanza temporale tra l'evento anemizante e il prelievo ematico utilizzato per lo studio. Infatti la conta reticolocitaria aumenta nel paziente canino anemico dopo 2-5 gg. (Cowgill et al., 2003) e presenta il suo picco dopo 4-8 gg. dalla comparsa dall'anemia (Tvedten, 2010). Informazioni più dettagliate si possono ottenere dal contenuto emoglobinico (CHr) e dal volume eritrocitario (MCVr). Tali parametri forniscono

informazioni “in tempo reale” relativamente all’attività midollare (Clark, 2009), considerando che l’emivita reticolocitaria nel cane è non superiore ad un giorno in condizioni fisiologiche (Olvert, 2010), ed aumenta con la diminuzione dell’ematocrito. Se in un cane l’evento anemico ha preceduto anche di poche ore il prelievo, sicuramente mancherà una rilevante reticolocitosi, ma un contaglobuli come l’ADVIA deve essere in grado di individuare la rigenerazione. Infatti i reticolociti prodotti secondariamente ad un evento anemizzante acuto si presentano macrocitici, con volumi anche doppi rispetto alla normalità (Riley et al., 2002; Harvey, 2008b; Olver, 2010). L’analisi da noi effettuata fornisce invece differenti indicazioni: il volume reticolocitario diminuisce all’aumentare della flogosi in modo significativo, come pure il CHr. Inoltre aumenta la percentuale di reticolociti ipocromici (HYPO r %) e microcitici (Micro r %). Il CHCMr non presenta variazioni significative, ma questo parametro era risultato, per motivi ignoti, di scarsa utilità anche in caso di anemia ferropriva del cane (Fry & Kirk, 2006). MCVr e CHr confermano l’assenza di una rigenerazione reticolocitaria ed una tendenza alla microcitosi ed ipocromia. In un recente studio era stata denunciata la mancanza di informazioni relativamente al comportamento dei parametri reticolociti in corso di flogosi (Prins et al., 2009) e pertanto, a nostra conoscenza, il presente studio è il primo a presentare informazioni relative al CHr e al MCVr in corso di anemia da infiammazione. Essendo il nostro studio un case control, mancano informazioni relative all’evoluzione della risposta reticolocitaria e più in generale dell’eritrono secondariamente alla risoluzione oppure alla persistenza dell’evento infiammatorio. In caso di attenuazione dell’infiammazione si può prevedere una regressione dell’anemia, prevista in 24 gg. nei cani nei quali era stata indotta un’infiammazione sterile, in 2-39 gg. nei gatti con forme spontanee (Ottenjann et al., 2006) e più in generale in settimane-mesi nei pazienti umani (Metha & Hoffbrand, 2011). Se l’infiammazione persiste, come ad esempio viene osservato in medicina umana in caso di artrite reumatoide, la risposta reticolocitaria microcitica ed ipocromica può portare ad una anemia microcitica ed ipocromica (Hilman et al., 2005; Means, 2009). Non sono disponibili

al momento informazioni in medicina canina relativa al comportamento eritrocitario in modelli spontanei o sperimentali di infiammazione cronica.

Come già riferito in precedenza, la patogenesi dell'anemia da infiammazione risale ad un sequestro del ferro all'interno del sistema reticolo-endoteliale, che si manifesta con una rilevante ipoferremia (Hassan, 2008; Raj, 2009). Tale fenomeno è stato segnalato per la prima volta nel cane da Cartwright et al. (1946) e anche nel presente studio, dove si osserva una diminuzione statisticamente significativa con il progredire dell'infiammazione. Come biomarker di infiammazione però il ferro si dimostra di scarso valore, considerando che i valori medi nel gruppo 1 e 2 sono all'interno del valore di riferimento, quando la CRP denuncia rispettivamente un incremento di 10-30 volte e 30-120. Questo dato è in disaccordo con il lavoro di Neumann (2003), che considera la sideremia un parametro precoce per individuare una risposta infiammatoria ad un'infezione batterica. La selezione dei casi può motivare la discordanza nei dati ottenuti, considerando che la diagnosi di infiammazione era raggiunta considerando un'associazione tra una diagnosi clinica e alterazioni della conta leucocitaria totale e differenziale. In accordo con quanto osservato da Nakamura et al. (2008), nella nostra casistica la conta leucocitaria totale offre scarse informazioni relative alla presenza e all'intensità della flogosi: i valori medi e mediani nel gruppo 1 e 2 e i mediani del gruppo 2 sono all'interno dell'intervallo di riferimento, a fronte dei già indicati incrementi del CRP. L'utilizzo della conta leucocitaria come marcatore per la diagnosi di uno stato infiammatorio porta evidentemente ad individuare correttamente solo pazienti con intenso stato infiammatorio. Oltre ad una scarsa sensibilità, sia la sideremia che la conta leucocitaria offrono scarse informazioni relativamente all'intensità della flogosi. Ad esempio, nella nostra casistica, a fronte di una CRP superiore a 30 volte rispetto al valore massimo, la sideremia diminuisce del 50% circa e la conta leucocitaria semplicemente raddoppia. Tali risultati confermano l'utilità della CRP per la diagnosi e la valutazione dell'intensità della flogosi. A nostra conoscenza, il presente studio è il primo a presentare una correlazione tra entità della flogosi valutata tramite CRP e sideremia.

