UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

Sede Amministrativa: Università degli Studi di Padova

Dipartimento di Scienze Cliniche Veterinarie

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN: SCIENZE VETERINARIE
INDIRIZZO: IN SCIENZE CLINICHE VETERINARIE
CICLO: XXII

TITOLO TESI

Nefropatie giovanili nel Boxer

Studio su una popolazione di cani Boxer di un anno di età

Direttore della Scuola : Ch.mo Prof. Massimo Morgante
Coordinatore d'indirizzo: Ch.mo Prof. Maurizio Isola
Supervisore :Ch.mo Prof. Massimo Morgante

Dottorando : Claudio Brovida

Sommario

La displasia renale viene definita come uno sviluppo disorganizzato del parenchima renale causato da anomala differenziazione delle varie parti del nefrone in fase embrionale. La diagnosi definitiva viene eseguita tramite una appropriata valutazione istologica che evidenzia l'alterato sviluppo delle strutture renali.

Nel cane di razza Boxer, la displasia renale, definita anche nefropatia giovanile, sembra essere presente. Tuttavia, la documentazione pubblicata al momento è abbastanza ridotta, con valutazioni sulla eziologia a volte discordanti. L'autore, considerata la documentazione attualmente disponibile in letteratura e partendo dall'analisi dei suoi casi di nefropatia giovanile nel Boxer, diagnosticati nel periodo dal 2005 al 2010, tramite biopsia renale, ha voluto indagare su una popolazione di giovani Boxer dell'età di circa 12 mesi, valutati nel periodo dal 2009 al 2010, provenienti dallo stesso allevamento, al fine di definire eventuali casi di diagnosi di danno renale. Su un gruppo di 120 boxer indagati, sono stati selezionati 84 casi. Su di essi sono stati analizzati alcuni parametri ematologici, ematochimici ed urinari di base e di facile esecuzione, in qualunque ambiente medico veterinario, per valutare se fossero sufficienti a definire l'eventuale indice predittivo positivo dell'indagine, con lo scopo di identificare precocemente individui affetti da patologia renale familiare o congenita (nefropatia giovanile).

Abstract

Renal dysplasia is defined as a disorganized development of the renal parenchyma, consequent to an anomalous differentiation of the nephron's various segments. The final diagnosis is based on the correct histopathology evaluation of the kidney and the finding of the typical structural anomalies. In Boxer dogs, renal dysplasia, also defined juvenile nephropathy, has been described, however the published material on this topics is still limited and different theories about the development of this disease are proposed.

The author, starting from the evaluation of a group of cases of juvenile nephropathy, that he diagnosed, by kidney biopsy, in a period of five years, planned a prospective study, on a population of young Boxers, aging a mean of 12 months, which have been evaluated during one year of time. Starting from a group of 120 investigated Boxers, he included in the study 84 dogs on which basic haematology, biochemistry and urinalysis tests have been performed. The consequent data, statistically evaluated, have been analysed to envisage elements that could help to define an early detection of signs of renal damage, that may be associated to a juvenile nephropathy, in these Boxer dogs.

INTRODUZIONE

Displasia Renale

La displasia renale viene definita come uno sviluppo disorganizzato del parenchima renale causato da anomala differenziazione delle varie parti del nefrone. La diagnosi definitiva viene eseguita tramite una appropriata valutazione istologica che evidenzia un anomalo sviluppo delle strutture renali. Le lesioni istopatologiche più frequenti consistono in bande radiali del parenchima che contengono glomeruli e tubuli immaturi, adiacenti a strutture più sviluppate (asincronia nella differenziazione dei nefroni) (Picut, 1987). Altri elementi indicano la persistenza di tessuto mesenchimale immaturo, dotti metanefrici, proliferazione epiteliale tubulare atipica e, raramente, metaplasia disontogenica. Alterazioni secondarie comprendono ipertrofia ed iperplasia dei glomeruli e tubuli, nefrite tubulo interstiziale, pielonefrite, mineralizzazione distrofica, atrofia glomerulare cistica, tubuli micro cistici, e lipidosi glomerulare.

La displasia renale è stata riportata inizialmente nei Lhasa Apso e negli ShihTzu (Bovée, 1984). In altre razze sono anche state dimostrate alterazioni renali che riportano alla displasia renale (Tabella n° 1). In più, nefropatie giovanili con caratteristiche di displasia renale sono state riportate in molte razze e sembra probabile che il problema possa manifestarsi sporadicamente in tutte le razze (Lees, 2010). Ad oggi, evidenza scientifica che documenti la validità di indagini genetiche per la displasia renale riguardante le varie razze non è stata ancora documentata, anche se, recentemente è stato pubblicato un lavoro che ipotizza che la displasia renale del cane sia correlata a mutazioni del gene Cox-2 così come avviene nel topo (Whiteley, 2011). Tuttavia, esistono perplessità attualmente sulla attendibilità scientifica e sul modo di elaborazione di tale ricerca.

L'insufficienza renale cronica è la sindrome clinica più comune in questi pazienti con insorgenza in periodi variabili della vita, da 3 mesi a 3 anni con picchi verso il primo anno negli individui con displasia renale o glomerulopatie primarie. Tuttavia molte nefropatie familiari spesso determinano la comparsa dei sintomi in età più avanzata. La sintomatologia riproduce il classico sviluppo della CKD (Chronic Kidney Disease), con scarsa crescita, perdita di peso, mantello opaco, comparsa di Poliuria / Polidipsia (PU/PD), e successivamente o contemporaneamente, alterazioni dell'esame delle urine, dei parametri ematici con aumento dei valori di urea, creatinina, fosforo, alterazioni elettrolitiche, anemia. La diagnostica per immagini, l'ecografia in

particolare, evidenzia reni di morfologia anomala con alterata architettura corticale e midollare, dimensioni ridotte e possibile dilatazione del bacinetto renale. Le terapie che si adottano in questi casi sono fondamentalmente indicate a sostenere il paziente ed a contenere l'evoluzione della patologia che tuttavia rimane non curabile.
La malattia renale cronica (CKD) è normalmente associata all'età avanzata nel cane con una incidenza di circa il 20% delle patologie che affliggono i cani. L'eziologia spesso è sconosciuta in quanto la patologia tende ad evolvere in maniera lenta e subdola, normalmente asintomatica, soprattutto nelle fasi iniziali della malattia. In zone con malattie infettive endemiche (es: Leishmaniosi) la CKD copre un'elevata percentuale della popolazione canina affetta con un interessamento del parenchima renale estremamente variabile.
Cause congenite (presenti alla nascita), ereditarie (geneticamente derivate), o familiari (un tratto presente in un gruppo di cani imparentati) possono portare ad evoluzione di CKD ed alcune razze possono essere particolarmente colpite. Negli animali giovani, la malattia renale è spesso considerata congenita in quanto mancano valutazioni cliniche a lungo termine, tuttavia, lo sviluppo di lesioni, consistenti con lo stato di malattia renale allo stadio terminale (end-stage kidney) si può sviluppare già in cuccioli di 60 giorni (Finco, 1995).
Le nefropatie giovanili sono state descritte in oltre 20 razze canine, la maggioranza di natura ereditaria o familiare. Le nefriti ereditarie sono per lo più caratterizzate da proteinuria, ematuria renale e danno glomerulare progressivo (Vaden, 2004). La displasia renale è stata identificata in almeno 23 razze di cani e può avere o no una base familiare (Vaden, 2004).
Le malattie renali congenite sono, per definizione, presenti alla nascita, e le patologie ereditarie sono congenite (il gene collegato all'anomalia è presente fin dalla nascita), anche in caso di diagnosi in stadio avanzato della vita. Va inoltre sottolineato che le alterazioni congenite non sono necessariamente di natura ereditaria, infatti lo sviluppo normale di un organo può andare incontro a deviazioni durante la gestazione o la prima fase di sviluppo neonatale in varie maniere che tuttavia non presentano una causa di tipo ereditario. Cionondimeno le malattie renali congenite più importanti riguardano situazioni patologiche riconosciute essere genetiche o sospettate di avere una natura ereditaria in quanto la ricorrenza del problema è strettamente collegato a morfologie tipiche di famiglia o razza (Lees, 2010).

Displasia renale

Lhasa Apso

Shih Tzu

Barbone standard

Soft Coathed Wheaten Terrier

Chow Chow

Alaskan Malamute

Miniature Schnauzer

Cane Olandese Kooiker (Dutch Decoy)

Glomerulopatie primarie

Samoiedo consanguinei e Navasota consanguinei (cromosoma X-associato)

Cocker Spaniel inglese (autosomica recessiva)

Bull terrier (autosomica dominante)

Dalmata (autosomica dominante)

Doberman

Bullmastiff

Terranova

Rottweiler

Pembroke Welsh Corgi

Beagle

Malattia Renale Policistica

Bull terrier (autosomica dominante)

Cairn Terrier e West Highland White Terrier (autosomica recessiva)

Amiloidosi

Shar-Pej

English Foxhound

Beagle

Glomerulonefrite Immuno-mediata

Soft Coated Wheaten Terrier

Cane Bernese da Montagna (sospetta autosomica recessiva)

Brittany Spaniel (autosomica recessiva)

Miscellanea

Boxer – nefropatia da reflusso con ipoplasia segmentale
Basenji – sindrome di Fanconi
Pastore Tedesco – adenocarcinoma-cistico (autosomica dominante)
Pembroke Welsh Corgi – teleangectasia.

Tabella n°1. Nefropatie familiari del cane elencate in categorie di tipo di malattia, di razze affette, e modo di trasmissione ereditaria, se conosciuto (Lees, 2010).

Nefropatie giovanile nel Boxer

Valutando la letteratura, nei cani di razza Boxer è stata documentata la presenza di nefropatia giovanile associata a caratteristiche istopatologiche di displasia renale in un caso (Peeters et al, 2000) ed in due cuccioli della stessa cucciolata (Hoppe, Karlstam, 2000). Per quanto riguarda lavori recenti sono presenti solamente due significativi studi, di tipo retrospettivo. Nel primo lavoro (Chandler et al, 2007) sono state valutate retrospettivamente le cartelle cliniche di 37 Boxer, con meno di cinque anni di età che hanno manifestato azotemia (elevati valori di urea e creatinina), iperfosfatemia, anemia, isostenuria e proteinuria. Le indagini ecografiche hanno rivelato corticali iperecogene, perdita di distinzione della giunzione cortico-midollare, bacinetti renali dilatati e reni di aspetto piccolo e margini irregolari. Le indagini istopatologiche effettuate sempre in questo gruppo sono state caratterizzate da fibrosi pericapsulare ed interstiziale, infiltrazione di cellule infiammatorie, tubuli dilatati, glomeruli sclerotici e calcificazioni distrofiche.