La ferritinemia in tutti i mammiferi è correlata con le riserve marziali (Orino & Watanebe, 2008) ma la sua interpretazione è resa complessa dal suo comportamento come proteina della fase acuta positiva (Thurnam et al., 2010) e di intensità moderata (Caldin et al., 2010) ed è stata segnalata negli esseri umani una correlazione diretta tra CRP e ferritina (Knovich et al., 2009). Altre cause di aumento delle ferritinemia sono l'emolisi, le epatopatie e le malattie neoplastiche (Friedrichs et al., 2010), tra le quali l'emangiosarcoma (Caldin et al., 2010). Nella nostra popolazione la ferritinemia manifesta chiaramente il suo comportamento come APP moderata, presentando un incremento inferiore come entità e ritardato come insorgenza rispetto alla CRP. In un recente lavoro solo il 40% dei pazienti affetti da uno stato infiammatorio diagnosticato tramite l'osservazione della flogosi in un campione tissutale e/o sulle basi di una patofisiologia nota, presentavano una condizione di iperferritinemia (Friedrichs et al., 2010). Risulta difficile una comparazione con i nostri dati per la mancanza nel lavoro citato di altri biomarker dell'infiammazione ad eccezione della sideremia e per la scarsa numerosità (20) dei pazienti. A nostra conoscenza il nostro studio per la prima volta presenta in un ampio numero di pazienti canini una correlazione tra CRP e ferritinemia.

L'aptoglobina sierica è nel cane una proteina della fase acuta moderata (Eckersall & Bell, 2010). Nel nostro studio si conferma questo comportamento, con incrementi non comparabili rispetto alla CRP. Risulta degno di nota però il rilievo nel gruppo 0, nel quale si osserva un valore medio superiore all'intervallo di riferimento. L'HPT quindi sembrerebbe manifestare una maggiore sensibilità rispetto alla CRP per la diagnosi di una condizione di malattia. Questo fenomeno è reso possibile dalla rilevante produzione di HPT da parte del fegato, secondariamente alla presenza di corticosteroidi endogeni ed esogeni (Caldin et al., 2009), che potrebbero inibire la produzione di CRP nonostante la presenza di patologie infiammatorie/infettive. La peculiarità della risposta delle APP dopo esposizione a corticosteroidi conferma e giustifica la necessità di indagare le condizioni patologiche degli animali utilizzando almeno una APP maggiore ed una moderata (Ceron et al., 2008).

Anche il fibrinogeno è una APP moderata nel cane; il suo uso viene limitato da deficit produttivi, ad esempio in caso di insufficienza epatica, oppure da consumo, come può avvenire nelle patologie fibrinolitiche (Lubas et al., 2010) e nelle più rare condizioni di iperfibrinogenolisi (Furlanello et al., 2005). L'incremento, considerando i valori medi, si limita a circa 2.5 volte e questo fenomeno potrebbe anche essere associato all'innalzamento evidente e significativo che si osserva a carico dei valori medi dei D-Dimeri della fibrina. I D-Dimeri della fibrina esprimono uno stato di iperfibrinolisi (Caldin et al., 2000), la cui presenza è da considerare prevedibile in ogni condizione infiammatoria se si considera il fondamentale ruolo delle citokine infiammatorie nell'attivazione di uno stato pro-coagulativo, ad esempio inducendo la produzione di fattore tissutale da parte delle cellule endoteliali e dei monociti e contemporaneamente inibendo l'espressione della trombomodulina (Kumar & Gupta, 2008; Kusuma & Schultz, 2009; Stokol, 2010). Nonostante il consumo indotto dalla concomitante fibrinolisi, il fibrinogeno dimostra una buona sensibilità, essendo aumentato nei valori medi e mediani nei gruppi 1, 2, e 3. In base all'analisi della letteratura da noi eseguiti, il presente lavoro per la prima volta stabilisce un rapporto nel cane tra stato infiammatorio espresso da un incremento della CRP e innalzamento dei D-Dimeri della fibrina.

Sono state infine indagate la natremia e l'osmolalità sierica misurata tramite osmometria, considerando che condizioni di ipernatremia/iperosmolalità possono generare una macrocitosi artefattuale, e all'inverso l'iponatremia/iposmolalità possono generare una microcitosi. Questo fenomeno è causato da un brusco adattamento degli eritrociti all'osmolalità della soluzione isotonica utilizzata per sfericizzare gli eritrociti. Se ad esempio quest'ultimi erano stati esposti ad una condizione di iponatremia, per equilibrarsi con il plasma tendono a ridurre la propria tonicità; l'osmolalità della soluzione sarà in questo caso ipertonica per le emazie, determinandone una temporanea disidratazione (Beautyman & Bills, 1974; Boisvert et al., 1999; Zandecki et al., 2007, Tvedten, 2010). Pur essendo presente una tendenza anche significativa alla diminuzione sia della

concentrazione sierica della natremia che dell'osmolalità sierica, tali variazioni non appaiono determinanti, in base alle informazioni disponibili, a determinare significative alterazioni artefattuali al momento dell'esecuzione dell'esame emocromocitometrico.

In conclusione, segnaliamo che il 23,4% dei cani portati alla visita in una clinica veterinaria presentano uno stato di anemia. Inoltre, grazie ad un lavoro "cross-sectional" - "case control" eseguito su una popolazione di 3452 cani ammalati, abbiamo documentato una condizione di anemia, lieve, normocromica e normocitica, che si sviluppa proporzionalmente all'intensità dell'infiammazione, delineata con la determinazione della proteina C reattiva sierica. Abbiamo inoltre indagato per la prima volta il comportamento del profilo eritrocitario nel corso dell'anemia da infiammazione, con particolare attenzione per il CHr e l'MCVr. E' stato anche analizzato il comportamento di altri analiti intimamente legati al metabolismo eritrocitario, quali il ferro sierico e la ferritina e altre proteine della fase acuta quali l'aptoglobina e il fibrinogeno. Infine è stata riscontrata la presenza di una condizione di iperfibrinolisi grazie alla valutazione dei D-Dimeri plasmatici.

Gli stati infiammatori predispongono il cane a sviluppare una condizione di anemia.

## Bibliografia

1. Abbo AH, Lucroy MD, Assessment of anemia as an independent predictor of response to chemotherapy and survival in dogs with lymphoma: 96 cases (1993-2006), *J Am Vet Med Assoc.* 2007, 231, 12: 1836-42
2. Adamson JW, The Anemia of Inflammation/Malignancy: Mechanisms and Management, *Hematology*, 2008, 8: 159-165
3. Arosio P, Levi S, Cytosolic and mitochondrial ferritins in the regulation of cellular iron homeostasis and oxidative damage, *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800, 8:783-92
4. Ashton N, Physiology of red and white blood cells *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 2010, 11, 6: 236-241
5. Baker D, Gaunt S, Babin S, Anemia of Inflammation in Dogs Infected with *Ehrlichia platys*, *Am J Vet Res* 1988, 49: 1014-1016
6. Bauer N, Moritz A, Evaluation of three methods for measurement of hemoglobin and calculated hemoglobin parameters with the ADVIA 2120 and ADVIA 120 in dogs, cats, and horses, *Vet Clin Pathol*, 2008, 37,2: 173-179
7. Beautyman B, Bills T, Osmotic Error in Measurements of Red-Cell Volume, *The Lancet*, 1974, 10, 905-906
8. Beck ON, *Diagnostic Hematology*, Springer-Verlag, London, 2009, 199-244
9. Beutler E, Disorders of Iron Metabolism, in *Williams Hematology*, 8th Ed, Kaushansky K et al., (eds), McGraw-Hill Professional (CD), 2010
10. Bird KE, The Hematologic and Lymphoid Systems, in *Small Animal Pediatrics- The First 12 Months of Life* (Peterson ME & Kutzler MA Eds), Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, 2011, 305-327
11. Bleackley MR, Wong AY, Hudson DM, Wu CH, Macgillivray RT, Blood Iron Homeostasis: Newly Discovered Proteins and Iron Imbalance, *Transfusion Medicine Reviews*, 2009, 23, 2: 103-123
12. Boccio J, Salgueiro J, Lysionek A, Zubillaga M, Weill R, Goldman C, Caro R., Current Knowledge of Iron Metabolism, *Biological Trace element Research*, 2003, 92, 3: 189-92
13. Boisvert AM, Tvedten HW, Scott MA, Artfactual effects of hypernatremia and hyponatremia on red cell analytes measured by the Bayer H1 Analyze, *Vet Clin Pathol.* 1999; 28, 3:91-96
14. Bolahyrli M et al., C-reactive protein as an acute phase protein in cancer patients, *Med Oncol*, 2007, 24: 338-344
15. Bovy C, Gothot A, Delanaye P, Warling X, Krzesinski JM, Beguin Y, Mature erythrocyte parameters as new markers of functional iron deficiency in haemodialysis: sensitivity and specificity, *Nephrol Dial Transplant.* 2007, 22, 4: 1156-62
16. Briggs C, Quality counts: new parameters in blood cell counting, *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2009, 31: 277-297
17. Caldin M, Furlanello T, Lubas G, Brigato L, 1999. Use of an automated Ferritin assay in normal dogs and its utility in the assessment of iron status, *J of Veterinary Internal Medicine* 13, 262
18. Caldin M, Furlanello T, Lubas G, Validation of an immunoturbidimetric D-dimer assay in canine citrated plasma, *Veterinary Clinical Pathology*, 2000, 29, 2: 51-54
19. Caldin M, Furlanello T, Lubas G., Use of an automated Ferritin assay in normal dogs and its utility in the assessment of iron status, *J of Veterinary Internal Medicine*, 1999, 13: 262
20. Caldin M, Tasca S, Carli E, Bianchini S, Furlanello T, Martinez-Subiela S, Ceron JJ, Serum acute phase protein concentrations in dogs with hyperadrenocorticism with and without concurrent inflammatory conditions, *Vet Clin Pathol*, 2009, 38, 1: 63-68
21. Caldin M, Zanella A, Furlanello T, Ferritina nell'emangiosarcoma, *Atti del 65° Congresso Internazionale Multisala SCIVAC*, Rimini, 2010, 291