Nel secondo lavoro (Kolbjørnsen et al, 2008) sono stati valutati retrospettivamente, da un punto di vista morfologico, 7 giovani Boxer con lesioni renali di stadio terminale compatibili con pielonefrite cronica con severa atrofia e fibrosi corticale associate a vari gradi di infiammazione cronica tubulo interstiziale. Sulla base di queste valutazioni morfologiche è stata ipotizzata dagli autori che la causa del danno renale a stadio terminale fosse un danno correlato a pielonefrite cronica, atrofica e non ostruttiva, molto probabilmente dovuta a reflusso vescico-ureterale, con un quadro simile alla “Nefropatia da Riflusso con Ipoplasia Segmentale dell’uomo” (Rene di Ask-Upmark). Questo tipo di valutazione ha indotto ad interpretare l’epitelio tubulare atipico delle cellule dei dotti collettori in forma di proliferazione adenomatosa, non a sviluppo disorganizzato metanefrico, ma ad una lesione compensatoria acquisita,

dovuta appunto a danni renali conseguenti a reflusso durante il periodo di sviluppo dell'organo (per es.. durante la gestazione fino a tre settimane di età).

Nella nostra casistica (ANUBI® Ospedale per Animali da Compagnia, Moncalieri) le patologie renali giovanili sono state individuate soprattutto in cani di razza Boxer. In particolare, nel periodo dal 2005 al 2010, su 326 Boxer valutati, 14 sono stati sottoposti a biopsia renale, perché presentavano segni di sofferenza renale che potevano essere associati a patologia familiare/congenita. I relativi risultati sono descritti nella tabella n°2.

N°	**Nome**	**Età**	**Data di esecuzi-one**	**Sintomi**	**Malattie pregresse/ concomitanti**	**Terapie in corso**	**Esito**
1	BRUTUS	11aa	18/09/09	CKD da Leishmaniosi, HP P	Leishmaniosi	Emodialisi e terapia per Leishmaniosi	Glomerulonefrite membrano–proli-ferativa; sclerosi globale (30%); fibrosi interstiziale(20%);nefrite linfo – plasmacellulare. Lesione non differenziabile.
2	**DUX**	2,8aa	18/05/10	CKD	no	Sintomatiche	**Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer**
3	**BIAGIO**	6aa	07/03/09	CKD IRIS 4 HP NP	CKD	Fluidi	Glomerulopatia mesangio-proliferativa; glomerulosclerosi da segmentale a globale; grave fibrosi pericapsulare e interstiziale diffusa (65%-75%); nefrite interstizaile cronica. **Lesione displastica: prevalentemente midollare**
4	PABLO	7aa	02/02/10	CKD	no	Sintomatica, dieta	Tumore a cellule rotonde. In diagnosi differenziale si consideri il linfoma renale
5	TEQUILA	10aa	13/03/08	Anoressia e dimagrimento. CKD, IRIS classe 4, P, BH, positività a Leishmania	no	no	Materiale ematico associato a materiale fibrillare necrotico che potrebbe essere suggestivo di un ematoma in fase di organizzazione
6	**OMER**	4aa	29/12/07	CKD	no	Sintomatica	Glomerulosclerosi diffusa, fibrosi interstiziale diffusa, nefrite intetrstiziale cronica moderata multifocale associata ad atrofia tubulare diffusa. **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer**.
7	FOREMAN	1,4a	28/05/11	no	no	no	Lieve e diffusa ipercellularità

							mesangiale; moderata mesangiosclerosi diffusa ed ispessimento della capsula di Bowman. Lesione non differenziabile con nefropatia giovanile.
8	**RAMBO**	5aa	16/10/06	*CKD stato* uremico avanzato	Pielonefrite e prostatite cistica	Sintomatica	Nefrite tubulo-interstiziale diffusa moderata e proteinuria. **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer.**
9	**LUCKY**	1,1a	28/01/08	CKD IRIS 4 HP P	CKD	Sintomatiche	Atrofia glomerulare cistica; glomerulosclerosi (33%), fibrosi interstiziale (50-60%); quadri compatibili con una patologia familiare/ereditaria. **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer.**
10	**ZOE**	1a	20/11/06	CKD	Rene policistico	no	Nefrite interstiziale cronica multifocale associata a sclerosi focale. **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer.**
11	**OHARA**	8aa	19/12/05	CKD	CKD	no	Glomerulosclerosi diffusa e nefrite interstiziale con grave fibrosi interstiziale. **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer.**
12	**ALBA**	6aa	23/06/09	CKD IRIS 2	cardiopatia	Dieta	Glomerulonefropatia membrano-proliferativa; glomerulosclerosi globale (5/11); nefirte interstiziale linfocitaria; fibrosi interstiziale (40%). **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer**
13	SEBASTIA-NO	8aa	25/07/05	Anemia, ITU, CKD	CKD	Sintomatica	Glomerulonefrite cronica moderata multifocale fibrosante
14	**ACHILLE**	4aa	13/01/09	CKD	no	Fluidi, antibiotici	Glomerulonefrite crescentica; fibrosi interstiziale grave-diffusa (60-70%); atrofia tubulare e nefrite interstiziale cronica grave. **Lesione displastica: nefropatia giovanile del Boxer.**

Tabella n°2: Dettagli riguardanti i 14 Boxer sottoposti a biopsia renale.

Nove biopsie (64%) su 14 casi furono indicative di lesioni displastiche associate a nefropatie giovanili, l'età media era di 3aa e 9 mesi con una prevalenza, sulla popolazione di Boxer valutata, pari al 3,76%. Le biopsie furono eseguite in modo eco-assistito con i pazienti mantenuti in anestesia endovenosa.

Dopo la valutazione clinica un catetere endovenoso (20G) è stato posto nella vena cefalica sinistra o destra e collegato a una linea di infusione, necessaria per la fluido terapia (normale soluzione salina, NaCl 0,9% al tasso di 10ml/kg/ora) e per l'induzione dell'anestesia.

L'anestesia è stata eseguita iniettando propofol, alla dose di 2mg / kg, in bolo lento, e.v. Il cane è stato posizionato in decubito laterale destro e la biopsia eseguita sul polo caudale del rene sinistro, dopo tosatura accurata del mantello e la cute della zona preparata asetticamente.

Tutte le biopsie sono state eseguite per via percutanea, sotto controllo ecografico, impiegando aghi monouso da biopsia, Tru-Cut da 18G, manovrati da dispositivo automatico a molla (Magnum™ - Baxter). Due campioni bioptici sono stati prelevati dalla corticale renale del polo caudale sinistro. Per evitare la formazione di coaguli di sangue nella pelvi renale, la fluido terapia è stata mantenuta per circa 30 minuti dopo ogni biopsia, fino a completo risveglio del cane, mentre il polso femorale ed il tempo di riempimento capillare (TRC) venivano costantemente monitorati. Prima del termine della procedura, ogni paziente è stato controllato ecograficamente per rilevare eventuali segni di emorragia al sito bioptico renale.

Per la gestione dei campioni bioptici è stata seguita una procedura standard per la microscopia ottica, fissandoli in formalina tamponata (10%), inclusa in paraffina, e fette di tessuto tagliate a 3 micron di spessore. Sezioni seriali venivano poi colorate con: Ematossilina Eosina, acido periodico di Schiff (PAS), fucsina acida e arancio G (AFOG), Tricromica di Masson, Ematossilina Fosfotungstica Acida (PTAH) ed elastina di Miller. Tutte le biopsie renali sono state valutate dallo stesso patologo (Dr. Luca Aresu), presso il Dipartimento di Salute Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica dell'Università di Padova.

Fig. a **Fig. b**

Cane Boxer m. di circa tre anni (Dux, n°2 della tab ella) valutato la prima volta all'età di un anno e 10 mesi per PU/PD, CKD IRIS stadio 3, proteinurico (PU/CU=1.7), lievemente iperteso (Sist.158 mm/Hg, con metodo oscillometrico). Rivalutato dopo 10 mesi le condizioni erano gravemente peggiorate e fu sottoposto ad eutanasia, il rene sinistro rimosso e valutato tramite esame istologico.

Fig.a: immagine del cane evidenziante il significativo stato di dimagrimento; **Fig. b**: sezione autoptica del rene, evidenzia riduzione di spessore della corticale, ampie zone di sclerosi e bacinetto renale notevolmente dilatato

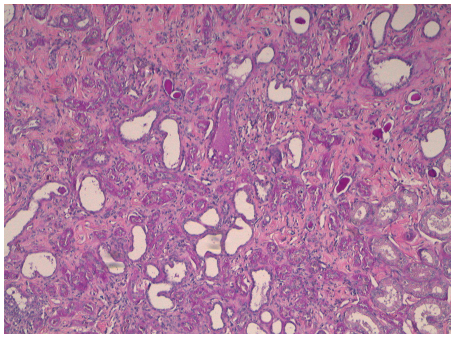


Fig c

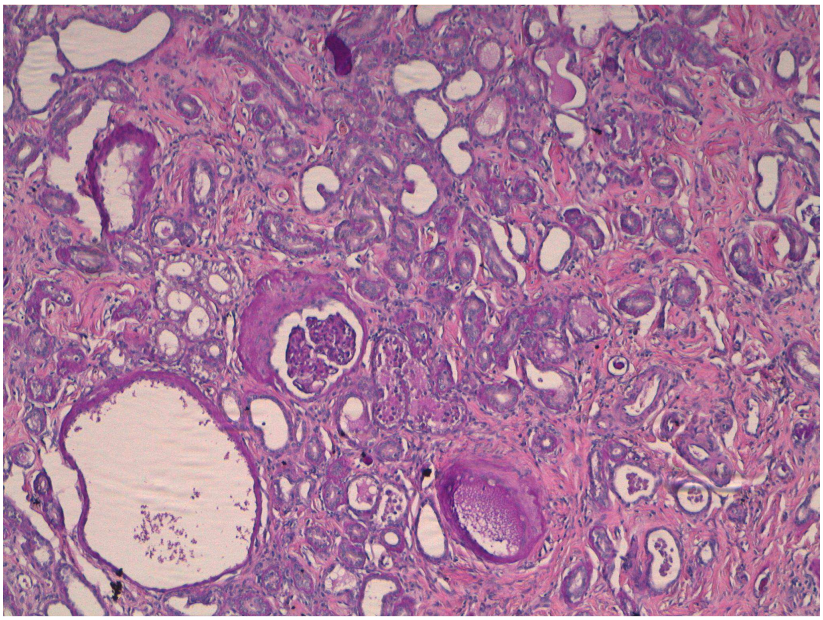


Fig d

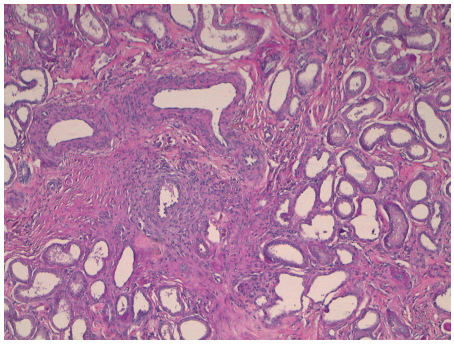


Fig e

Immagini istologiche **(Fig. c, d, e)**

Si osservano tre sezioni, ottenute dal campione renale inviato, caratterizzate da ampie aree cortico-midollari, occasionalmente corrispondenti ad aree capsulari di tipo emorragico e proliferativo, con abbondate stroma fibroso e fibroblasti prominenti. In associazione si osservano numerosi glomeruli sclerotici e strutture tubulari gravemente ectasiche, spesso irregolari o con aspetti proliferativo-iperplastici epiteliali e contenenti abbondate materiale proteinaceo, eosinofilo, multifocale. In aggiunta si osserva un moderato infiltrato interstiziale multifocale linfoplasmacellulare. Si osservano inoltre lieve atrofia glomerulare cistica, lieve-moderata fibrosi periglomerulare e mineralizzazioni multifocali. Si rileva infine materiale granulare brunastro intraepiteliale tubulare, riferibile a pigmento ed occasionale displasia vascolare.

Diagnosi: lesioni compatibili con nefropatia giovanile del Boxer

Tabella n° 3. Dettagli ed esemplificativi di un caso di Boxer affetto da patologia renale giovanile/familiare.

SCOPO DELLO STUDIO

Sulla base di questi elementi si è voluto indagare su una popolazione di giovani Boxer dell'età di circa 12 mesi, valutati nel periodo dal 2009 al 2010, e provenienti dallo stesso allevamento. Nella fase terminale dello studio si è avuta la possibilità di indagare un numero limitato di boxer (cinque), della stessa età, ma di linee di sangue diverse. In questi soggetti sono stati analizzati alcuni parametri di base e di facile esecuzione, in qualunque ambiente medico veterinario, per valutare se fossero sufficienti a definire l'eventuale indice predittivo positivo dell'indagine, con lo scopo di identificare precocemente individui affetti da patologia renale familiare o congenita (nefropatia giovanile).

Sono stati individuati 120 casi su cui sono stati eseguiti esami clinici, del sangue di base (eseguiti dopo almeno otto ore di digiuno) e delle prime urine del mattino, in particolare: ematologici, ematochimici (creatinina, urea, proteine totali) ed esame urine (esame chimico-fisico, sedimento e proteinuria valutata tramite cartina/dipstick e col rapporto PU/CU) eseguiti nel laboratorio dell'ospedale veterinario ANUBI®. Di questi ne sono stati eliminati 36 in quanto non omogenei nella documentazione. I rimanenti 84 casi sono stati sottoposti a valutazioni ed a indagini statistiche.

MATERIALI E METODI

Per **l'esame ematologico** è stato usato uno strumento CELL-DYN® 3700 (Abbott) che utilizza quattro metodi di misurazione indipendenti. 1) Il conteggio ottico dei leucociti. 2) La misurazione di impedenza dei leucociti, che viene effettuata in un canale di impedenza elettrica. 3) I dati relativi ad eritrociti e piastrine vengono misurati in un secondo canale di impedenza elettrica. 4)L'emoglobina viene misurata nel canale spettrofotometrico. Durante ciascun ciclo dello strumento il campione di sangue viene aspirato, diluito e miscelato e vengono effettuate le misurazioni di ciascun parametro.

I leucociti vengono analizzati in due canali separati: a) il canale ottico (WOC = conteggio ottico dei leucociti) dove, sulla camera di lettura, viene focalizzato un raggio laser; quando il flusso di campione interseca il raggio laser, la luce scatter, causata dalle cellule, viene misurata a quattro diversi intervalli angolari. b) La misurazione di impedenza dei leucociti (WIC) per contare i leucociti che passano attraverso l'orifizio.

L'impedenza elettrica viene utilizzata anche per contare gli eritrociti e le piastrine.

Ematochimica

E' stata eseguita tramite il sistema di Chimica Clinica ILab 300 Plus (Instrumentation Laboratory SpA, Viale Monza 338, 20129 Milano), sottoposto a controllo di qualità in accordo con la "buona pratica di laboratorio".

Creatinina: analisi fixed time, metodo basato sulla reazione della creatinina con l'acido picrico in ambiente alcalino. Intervalli di riferimento: 0.6-1.4 mg/dl, secondo le indicazioni IRIS (Elliott 2009).

Urea: analisi fixed time. Metodo ureasi/GLDH[2].

Proteine totali: analisi end point. Metodo biureto modificato basato sulla reazione dei legami peptidici con ioni Cu^{++} in soluzione alcalina con sviluppo di un complesso colorato. L'aumento di assorbanza (eseguita a 546 nm), dovuto alla formazione del complesso colorato, è proporzionale alla concentrazione delle proteine nel campione.

Esame delle urine.

Chimicofisico: tramite sistema semiquantitativo a cartine(dipstick) con valutazione del pH, glucosio, bilirubina, corpi chetonici, sangue, emoglobina, proteine. Le cartine virano di colore in funzione dei vari reagenti specifici per ogni valore considerato (Fry, 2011). Il peso specifico è stato valutato tramite rifrattometro. Il sedimento urinario, analizzato dopo centrifugazione di una aliquota di 5ml di urina a 1500gpm per 5', ed eliminazione del surnatante, è stato colorato con Kowa Stain™ (Hycor Biomedical Inc. Garden Grove, CA USA) ed una goccia immessa in camera apposita su vetrini a celle per urine (Pentasquare per sedimenti urinari a 10 posti. ROLL s.a.s. Pieve di Sacco, Italy) e valutato al microscopio a 20X e 40X. La presenza di sedimento attivo (presenza di eritrociti o leucociti > 5 a 40X) veniva considerato elemento di esclusione dallo studio, in quanto l'eventuale proteinuria non era di origine renale pura. La proteinuria è stata anche valutata tramite il rapporto creatinina urinaria/proteine urinarie (PU/CU) in cui la creatinina nelle urine è stata quantificata con la stessa metodologia della creatinina ematica diluendo 1 a 2 il campione, mentre la proteinuria è stata quantificata tramite determinazione colorimetrica diretta con Pirogallolo Red delle proteine totali nelle urine. Parametro di riferimento normale: rapporto PU/CU < 0.5 con peso specifico > 1012 (Lees et al, 2005).

Gli esami del sangue e delle urine sono stati eseguiti lo stesso giorno del prelievo, effettuato dalla vena cefalica per il sangue e cistocentesi, cateterismo uretrale o minzione spontanea per le urine. Il metodo di prelievo delle urine non è stato ritenuto

influente in quanto i parametri analizzati, in particolare, erano il peso specifico e la proteinuria.

Valutazione statistica dei dati

I dati ematici ed urinari sono stati sottoposti ad analisi statistica attraverso l'uso del software SIGMA STAT 3.05 mediante la misurazione della varianza (ANOVA) al fine di valutare l'effetto del peso specifico sui parametri considerati. Infine, all'interno di ogni singola classe di peso specifico sono stati calcolati i coefficienti di correlazione di Pearson tra tutti i parametri ematici ed urinari considerati. Dettagli relativi ai singoli valori sono riportati in appendice 2.

RISULTATI

I risultati sono indicati con diagrammi a distribuzione in cui l'asse verticale esprime il valore esaminato, mentre l'asse orizzontale indica il numero dei Boxer esaminati. In caso di diversa classificazione i dettagli sono descritti nelle legende delle figure specifiche. Le ellissi disegnate indicano i casi in cui i parametri sono risultati superiori od inferiori ai limiti di range di riferimento.