22. Camaschella C, Pagani A, Iron and erythropoiesis: a dual relationship, *Int J Hematol.* 2010, in stampa
23. Camaschella C, Strati P, Recent advances in iron metabolism and related disorders, *Intern Emerg Med*, 2010, in stampa
24. Cartwright GE, Lauritsen MA, Humphreys S, Jones PJ, Merrill IM, Wintrobe MM. The anemia of infection. II. The experimental production of hypoferrremia and anemia in dogs. *J Clin Invest.* 1946, 25:81-6.
25. Ceron J, Ohno K, Caldin M, A seven-point plan for acute phase protein interpretation in companion animals, *The Veterinary Journal*, 2008, 177: 6-7
26. Chasis JA, Mohandas N, Erythroblastic islands: niches for erythropoiesis. *Blood* 2008, 112: 470-478
27. Chepelev NL, Willmore WG, Regulation of iron pathways in response to hypoxia, *Free Radic. Biol. Med.*, 2011, in stampa
28. Christian JA, Erythrokinetics and Erythrocyte Destruction, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> Ed., (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 136-143
29. Clark SF, Iron deficiency anemia: diagnosis and management, *Current Opinion in Gastroenterology* 2009, 25:122-128
30. Comazzi S, Peralisi C, Bertazzolo W, Haematological and biochemical abnormalities in canine blood: frequency and associations in 1022 samples, *J of Small Animal Practice*, 2004, 45: 343-349
31. Cook JD, Diagnosis and management of iron-deficiency anaemia, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 18, 2: 319-332
32. Couto CG, Anemia, in *Small Animal Internal Medicine*, 4<sup>th</sup> Ed, Nelson RW & Couto CG (Eds), Saunders, 2008, 1209-1223.
33. Cowgill ES, Neel JA, Grindem CB, Clinical application of reticulocyte counts in dogs and cats, *Vet Clin Small Anim*, 2003, 33: 1223-1244
34. Cray C, Zaias J, Altman NH, Acute Phase Response in Animals: A Review, *Comp Med*, 2009, 59, 6: 517-26.
35. Crisman MV, Scarratt WK, Zimmermann KL, Blood Proteins and Inflammation in the Horse, *Vet Clin Equine* 2008, 24: 285-297
36. Cui Y, Wu Q, Zhou Y, Iron-refractory iron deficiency anemia: new molecular mechanisms, *Kidney International*, 2009, 76: 1137-1141
37. Delves P, Innate Immunity, in *Roitt's Essential Immunology*, Wiley-Blackwell, 2006, 1-20
38. Doretto P, Cappelletti P, La diagnosi di laboratorio della carenza di ferro, *RIMeL-IJLaM*, 2008, 4, 166-177
39. Dunn LL, Rahmanto YS, Richardson DR, Iron uptake and metabolism in the new millennium, *Trends Cell Biol.*, 2007, 2:93-100
40. Eckersall ED & Bell R, Acute phase proteins: Biomarkers of infection and inflammation in veterinary medicine, *The Veterinary Journal*, 2010, 185: 23-27
41. Eklund CM, Proinflammatory Cytokines in CRP Baseline Regulation, *Advances in Clinical Chemistry*, 2008, 48, 111-136
42. El-Khatib M, Duncan HJ, Kant KS Role of C-reactive protein, reticulocyte haemoglobin content and inflammatory markers in iron and erythropoietin administration in dialysis patients, *Nephrology (Carlton)*. 2006, 11, 5: 400-4
43. El-Khatib M, The Role Of Inflammation On Iron And Erythropoietin Resistance, *J of Nephrology and Renal Transplantation*, 2009, 2, 2: 45-54
44. Ervasti M, Evaluation of Iron Status Using Methods Based on the Features of Red Blood Cells and Reticulocytes, Doctoral dissertation, University of Kuopio, 2008, 1-106, [[www.uku.fi/vaitokset/2008/isbn978-951-27-0956-4.pdf](http://www.uku.fi/vaitokset/2008/isbn978-951-27-0956-4.pdf), con accesso 1-12-2009]
45. Feldman BF, Kaneko J, Farver T, Anemia of inflammatory disease in the dog: Ferrokinetics of Adjuvant-Induced Anemia, *Am J Vet Res*, 1981a; 42, 4: 583-585
46. Feldman BF, Kaneko J, Farver T, Anemia of inflammatory disease in the dog: clinical characterization, *Am J Vet Res* 1981b; 42, 7: 1109-1113
47. Feldman BF, Nonregenerative Anemia, in *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 6<sup>th</sup> Ed (Ettinger SJ & Feldman EC, Eds), Elsevier Saunders, St. Louis, MI, 2005, 1908-1917