Fra i **valori ematologici**, sono stati presi in considerazione in particolare i leucociti ed il valore ematocrito (HCT):

Leucociti

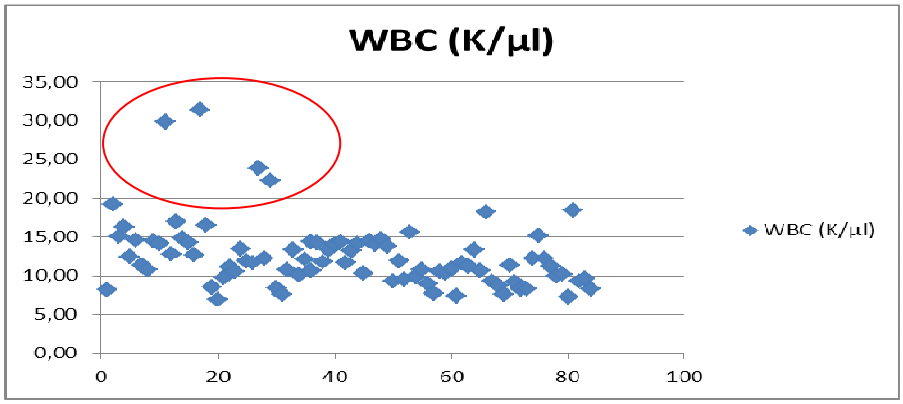


Fig. n°1 : indicante la distribuzione dei leucociti (WBC)

Valore	Range	Max	Min	Median	25%	75%
WBC (K/µl)	24,490	31,400	6,910	11,750	9,875	14,250

Media: 12.558 µl; Deviazione Standard: 4,290; Errore Standard: 0,468; C.I. of Mean: 0.931

Ematocrito (HCT)

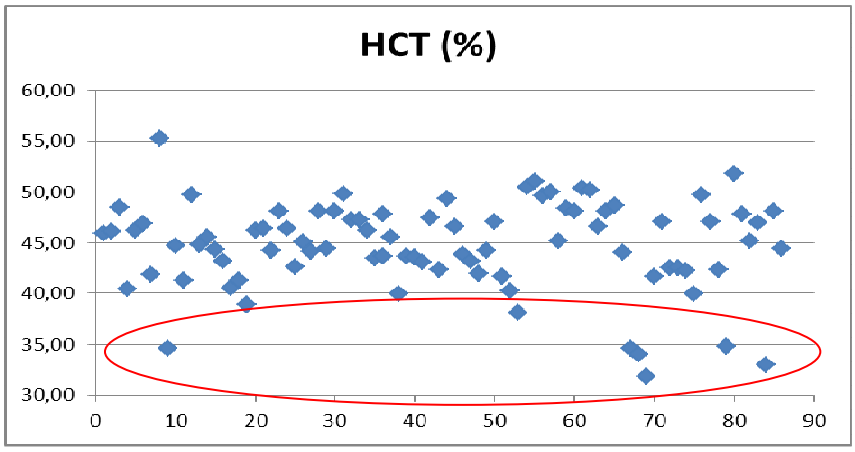


Fig. n°2 : indicante la distribuzione del valore ematocrito

Valore	Range	Max	Min	Median	25%	75%
HCT (%)	23,400	55,300	31,900	45,20	42,400	47,800

Media: 44,812%; Deviazione Standard 4,262; Errore Standard: 0,468; C.I. of Mean: 0,925

Ematochimica

Come già accennato, i valori ematochimici presi in considerazioni si sono limitati a proteine totali, creatinina ed urea, per utilizzare parametri disponibili in qualunque struttura medico-veterinaria, anche in normali ambulatori.

Proteine totali ematiche

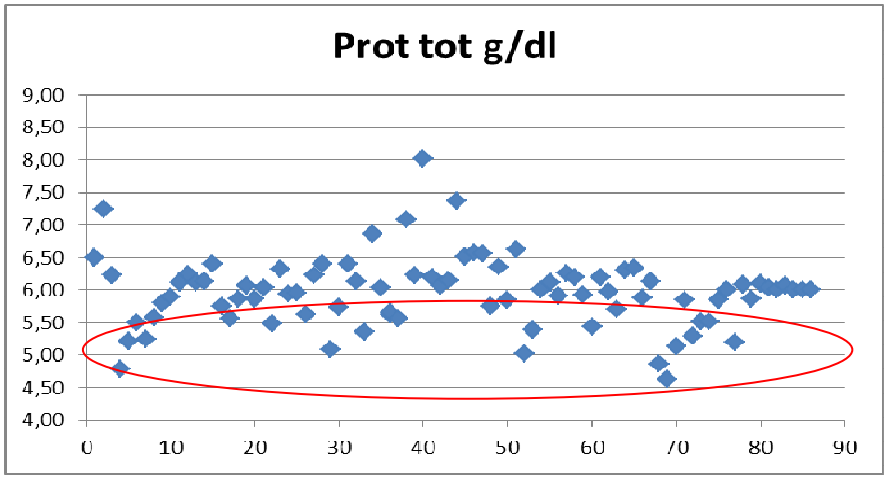


Fig. n°3 : indicante la distribuzione delle proteine totali

Valore	Range	Max	Min	Median	25%	75%
Prot tot g/dl	3,400	8,020	4,620	6,000	5,622	6,228

Media: 5,961g/dl; Deviazione Standard 0,556; Errore Standard: 0,0611; C.I of Mean 1,656.

Creatininemia

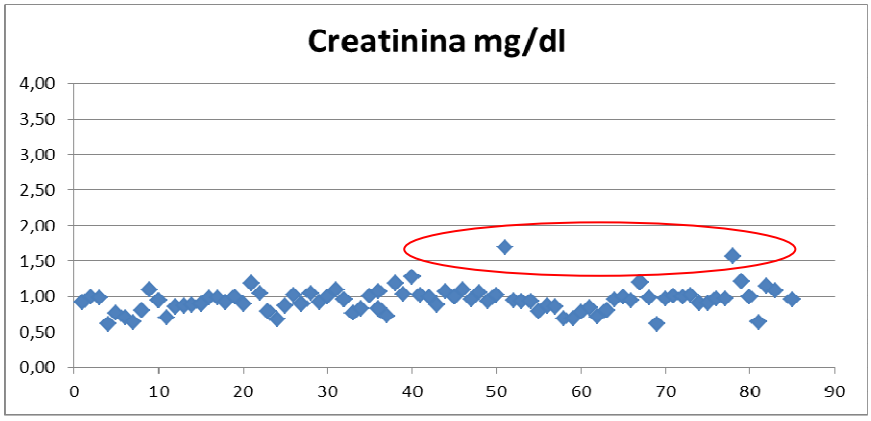


Fig. n°4 : indicante la distribuzione dei valori della creatininemia

Valore	**Range**	**Max**	**Min**	**Median**	**25%**	**75%**
Creatinina mg/dl	1,080	1,690	0,610	0,955	0,855	1,020

Media: 0.945mg/dl; Deviazione Standard: 0,179; Errore Standard: 0,0195; C.I. of mean: 0,0388.

Urea

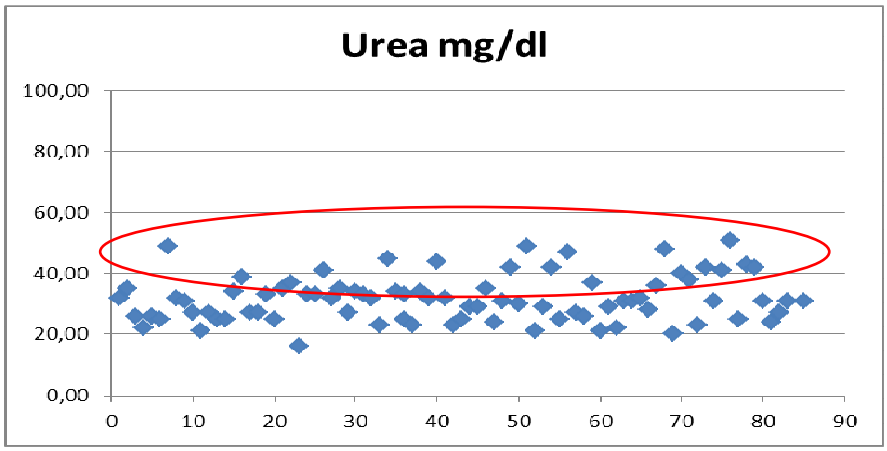


Fig. n°5 : indicante la distribuzione dei valori dell' urea

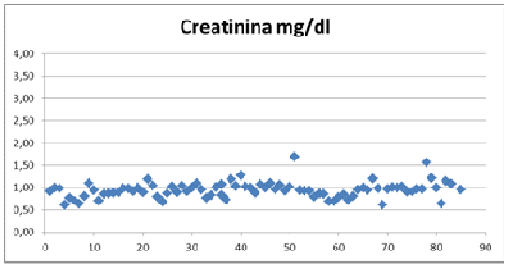
Valore	**Range**	**Max**	**Min**	**Median**	**25%**	**75%**
Urea mg/dl	35,000	51,000	16,000	31,000	25,500	35,000

Media: 31,652mg/dl; Deviazione Standard: 7,629; Errore Standard: 0,832; C.I. of mean 1,656

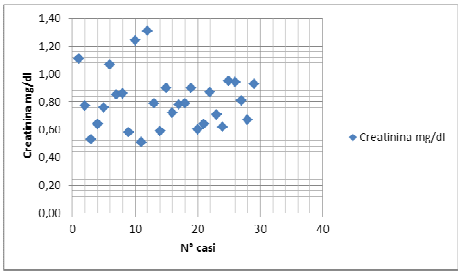
Gruppo di cani di razza non Boxer

Estrapolati dal database dell' ospedale ANUBI®, sono anche stati analizzati i valori di proteine totali, creatinina ed urea nel siero di 30 cani, di circa 12 mesi di età, appartenenti a diverse razze ed incroci, con patologie varie ma non coinvolgenti l'apparato urinario superiore ed inferiore.

A

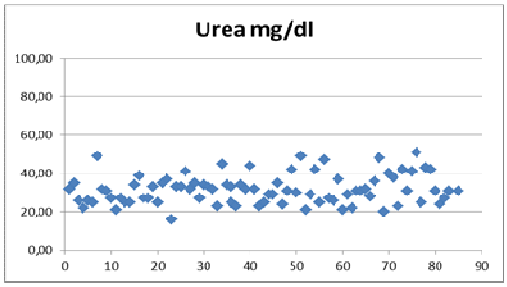


B

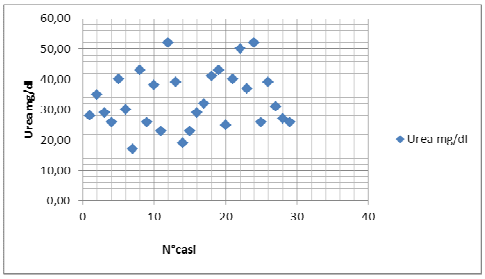


Distribuzione creatinina nel gruppo di Boxer, A) e nel gruppo di cani non Boxer B)

C

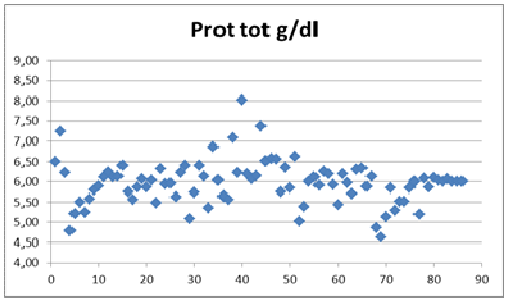


D

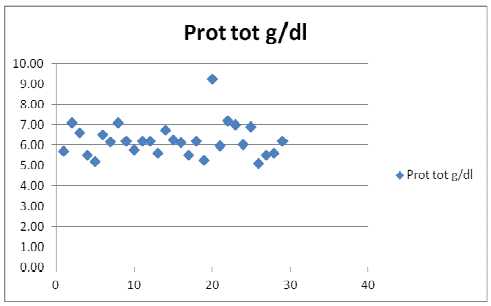


Distribuzione urea nel gruppo di Boxer, C) e nel gruppo di cani non Boxer, D)

E



F



Distribuzione Proteine totali Boxer, E) e nel gruppo di cani non Boxer, F)

Esami urine

Degli esami delle urine sono stati presi particolarmente in considerazione i valori delle proteine, derivanti dalla misurazione semiquantitativa tramite dipstick, e tramite rapporto proteine/creatinina urinarie - PU/PC, dopo che il sedimento urinario risultava

inattivo (esame microscopico del sedimento), ed il valore del peso specifico misurato tramite rifrattometro. Di un caso manca la misurazione PU/PC.

Column	Size	Missing	Mean	Std Dev	Std. Error	C.I. of Mean
Peso specifico*	**84**	**0**	**1028,452**	**12,569**	**1,371**	**2,728**
pH	84	0	6,399	1,086	0,118	0,236
Nitriti	84	19	0,000	0,000	0,000	0,000
Proteine(dipstick)	**84**	**0**	**0,940**	**0,827**	**0,0902**	**0,179**
Glucosio	84	0	0,000	0,000	0,000	0,000
Corpi Chetonici	84	0	0,202	0,404	0,0441	0,0877
Urobilinogeno	84	0	0,000	0,000	0,000	0,000
Birilubina	84	0	0,202	0,485	0,0530	0,105
Eritrociti/Emoglobina	84	0	0,214	0,729	0,0796	0,158
Proteine U mg/dl	84	1	18,547	16,615	1,824	3,628
Creatinina U mg/dl	84	1	279,776	307,387	33,740	67,120
PU/CU	**84**	**1**	**0,0960**	**0,101**	**0,0111**	**0,0220**

Column	Range	Max	Min	Median	25%	75%
Peso specifico*	**47,000**	**1051,000**	**1004,000**	**1029,000**	**1020,000**	**1038,000**
pH	3,500	8,500	5,000	6,500	5,500	7,000
Nitriti	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Proteine(dipstick)	**3,000**	**3,000**	**0,000**	**1,000**	**0,000**	**1,000**
Glucosio	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Corpi Chetonici	1,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Urobilinogeno	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Birilubina	2,000	2,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Eritrociti/Emoglobina	4,000	4,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Proteine U mg/dl	77,400	78,200	0,800	11,600	6,725	28,000
Creatinina U mg/dl	2378,240	2413,490	35,250	196,740	138,248	318,988
PU/CU	**0,494**	**0,500**	**0,00600**	**0,0500**	**0,0300**	**0,130**

Tabella n°4: risultati dei valori urinari, misurati con metodo semiquantitativo (cartina / dipstick), e del rapporto PU/PC. * Il peso specifico è stato misurato tramite rifrattometro.

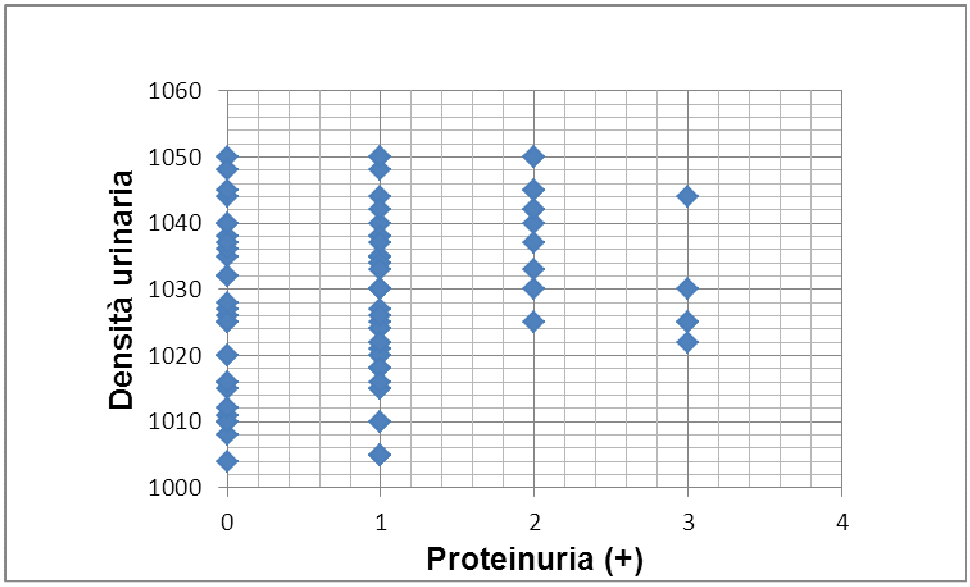


Fig. n°6: indicante il rapporto fra valore della proteinuria, misurato con dipstick (asse orizzontale), ed il peso specifico (densità urinaria).

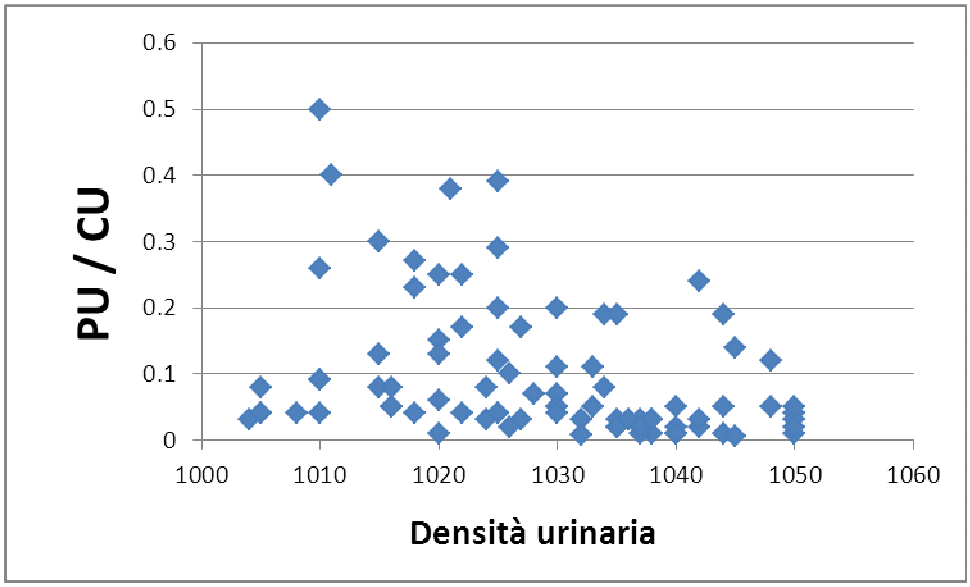


Fig. n°7: indicante il rapporto fra valore della proteinuria, misurato con il rapporto PU/PC, ed il peso specifico (densità urinaria).

I campioni di urina sono stati divisi in tre classi, in funzione del peso specifico (Osborne, 1995).

1. PS: < 1012 (urine ipostenuriche o con osmolalità < a quella sierica) **N: 11**
2. PS: 1012 – 1025 (urine isostenuriche o con osmolalità = a quella sierica) **N: 26**
3. PS: > 1025 (urine iperstenuriche o con osmolalità > a quella sierica) **N: 47**

I parametri ematologici, biochimici ed urinari presi in considerazione sono stati successivamente confrontati con queste tre classi ed analizzati con il sitema Anova ad una via, considerando media, deviazione standard ed errore standard della media. Inoltre sono stati evidenziati i paramentri in cui esiste una significatività statistica (P<0.05).

I risultati sono stati riportati nelle tabelle 5-6-7 sottostanti:

Parametri	Val. Normali §	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
WBC (10^3/µl)	6 - 17	16,59 ± 8,12 *	12,28 ± 3,12**	11,77 ± 3,0 **
RBC (10^6/µl)	5.5 – 8.5	7,21 ± 0,42	7,51 ± 0,64	7,40 ± 0,71
HGB (g/dl)	12.0 – 18.0	17,29±0,79	17,78±1,75	17,25±2,17
HCT (%)	37-55	45,08 ± 4,21	44,95 ± 4,21	44,67 ± 4,7

MCV (fl)	66.0 – 77-0	62,68 ± 6,21	60,02 ± 4,04	60,47 ± 4,60
MHC (pg)	19.9 – 24.5	24,05 ± 1,28	23,68 ± 1,45	23,35 ± 2,31
MCHC (g/dl)	31.0 – 34.0	38,60 ± 3,16	39,58 ± 2,78	38,60 ± 2,60
RDW (%)	12 -15	15,86 ± 1,69**	17,12 ± 1,84	18,08 ± 2,62*
Piastrine (10^3/µl)	145 - 440	239,91 ± 67,10	219,11 ± 79,10	206,16 ± 64,01
Neutrofili (10^3/µl)	3.9 - 12	11,92 ± 6,89*	8,53 ± 2,49**	8,16 ± 2,40**
Linfociti (10^3/µl)	1 – 4.8	2,50 ± 1,03	2,38 ± 1,11	2,24 ± 0,82
Monociti (10^3/µl)	0.1 – 1.8	0,98 ± 0,63*	0,59 ± 0,34**	0,66 ± 0,32**
Eosinofili (10^3/µl)	0.0 – 1.9	0,64 ± 0,44	0,53 ± 0,53	0,49 ± 0,37
Basofili (10^3/µl)	0.0 – 0.2	0,34 ± 0,38	0,23 ± 0,17	0,21 ± 0,21
Neutrofili (%)	60 - 77	70,43 ± 7,440	69,64 ± 8,39	69,08 ± 7,75
Linfociti (%)	12 – 30	16,69 ± 6,77	19,33 ± 7,64	19,35 ± 5,72
Monociti (%)	3 – 10	5,68 ± 2,03	4,94 ± 2,73	5,59 ± 2,66
Eosinofili (%)	2 – 10	4,35 ± 2,54	4,23 ± 3,59	4,30 ± 3,01
Basofili (%)	0.0 – 1.0	1,67 ± 1,27	1,77 ± 1,36	1,69 ± 1,38

***,**:** asterischi diversi sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

§ Dati da: Jain NC: Schalm's Veterinary Hematology, 4th ed. Philadelphia: Lea & Febiger,1986

Tabella n° 5. Valori medi dei **parametri ematologici** espressi nelle loro unità di misura convenzionali con le relative deviazioni standard nei tre gruppi, Gruppo A (ipostenurici), B (isostenurici) e C (iperstenurici).