48. Franchini M, Montagnana M, Lippi G, Hecpidin and iron metabolism: From laboratory to clinical implications, *Clin Chim Acta.*, 2010, 411, 21-22: 1565-9
49. Friedrichs KR, Thomas T, Plier M, Andrews GA, Chavey PS, Young KM, Evaluation of Serum Ferritin as a Tumor Marker for Canine Histiocytic Sarcoma, *J Vet Intern Med* 2010, 24:904–911
50. Fry MM, Anemia of Inflammatory, Neoplastic, Renal, and Endocrine Diseases, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> Ed. (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 246-250
51. Fry MM, Kirk CA. Reticulocyte indices in a canine model of nutritional iron deficiency. *Vet Clin Pathol* 2006; 35: 172-181
52. Fry MM, Liggett JL, Baek SJ, Molecular Cloning and Expression of Canine Hecpidin, *Vet Clin Pathol* 2004; 33: 223-227
53. Furlanello T, Caldin M, Fiorio F, Primary Hyperfibrinogenolysis in the dog, *Vet Clin Pathol*, 2005, 34 suppl, 293
54. Furlanello T, Tasca S, Caldin M, Carli E, Patron C, Tranquillo M, Lubas G, Solano-Gallego L, Artfactual changes in canine blood following storage, detected using the ADVIA 120 hematology analyzer, *Vet Clin Pathol.*, 2006, 35, 1: 42-6
55. Ganz T & Nemeth E, Iron imports. IV. Hecpidin and regulation of body iron metabolism, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006, 199-203
56. Ganz T, Anemia of Chronic Disease, in *Molecular Hematology*, 3rd edition. Prvan D & Gribben J, Eds, Blackwell, London, 2010, 165-168
57. Ganz T, Iron in innate immunity: starve the invaders, *Current Opinion in Immunology* 2009, 21:63–67.
58. Ganz T, Nemeth E, Iron Sequestration and Anemia of Inflammation, *Semin Hematol* 2009, 46: 387–393
59. Gebhardt C, Hirschberger J, Arndt G, Krainer K, Schweigert FJ, Brunnerberg L, Kaspers B, Kohn B, Use of C-reactive protein to predict outcome in dogs with systemic inflammatory response syndrome or sepsis, *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care*, 2009, 19, 5: 450–458
60. Gomollon F, Gisbert JP, Anemia and Inflammatory Bowel Diseases, *World J Gastroenterol*, 2009, 7; 15, 37: 4659-4665
61. Goodfellow M, Papisoulitis K, Cue S, Crawford E, Hall E, Effect of storage on microcytosis observed in dogs with portosystemic vascular anomalies, *Research in Veterinary Science*, 2008, 84: 490–493.
62. Handelman GJ, Levin NW, Iron and anemia in human biology: a review of mechanism, *Heart Fail Rev.*, 2008, 13, 4: 393-404
63. Harvey JW, Iron Metabolism and Its Disorders, in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6<sup>th</sup> Edition), Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML (Eds), Elsevier, 2008a, 259-285
64. Harvey JW, The Erythrocyte: Physiology, Metabolism, and Biochemical Disorders, in *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* (6<sup>th</sup> Edition), Kaneko JJ, Harvey JW and Bruss ML (Eds), Elsevier, 2008b, 173-240
65. Hassan E, Anemia in the Critically Ill Patient, *J of Pharmacy Practice*, 2008, 21, 6: 405-410
66. Hentze MW, Muckenthaler MU, Galy B, Camaschella C, Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism, *Cell*, 2010, 142, 1: 24-38
67. Higgins T, Beutler E, Doumas BT., Hemoglobin, Iron, and Bilirubin, in *Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Burtis CA et al. (Eds), Elsevier, 2008, 509-527
68. Hillman RS, Ault KA, Rinder HM, Iron Deficiency Anemia, in *Hematology in Clinical Practice*, 4<sup>th</sup> Ed, McGraw-Hill, New York, 2005, 53-64
69. Jialal I, Devaraj S, Modulation of Biomarkers of Inflammation, in *Clinical Lipidology, A Companion to Braunwald's Heart Disease* Edited by: Christie M. Ballantyne, 2009, 396-409
70. Kemna EH, Tjalsma H, Willems HL, Swinkels DW, Hecpidin: from discovery to differential diagnosis, *Haematologica*, 2008, 93, 1:90-7
71. Kjelgaard-Hansen M & Jacobsen S, Assay Validation and Diagnostic Applications of Major Acute-phase Protein Testing in Companion Animals, *Clin Lab Med*, 2011, in stampa