Parametri	Val. Normali §	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
Proteine totali (g/dl)	5.5-7.6	5,8 ± 0,56	6,05 ± 0,46	5,94 ± 0,603
Creatinina (mg/dl)	0.68 – 1.40	0,88 ± 0,15	0,97 ± 0,19	0,94 ± 0,17
Urea (mg/dl)	8.0-31.0	28,71 ± 5,02	32,19 ± 6,16	32,04 ± 8,74

Tabella n° 6. Valori medi dei **parametri ematochimici** espressi nelle loro unità di misura convenzionali con le relative deviazioni standard nei tre gruppi, Gruppo A (ipostenurici), B (isostenurici) e C (iperstenurici), e significatività statistica osservata.

§ Dati da: Kaneko JJ Ed.: Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 4th ed. San Diego: Academic Press, 1989.

Parametri	Valori Normali §	Gruppo A	Gruppo B	Gruppo C
Peso specifico urinario	Random 1001-1070	1008,00 ± 2,70*	1020,46 ± 3,60**	1037,66 ± 7,32***
pH	6.0 – 7.5	7,18 ± 1,01*	6,38 ± 0,99	6,22 ± 1,09**
Nitriti	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Glucosio	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Urobilinogeno	0	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Bilirubina	0 - tracce	0,27 ± 0,65	0,04 ± 0,19	0,28 ± 0,54
Eritrociti/Emoglobina	0 - tracce	0,64 ± 1,29	0,11 ± 0,43	0,17 ± 0,67
Proteinuria (dipstick)	Neg con PS<1035	0,55 ± 0,52	1,00 ± 0.89	1,00 ± 0,83
Proteinuria (PU/PC)	< 0.2 ψ	0,12 ± 0,15	0.15 ± 0,11*	0,06 ± 0,008**

,**,:** asterischi diversi sulla stessa riga indicano differenze statisticamente significative (P<0.05)

§ Dati da**:** Fry M.M. (2011); ψ Dati IRIS

Tabella n° 7. Valori medi dei **parametri urinari** espressi nelle loro unità di misura convenzionali con le relative deviazioni standard nei tre gruppi. Gruppo A (ipostenurici), B (isostenurici) e C (iperstenurici).

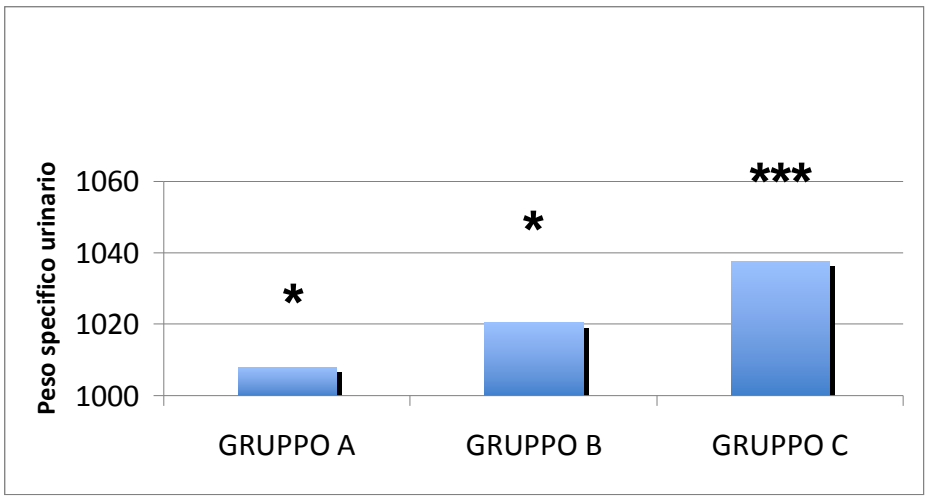


Fig n° 8: Istogramma rappresentante la distribuzione dei tre gruppi di urine ipostenuriche (A), isostenuriche (b) ed iperstenuriche (c). *, **, ***: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

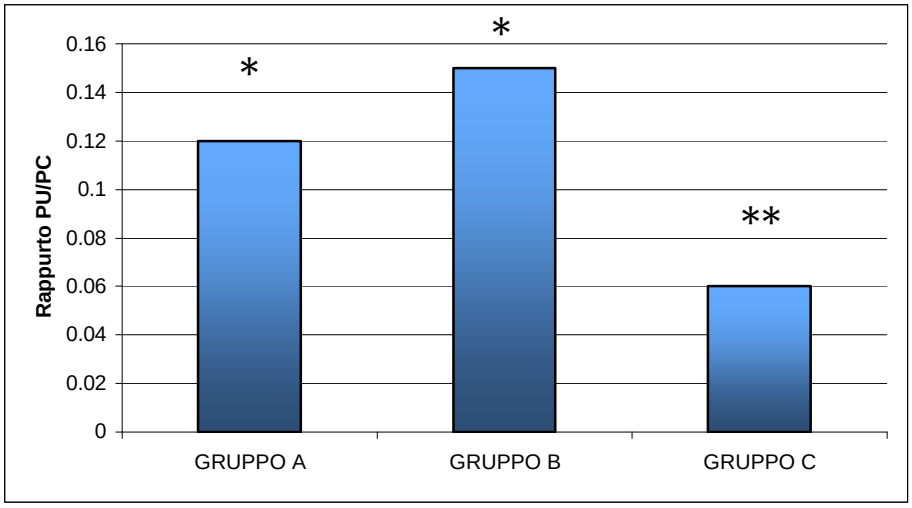


Fig n° 9: Istogramma rappresentante la distribuzione dei tre gruppi di urine in relazione al rapporto Proteine Urinarie / Creatinina Urinaria. *, **: asterischi diversi indicano differenze statisticamente significative (P<0.05).

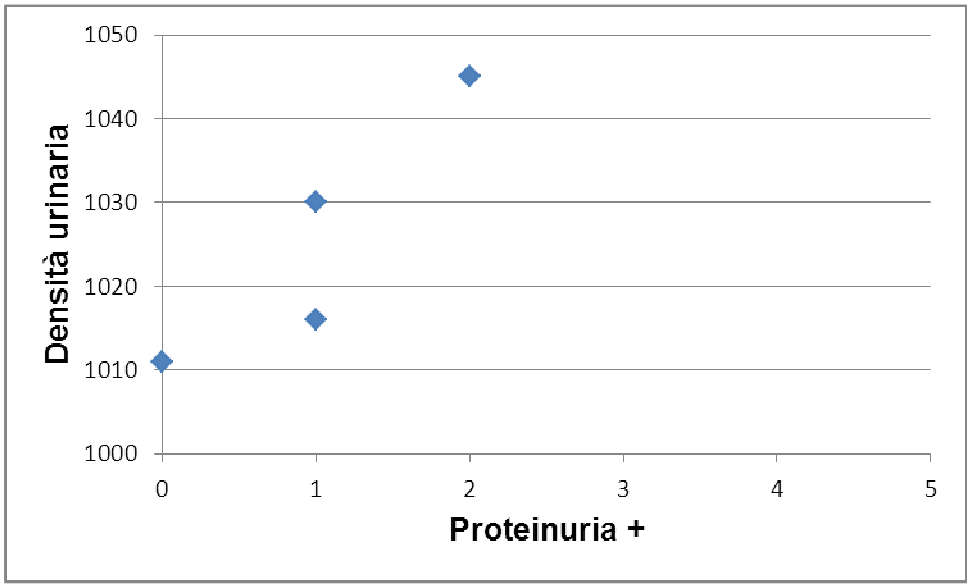


Fig n°10: quattro misurazioni della densità urinaria e proteinuria (dipstick), eseguiti in tempi diversi, sullo stesso boxer (n° 120), che ha presentato cilindri granulosi nel sedimento.

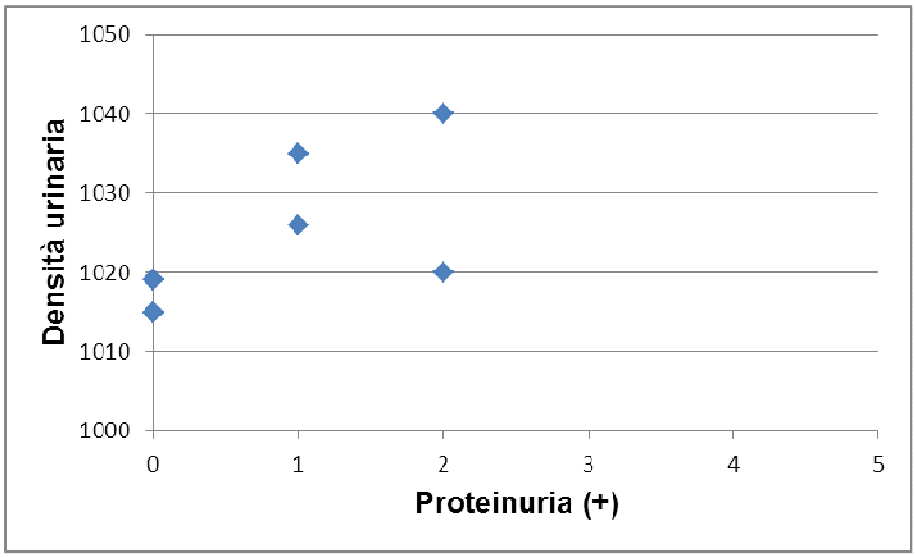


Fig n°11: sei misurazioni della densità urinaria e proteinuria (dipstick), eseguiti in tempi diversi, sullo stesso boxer (n° 93), che ha presentato cilindri granulosi nel sedimento.