72. Kjelgaard-Hansen M, Jensen AL, Houser GA, et al. Use of serum C-reactive protein as an early marker of inflammatory activity in canine type II immune-mediated polyarthritis: case report. *Acta Vet Scand* 2006, 48, 1: 9-12
73. Kjelgaard-Hansen M, The Benefits of using Canine C-Reactive Protein Routinely – Diagnostic and Monitoring Aspects, Proceedings of the XX ECVIM Congress, 2010 (CD).
74. Klenner S, Bauer N, Moritz A, Evaluation of three automated human immunoturbidimetric assays for the detection of C-reactive protein in dogs, *J Vet Diagn Invest*, 2010, 22: 544-552
75. Knovich MA, Storey M, Coffman LG, Torti SV, Torti FM., Ferritin for the clinician, *Blood Reviews*, 2009, 23, 3:95-104
76. Kohgo Y, Ikuta K, Ohtake T, Torimoto Y, Kato J, Body iron metabolism and pathophysiology of iron overload, *Int J Hematol*, 2008, 1, 88: 7-15
77. Kop WJ, Weinstein AA, C-Reactive Protein, in *Encyclopedia of Stress* (2<sup>nd</sup> Ed), Fink G (Ed), Elsevier, 2007, 653-658
78. Kovesdy CP, Lee GH, Kalantar-Zadeh K, Serum Ferritin: Deceptively Simple or Simply Deceptive? Lessons Learned From Iron Therapy in Patients With Chronic Kidney Disease, *Journal of Pharmacy Practice*, 2008, 21, 6, 411-419
79. Kumar R, Gupta V, Disseminated Intravascular Coagulation: Current Concepts, *Indian J Pediatr*, 2008; 75, 7: 733-738
80. Kusuma D, Schultz TK, Acute Disseminated Intravascular Coagulation, *Hospital Physician* March/April 2009 35-43
81. Lankhorst CE, Wish JB, Anemia in renal disease: diagnosis and management, *Blood Rev*. 2010, 24, 1:39-47
82. Lubas G, Caldin M, Wiinberg B, Kristensen A, Laboratory Testing of Coagulation Disorders, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> ed. (Weiss DJS, Wardrop KJ Eds), Wiley, 2010, 1082-1100
83. Ludwig H, Prevalence and incidence of anemia and risk factors for anemia in patients with cancer, in *Recombinant Human Erythropoietin (rhEPO) in Clinical Oncology*, 2<sup>nd</sup> ed (Nowrouzian MR ed), Springer, Wien, 2008, 198-206
84. Lynch S, Influence of Infection/Inflammation, Thalassemia and Nutritional Status on Iron Absorption, *Int. J. Vitam. Nutr. Res.*, 2007, 77, 3: 217-223
85. March H, Barger A, McCullough S, Schaeffer D, Macwilliams P, Use of the ADVIA 120 for differentiating extracellular and intracellular hemoglobin, *Veterinary Clinical Pathology*, 2005, 34, 2: 106-109
86. Marković M, Majkić-Singh N, Ignjatović S, Singh S, Reticulocyte haemoglobin content vs. soluble transferrin receptor and ferritin index in iron deficiency anaemia accompanied with inflammation, *Int. Jnl. Lab. Hem.* 2007, 29, 341-346
87. Martínez-Subiela S, Caldin M, Parra MD, Ottolini N, Bertolini G, Bernal LJ, García-Martinez JD, Cerón JJ, Canine C-reactive protein measurements in cerebrospinal fluid by a time-resolved immunofluorimetric assay, *J Vet Diagn Invest.*, 2011, 23, 1: 63-7
88. Mast AE, Blinder MA, Dietzen DJ., Reticulocyte hemoglobin content, *Am. J. Hematol.*, 2008, 83, 4:307-310
89. Means RT, Anemias Secondary to Chronic Disease and Systemic Disorders, in *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12<sup>th</sup> Ed, Greer JP et al. (Eds), Wolters Kluwer, Philadelphia, 2009, 1221-1238
90. Means RT, Glader B, Anemia: General Considerations, in *Wintrobe's Clinical Hematology*, 12<sup>th</sup> Ed, Greer JP et al. (Eds), Wolters Kluwer, Philadelphia, 2009, 779-809
91. Metha AB, Hoffbrand AV, Haematological aspects of systemic disease, in *Postgraduate Haematology: 6<sup>th</sup> Edition* (Hoffbrand AV et al. Eds), 2011 Blackwell Publishing Ltd., 940-955
92. Miconi L, L'anemia da malattie croniche, *LigandAssay* 2007, 12, 4: 285-290
93. Miller AG, Morley PS, Rao S, Avery AC, Lana SE, Olver CS, Anemia is associated with decreased survival time in dogs with lymphoma, *J Vet Intern Med.* 2009, 23, 1: 116-122
94. Moritz A, Fickenscher Y, Meyer K. Canine and feline hematology reference values for