DISCUSSIONE

Considerando la classificazione delle cause di nefropatie elencate nella tabella n°1, quella del boxer viene definita come nefropatia da reflusso con ipoplasia segmentale. Il parere dell'autore in accordo a quanto sostenuto dal Dr. Luca Aresu, patologo della Sezione di Anatomia Patologica dell'Università di Padova, non esclude tuttavia la possibilità di altre eziologie, considerato anche il fatto che l'articolo di Kolbjørnsen (2008) si basa solamente su 7 casi. Pertanto, in questo studio, continuiamo a parlare di nefropatie giovanili nel boxer.

Per quanto riguarda la valutazione dei dati di laboratorio eseguiti sui nostri 84 casi, come già anticipato, i valori sono stati classificati in rapporto alla suddivisione in tre gruppi, differenziati sul valore del peso specifico urinario (ipostenurici, isostenurici, iperstenurici). Abbiamo riscontrato quanto segue.

Esami ematologici e biochimici

1. Leucociti - WBC (range di riferimento: 6.000-17.000µl). Ad eccezione di 4 casi (n°15, 21, 32, 34) che presentavano leucocitosi senza particolare sintomatologia o segni clinici riferibili ad infezioni sistemiche o delle vie urinarie, i valori sono

rimasti nei normali limiti di riferimento. La differenza nei tre gruppi ha evidenziato un valore statisticamente significativo (P= 0.003).

2. Il valore ematocrito (HCT, range di riferimento: 37-55%) è stato scelto come stima diretta del valore dei globuli rossi e come elemento di valutazione di eventuali stati anemici. Solo 6 casi (N°3, 13, 99, 100, 101, 119) presentavano parametri riferibili ai limiti inferiori di range. Non si sono rilevate differenze nei tre gruppi statisticamente significative (P=0.439).
3. Per quanto concerne invece i valori relativi alle proteine totali troviamo un numero significativo di individui in cui i valori sono al di sotto dei limiti minimi di riferimento (range di riferimento 5.5-7.6 g/dl); in particolare i casi N° 5, 6, 8, 23, 30, 34, 54, 55, 62, 70, 71, 72, 74,79 - 14 casi, pari al 11,6% -. La spiegazione può essere riferita a condizioni alimentari non ottimali, in quanto alcuni di questi individui presentavano un valore di body scoring (BS) lievemente inferiore all'ottimale (4-5/9. Remillard, 2005). I dati non sono statisticamente significativi (P=0.480).
4. I valori di creatininemia (range di riferimento 0.68 – 1.40 mg/dl) indicano una buona situazione con solo due casi eccedenti di poco i limiti (casi n° 53, 80), questi due casi presentano valori normali di urea. La maggioranza dei casi sono al di sotto del valore di 1mg/dl. Una buona media, considerato il fatto che la razza Boxer è caratterizzata da un buon sviluppo della massa muscolare, e quindi può presentare, in condizioni di normalità, valori normali di creatinina (metabolita della creatina muscolare) verso i limiti alti dell'intervallo di riferimento normale. Anche per la creatininemia non ci sono dati statisticamente significativi (P= 0.395).
5. I valori dell'urea sono in una media lievemente superiore all'intervallo di riferimento (8.0-31.0mg/dl), con valori in alcuni casi relativamente alti. Tali parametri non vanno correlati solamente alla funzionalità renale ma anche al tipo di alimentazione. In particolare, essendo la popolazione osservata di età attorno ai 12 mesi, è da presumere che fossero alimentati con diete ricche di proteine. Tuttavia questa osservazione non è in completa armonia con i parametri concernenti le proteine totali. I valori del'urea sono molto condizionati dallo stato di idratazione del momento, dal tempo intercorso fra il prelievo del sangue e la distanza dai pasti e dalla presenza o meno di sangue intestinale (per es. da parassiti intestinali) (Stockham, 2002), variabili queste che non sono state tutte considerate nello sviluppo di questo studio. Nessuna significatività statistica anche in questo gruppo di valori (P=0.393).

Gruppo di cani razza non boxer

In questo gruppo analizzato per confronto, data la disponibilità delle informazioni, è interessante notare come i dati, pur distribuiti ampiamente, rimangono nell'intervallo di riferimento ed i valori relativi a creatinina, urea e proteine totali siano abbastanza simili al gruppo dei Boxer, a sottolineare una certa omogeneità di funzionalità renale nelle varie razze, quando ci si basa su questi parametri ed in condizioni di età analoghe. Come precedentemente accennato, la massa muscolare influisce sul valore della creatininemia (Elliott, 2009), infatti un valore vicino al limite massimo del range, es 1.4mg/dl, induce a diverse considerazioni cliniche se il valore appartiene ad un cane di razza toy oppure ad un molosso. Tuttavia nel nostro studio, proprio per evitare tale variabile, abbiamo indagato su cani con dimensioni corporee molto standardizzate.

Esami delle urine

I dati relativi alle urine, suddivise nei tre gruppi in base all'osmolalità, sono alquanto omogenei ed in particolare si sono riscontrate significatività statistiche nei tre gruppi. Per quel che concerne il peso specifico ed il rapporto PU/CU, fra Gruppo A e Gruppo C (P=<0,001). Anche a carico del pH si ha significatività fra Gruppo A e Gruppo C (P=0,029), ma questo aspetto è meno importante nel nostro studio, in quanto il pH urinario è condizionato da molti fattori che esulano dalla patologia indagata (per esempio il tipo di alimentazione).

Su due cani (n°120 e 93 – Fig. n°10 e 11 - dello studio), sono stati eseguiti esami ripetuti delle urine perché inizialmente presentavano valori bassi di densità associati a spiccata cilindruria (cilindri granulosi). Tuttavia le ulteriori valutazioni hanno evidenziato che le altre misurazioni mostravano valori normali di densità e la cilindruria non era presente. In questi due cani la proteinuria era associata a sedimento lievemente attivo, pertanto non è stato valutato il rapporto PU/CU. Non siamo in grado di spiegare, sulla base dei dati a disposizione la causa di questa cilindruria alternante.

Quindi va sottolineato che, tra tutti i dati valutati, quelli che hanno presentato elementi di significatività statistica sono stati il peso specifico e la proteinuria valutata tramite rapporto PU/CU.

Il basso speso specifico urinario e la presenza di proteinuria di origine renale sono parametri che permettono di evidenziare in maniera precoce e prima di ogni altro

esame di laboratorio la presenza di malattia renale. Infatti la presenza di valori ematici elevati di urea e creatinina, che indicano il cosiddetto stato uremico, si manifestano quando il danno renale ha superato il 75% del volume dei due organi. Questi concetti ed i seguenti della discussione sono correlati al cosiddetto danno renale primario, escludendo le cause di azotemia pre-renali (per esempio: grave stato di disidratazione da cause varie) o post-renali (per esempio: ostruzione delle vie escretrici urinarie inferiori) ed anche la proteinuria di origine pre- e post-renale (per esempio proteinuria di Bence Jones o da infezione delle basse vie urinarie). Infatti queste due tipologie di danno, pre- e post-renale, sono spesso reversibili se propriamente diagnosticate e trattate o curate. Parlando di patologia renale giovanile si definisce una malattia renale cronica primaria o CKD (Chronic Kidney Disease), classificabile secondo lo schema IRIS (appendice 1).

Tornando al peso specifico dell'urina, esso è strettamente correlato alla capacità dei tubuli renali di trattenere l'acqua tramite: a) i meccanismi di assorbimento passivo a libello del tubulo contorto prossimale, più del 60% (Verlander, 2007), b) di concentrazione contro-corrente, a livello dell'ansa di Henle, c) di risposta all'ormone antidiuretico, a livello dei dotti collettori. Alterazioni funzionali di questi meccanismi o strutturali dei tubuli renali, determinano una diminuita capacità di trattenere l' acqua e la produzione di urine molto più diluite. La persistenza di peso specifico basso, cioè di urine isostenuriche od ipostenuriche è un importante elemento diagnostico, relativamente precoce che permette di individuare la presenza di sofferenza renale. La perdita di acqua per via renale – poliuria – e la conseguente disidratazione del soggetto, viene normalmente compensata da uno stimolo sugli osmorecettori ipotalamici che innescano automaticamente il riflesso della sete. Da qui il sintomo definito poliuria-polidipsia. In fasi molto iniziali del problema la polidipsia può anche passare inosservata o, quantomeno, sottovalutata. Pertanto l'esame sistematico delle urine dei pazienti a rischio diventa estremamente importante. Nello studio sviluppato dal gruppo IRIS è stato evidenziato che il sintomo di poliuria/polidipsia è fra i primi a comparire in caso di CKD, quando gli esami del sangue sono ancora normali, ma il danno renale raggiunge ormai i 2/3 del suo volume totale.

E' noto che l'ipostenuria e/o l'isostenuria dovrebbero essere rivalutate in tempi successivi per confermarne la persistenza. Tuttavia nel nostro studio, abbiamo, per necessità, utilizzato prelievi fatti una sola volta su cani i cui proprietari partecipavano volontariamente all'indagine, perciò sarebbe stato alquanto difficile ripetere l'esame

data la varia e vasta distribuzione sul territorio di questi individui. Nel nostro studio ci siamo basati, per questo gruppo di boxer, su di un unico prelievo eseguito al mattino senza che i cani avessero urinato precedentemente (per tale motivo il prelievo è stato eseguito nei vari modi possibili: minzione spontanea, cateterismo e cistocentesi). E' noto che le prime urine del mattino sono le più significative da un punto di vista diagnostico.

Altro aspetto molto importante che ha manifestato significatività statistica nei gruppi è stata la proteinuria valutata col rapporto Proteine Urinarie / Creatinina Urinaria (PU/CU). È scientificamente evidente come la proteinuria renale primaria sia un elemento diagnostico, sulla funzionalità del nefrone, estremamente importante (Grauer, 2009).