- the ADVIA 120 hematology system. *Vet Clin Pathol.* 2004; 33:32-38.
95. Nairz M, Schroll A, Sonnweber T, Weiss G, The struggle for iron - a metal at the host-pathogen interface, *Cell Microbiol.* 2010, 12, 12: 1691-702
  96. Nakamura M, Takahashi M, Ohno K, Koshino A, Nakashima K, Setoguchi A, Fujino Y, Tsujimoto H, C-reactive protein concentration in dogs with various diseases. *J Vet Med Sci*, 2008, 70: 127-131
  97. Nemeth E, Ganz T, Regulation of iron metabolism by hepcidin, *Annu Rev Nutr.* 2006, 26: 323-42
  98. Neumann S, Serum iron level as an indicator for inflammation in dogs and cats, *Comp Clin Path*, 2003, 12: 90-94
  99. Nowrousian MR, Definition, classification and characterization of anemia in cancer, in *Recombinant Human Erythropoietin (rhRPO) in Clinical Oncology*, 2<sup>nd</sup> Ed, Nowrousian MR (Ed.), Springer, Wien, 117-148, 2008
  100. O'Meara E, de Denus S, Management of Anemia and Iron Deficiency in Heart Failure, *Current Treatment Options in Cardiovascular Medicine*, 2010, 12: 532-548
  101. Olver CS, Erythropoiesis, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> Ed. (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 36-42
  102. Orino K & Watanabe K. Molecular, physiological and clinical aspects of the iron storage protein ferritin, *The Veterinary Journal*, 2008, 178, 2: 191-201
  103. Ottenjann M, Weingart C, Arndt G, Kohn B, Characterization of the Anemia of Inflammatory Disease in Cats with Abscesses, Pyothorax, or Fat Necrosis, *J Vet Intern Med*, 2006, 20, 5: 1143-1450
  104. Price EA, Schrier SL, Unexplained Aspects of Anemia of Inflammation, *Advances in Hematology*, 2010, Article ID 508739, 5 pages
  105. Prins MM, van Leeuwen MW, Teske E, Stability and reproducibility of Advia 120-measured red blood cell and platelet parameters in dogs, cats, and horses, and the use of reticulocyte haemoglobin content (CHr) in the diagnosis of iron deficiency, *Tijdschr Diergeneeskd* 2009, 11: 272-278
  106. Raj DSC, Role of Interleukin-6 in the Anemia of Chronic Disease, *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2009, 38, 5: 382-388
  107. Rebar AH, Red Blood Cell Responses in Disease: A Case Oriented Approach, *AAHA Phoenix Yearly Conference Proceedings*. 2009 (CD)
  108. Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB, Cancer cell iron metabolism and the development of potent iron chelators as anti-tumour agents, *Bioch et Biophys Acta*, 2009, 1790, 7:702-17
  109. Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell A, Reticulocyte Enumeration: Past & Present, *Laboratory Medicine*, 2001, 10, 32, 599-608
  110. Riley RS, Ben-Ezra JM, Tidwell A, Romagnoli G., Reticulocyte analysis by flow cytometry and other techniques, *Hematol Oncol Clin N Am*, 2002, 16: 373-420
  111. Robertson KA, Hutchison SMW, 2009, Assessment of iron status and the role for iron-replacement therapy in anaemic cancer patients under the care of a specialist palliative care unit, *Palliative Medicine*, 2009, 23, 5: 406-409
  112. Ryan DH, Examination of Blood Cells, in *Williams Hematology*, 8th Ed, Kaushansky K et al., (eds), McGraw-Hill Professional (CD), 2010.
  113. Schulze KJ, Dreyfuss ML, Iron-Deficiency anemia, in *Encyclopedia of Human Nutrition* (2<sup>nd</sup> Edition), Caballero B (Ed), 2005, Academic Press, New York, 101-109
  114. Schwedler SB, Filep JG, Galle J, Wanner C, Potempa LA, C-Reactive Protein: A Family of Proteins to Regulate Cardiovascular Function, *American Journal of Kidney Diseases*, 2006, 47, 2: 212-222
  115. Shaefer DMW, Iron Metabolism and Laboratory Assessment of Iron Status, *Proceedings ACVCP Annual Meeting*, Chicago, 2009 (CD)
  116. Sihler KC, Napolitano LM, Anemia of inflammation in critically ill patients, *J Intensive Care Med.*, 2008, 23, 5: 295-302
  117. Soeters PB, Grimble RF, Dangers, and benefits of the cytokine mediated response to injury and infection, *Clinical Nutrition*, 2009, 28, 6: 583-596

118. Steinberg JD, Olver CS, Hematologic and biochemical abnormalities indicating iron deficiency are associated with decreased reticulocyte hemoglobin content (CHr) and reticulocyte volume (rMCV) in dogs, *Vet Clin Pathol.* 2005, 34: 23-27
119. Steinmetz HT, Tsamaloukas A, Schmitz S, Wiegand J, Rohrberg R, Eggert J, Breuer F, Tessen HW, Eustermann H, Thomas L, A new concept for the differential diagnosis and therapy of anaemia in cancer patients, *Support Care Cancer.* 2010, 19, 2:261-269
120. Stokol T, Disseminated Intravascular Coagulation, in *Schalm's veterinary hematology.* - 6th ed. (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Wiley, 2010, 679-688
121. Thatchil J, 2008, Immature reticulocytes and its relevance to thrombosis, *Ann Hematol*, 2008, 87:1025-1026
122. Theurl I, Aigner E, Theurl M, Nairz M, Seifert M, Schroll A, Sonnweber T, Eberwein L, Witcher DR, Murphy AT, Wroblewski VJ, Wurz E, Datz C, Weiss G, Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications, *Blood*, 2009, 113, 21: 5277-5286
123. Tvedten H, Laboratory and Clinical Diagnosis of Anemia, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> Ed. (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 152-161
124. Tvedten H, Moritz A, Reticulocyte and Heinz Body Staining and Enumeration, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> Ed., (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 1067-1073
125. van Gameren MM, Willemse PH, Mulder NH, Limburg PC, Groen HJ, Vellenga E, de Vries EG, Effects of recombinant human interleukin-6 in cancer patients: a phase I-II study. *Blood* 1994, 84: 1434-41.
126. Viatte L, Vaulont S, Heparin, the iron watcher, *Biochimie*, 2009, 91: 1223-1228
127. Vicinanza P, Catalano L, Pollio G, Vicinanza M, Di Chiara P,  $\Delta$ -CHr improves the identification of anemic syndromes and the evaluation of hemoglobin synthesis, *Clin. Lab. Haem.*, 2005, 27, 217-220
128. Waner T, Harrus S, Anemia of Inflammatory Disease, in *Textbook of Veterinary Internal Medicine*, 5<sup>th</sup> Ed (Ettinger SJ & Feldman EC, Eds), WB Saunders, Philadelphia, 2000, 205-1917
129. Wang W, Knovich MA, Coffman LG, Torti FM, Torti SV, Serum ferritin: Past, present and future, *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1800, 8: 760-9.
130. Weiss D, Krehbiel J, Lund J, Studies of the Pathogenesis of Anemia of Inflammation: Mechanism of Impaired erythropoiesis, *Am J Vet Res*, 1983, 10, 44: 1832-1835
131. Weiss D, Krehbiel J. Studies of the Pathogenesis of Anemia of Inflammation: erythrocyte survival, *Am J Vet Res*, 1983, 44, 10: 1830-1831
132. Weiss D, Tvedten H, The Complete Blood Count and Bone Marrow Examination: General Comments and Selected Techniques, in *Small Animal Clinical Diagnosis by Laboratory Methods*, 4<sup>th</sup> Ed. (Willard MD, Tvedten H, Eds.), Saunders, Philadelphia, 14-37
133. Weiss DJ, Iron and Copper Deficiencies and Disorders of Iron Metabolism, in *Schalm's Veterinary Hematology*, 6<sup>th</sup> Ed., (Weiss DJ, Wardrop KJ, Eds), Blackwell, Ames, Iowa, 2010, 167-171
134. Weiss G, Goonough LT, Anemia of Chronic Disease, *N Engl J Med* 2005, 352, 10: 1011-1123
135. Weiss G, Iron metabolism in the anemia of chronic disease, *Biochimica et Biophysica Acta*, 2009, 1790, 682-693
136. Weiss G, Modification of Iron Regulation by the Inflammatory Response, *Best Practice & Research Clinical Haematology*, 2005, 18, 2: 183-201
137. Wrighting DM, Andrews NC: Iron Homeostasis and Erythropoiesis, *Current Topics in Developmental Biology*, 2008, 82: 141-167
138. Yadav D, Chandra J, Iron Deficiency: Beyond Anemia, *Indian J Pediatr*, 2010, in press
139. Yuile CL, Lucas FV, Jones CK, Chapin S, Whipple WH, *J Exp Med* 1953, 98: 173-194

140. Zandecki M, Genevieve F, Gerard J, Godon A, Spurious counts and spurious results on haematology analysers: a review. Part II: white blood cells, red blood cells, haemoglobin, red cell indices and reticulocytes *Int J Lab Hematol.* 2007, 29, 1:21-41
141. Zarychanski R, Houston DS, Anemia of chronic disease: A harmful disorder or an adaptive, beneficial response ?, *CMAJ*, 2008, 12, 179, 4: 333-337

## Ringraziamenti

Ringrazio il Prof. Massimo Morgante e il Prof. Daniele Bernardini per la fiducia e la collaborazione nella realizzazione di questo studio.

Ringrazio il Dott. Marco Caldin, amico fraterno, per l'aiuto fondamentale a questa ricerca e ad ogni altra mia attività scientifica e professionale, ma soprattutto per i primi vent'anni di lavoro comune.

Un ringraziamento al Prof. George Lubas, anche lui da sempre pronto ad un aiuto e al supporto.

Ringrazio il Dott. Andrea Zoia per aver individuato immediatamente lo scopo della tesi e avermi aiutato nel focalizzare alcuni suoi aspetti.

Ringrazio tutto lo staff della Clinica Veterinaria San Marco e del Laboratorio d'Analisi Veterinarie San Marco. Ognuno di essi è presente almeno in una di queste pagine.

Ringrazio la mia famiglia, paziente, tollerante e affettuosa, sempre pronta ad aiutarmi e a permettermi di inseguire le mie aspirazioni.