La proteinuria renale può essere di origine glomerulare, tubulare od interstiziale, ma la frazione glomerulare è senz'altro la più importante dal punto di vista patologico, almeno alla luce dei dati attualmente disponibili. Il glomerulo è organizzato per filtrare il sangue, impedendo il passaggio a molecole di PM superiore a 69000 Daltons; questo avviene tramite specifiche fenestrature dell'endotelio capillare glomerulare ed alla carica elettrica negativa sul bordo di tali fenestrature (Osborne, 1995). In caso di danno glomerulare queste caratteristiche vengono meno e le proteine, albumine in particolare, vengono eliminate con le urine. Le cause che portano a questo tipo di alterazione sono fondamentalmente due: le patologie immunomediate, associate ad ipersensibilità di terzo tipo (Tizard, 2004) che provocano accumulo di immunocomplessi fra endotelio e podociti, in varie maniere, relativamente alla tipologia di lesione; questi immunocomplessi alterano le strutture glomerulari con conseguente incapacità di trattenere le proteine.

L'altra importante causa è l'ipertensione sistemica che, progressivamente, determina fibrosi delle strutture glomerulari, con analoghi risultati (Brown, 1990).

La proteinuria può indurre fibrosi tramite l'attivazione dei fattori di trascrizione come il NF-κB e l'alterata regolazione di geni pro-infiammatori e pro-fibrotici (Abbate, 2006). Un'altra conseguenza è la differenziazione delle cellule epiteliali tubulari in miofibroblasti, mediata dall'aumento di TGF-β (Tissue Growht Factor- β) che provoca l'aumento di matrice extracellulare e conseguentemente fibrosi (Yang e Liu, 2001). Pertanto la proteinuria è da considerarsi un marker che può permettere diagnosi di danno renale molto precoce, da qui la necessità di effettuare i dovuti controlli sulle

urine nei pazienti considerati a rischio di sviluppare patologie renali, qualunque sia l'eziologia.

La proteinuria può essere diagnosticata con vari metodi:

1) cartina o dipstick – metodo semiquantitativo - contenente un reagente che agisce strettamente con l'albumina, ma non reagisce con alcune globuline (es: proteine di Bence Jones) e può dare falsi positivi in urine alcaline,
2) test di precipitazione con l'acido sulfosalicilico (SSA), metodo semiquantitativo, che non offre particolari vantaggi rispetto alle cartine/dipstick,
3) l'elettroforesi su urine tramite gel agaroso sodiododecyl solfato. Metodo qualitativo che permette la differenziazione fra proteine glomerulari, tubulari ed interstiziali. Ha dei costi maggiori e tempi di esecuzione più lunghi (Zini, 2004),
4) valutazione della microalbuminuria, tramite test quantitativo ELISA che permette la valutazione di albumina in quantità molto più basse che tramite cartina/dipstick (Grauer, 2004),
5) rapporto Proteine Urinarie / Creatinina Urinaria (PU/CU). Valutazione quantitativa delle proteine e creatinina urinaria, usando la stessa unità di misura (mg/dl) (Grauer, 2009). L'esame viene eseguito su un campione estemporaneo di urina.
6) rapporto Albumine Urinarie / Creatinina Urinaria. Valutazione simile alla precedente utilizzando i valori di albumina e creatinina nelle urine.

Il rapporto PU/CU nelle urine è risultato essere il metodo che unisce affidabilità, semplicità e costi ridotti, pertanto è il metodo più diffuso e consigliato (Elliott 2009) per la valutazione della proteinuria. Il valore borderline indicato (appendice 1) è < 0,5. Ma il valore diventa molto più significativo se associato a peso specifico basso (Lees, 2005).

CONCLUSIONI

I dati a nostra disposizione, scelti secondo l'ipotesi di lavoro per questa tesi, non hanno permesso di evidenziare elementi indicativi di nefropatia giovanile del Boxer, nel gruppo da noi analizzato. Ci sono tuttavia alcune spiegazioni. Il numero dei casi analizzati non è particolarmente elevato ed i cani derivano da uno stesso allevamento con linee di sangue omogenee. Questo aspetto è conseguente al fatto

che abbiamo riscontrato una notevole difficoltà nel ricercare la collaborazione di altri allevatori, al fine di indagare su linee di sangue diverse. Sono risultati non preparati culturalmente ad affrontare questo tipo di selezione ancora nuova per loro, a differenza di quanto avviene già per altre patologie (per esempio, la displasia delle anche e dei gomiti). E' inoltre da ipotizzare che l'età scelta per il controllo è troppo precoce nel tempo e limita molto la possibilità di selezionare individui malati. Lo stesso concetto si evince dalla nostra documentazione sulle biopsie renali effettuate, in cui l'età media, sui 14 boxer esaminati, è di 3 anni e 9 mesi.

Tuttavia sono emersi alcuni elementi interessanti, quali l'omogeneità e la riproducibilità dei dati analizzati. Va inoltre ipotizzato che per ricercare questo tipo di patologia sono necessari altri metodi di indagini, quali l'ecografia e la biopsia renale in particolare, che potrebbe permettere l'evidenziazione di alterazioni strutturali, anche in assenza di parametri ematici ed urinari patologici. Ma proporre biopsie renali in individui clinicamente normali, al momento non è praticamente realizzabile.

Test genetici specifici potrebbero essere molto utili, ma studi mirati devono ancora essere effettuati al fine di migliorare e rendere scientificamente affidabile tale tecnica.

La diagnosi delle patologie renali giovanili, resta un argomento molto affascinante per coloro che si occupano di nefrologia e la sostanziale esiguità e disomogeneità di informazioni al riguardo sono uno stimolo a continuare su questa strada.

RINGRAZIAMENTI

Si ringraziano il Sig. Mauro Barbero, proprietario dell'allevamento di Boxer "Del Roero". La Dr.ssa Eleonora Galli per il paziente lavoro di registrazione dei dati. Il Dr. Matteo Gianesella per l'importante supporto nella valutazione statistica dei dati. Il Dr.Luca Aresu della Facoltà di Medicina di Padova per le valutazioni di istopatologia. In particolare, il Prof. Massimo Morgante, che ha reso possibile questo studio.

BIBLIOGRAFIA.

ABBATE M, ZOJA C, REMUZZI G.(2006) How does proteinuria cause progressive renal damage? J Am Soc Nephrol. 2006 Nov;17(11):2974-84.

BLENDINGER, C., BLENDINGER, K. & BOSTEDT, H. (1995) Urinary incontinence in spayed bitches. Pathogenesis, incidence and disposition. Tierarzlitche Praxis 23, 291-299.

BLOWEY, D. L., QUERFELD, U., GEARY, D., WARADY, B. A. & ALON, U. (1996) Ultrasound findings in juvenile nephron phthisis. Paediatric Nephrology 10, 22-24.

BOVEE K.C.(1984) Genetic and Metabolic Diseases of the Kidney. In: Canine Nephrology. Ed. K.C.Bovée, Harwal Publishing Company, USA, p.351.

BROWN S.A., FINCO D.R., CROWELL W.A., CHOAT D.C., NAVAR L.G. (1990). Single-nephron adaptations to partial renal ablation in the dog. Am J Physiol. Mar; 258: p 495-503.

CHANDREL, M.L., ELWOOD C., MURPHY K.F., GAJANAYAKE, I., & SYME H. M. (2007) Juvenile Nephropathy in 37 boxer dogs. Journal of Small Animal Practice 48, 690-694.

CHEW, D. J., DIBARTOLA, S. P., BOYCE, J. T., HAYES, H. M. & BRACE, J. J. (1983) Juvenile renal disease in Doberman Pinscher dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association 128, 481-485.

DIBARTOLA, S. P., CHEW, D. J. & BOYCE, J. T. (1983) Juvenile renal disease in related standard poodles. Journal of the American Veterinary Medical Association 183, 693-696.

ELLIOTT J., WATSON A.D.J. (2009). Chronic Kidney Disease: Staging and Management. In Kirk's Current Veterinary Therapy, XIV ed. Eds. Bonagura J. D., Twedt D.C. Saunders Elsevier St. Louis, MO. USA. p.883-892.

FINCO, D. R. (1995) Congenital, inherited, and familial renal disease. In: Canine and Feline Nephrology and Urology. Eds C. A. Osborne and R. Finco. Williams and Wilkins, Media, PA. USA. pp 471-483.

FRY M. M.: Urinalysis. In Nephrology and Urology of Small Animals. Eds. Bartges J. and Polzin D.J. (2011). Wiley-Blackwell, Oxford . p 46-57.

GAREL, L. A. HABIB, R., PARIENTE, D., BROYER, M. & SAUVENGRAIN, J. (1984) Juvenile nephrosis: sonographic appearance in children with severe uremia. Radiology 151, 93-95.

GRAUER G., (2004). Comparison of conventional urine protein test strips and a quantitative ELISA for the detection of canine and feline albuminuria. J Vet Intern Med 18 (Abstract): 418.

GRAUER G.(2009). Proteinuria: Implication for Management. In Kirk's Current Veterinary Therapy, XIV ed. Eds. Bonagura J. D., Twedt D.C. Saunders Elsevier St. Louis, MO. USA. p.860.

GREEN R. W. (1996) Kidneys. In: Small Animal Ultrasound. Ed R. W. Green. Lippincott-Raven Publishers. Philadelphia, PA. pp 197-226.

GRETZ, N., SCHARER, K., RUDIGER, W. & STRAUCH, M. (1989) Rate of deterioration of renal function in juvenile nephronophthisis. Paediatric Nephrology 3, 56-60.

HILDBRANDT, F. & OMRAM, H. (2001) New insights: nephronophthisis-medullary cyst kidney disease. Paediatric Nephrology 16, 168-176.

HILDBRANDT, F., WALDHERR, R., KUTT, R. & BRANDIS, M. (1992) The nephronophthisis complex: clinical and genetic aspects. The Clinical Investigator 70, 802-808.

HOLT, P. E. (1990) Urinary incontinence in dogs and cats. Veterinary Record 127, 347.

HOPPE, A. & KARLSTAM, E. (2000) Renal dysplasia in Boxers and Finnish Harrier. Journal of Small Animal Practice 41, 422-426.

INTERNATIONAL RENAL INTEREST SOCIETY (IRIS): www.iris-kidney.com

KOLBJØRNSEN, Ø., HEGGELUND, M., & JANSEN, H., (2008) End-Stage Kidney Disease due to *Reflux Nephropathy with Segmental Hypoplasia (Ask-Upmarl Kidney)* in young Boxer Dogs in Norway. A Retrospective Study. Veterinary Pathology 45: 467-474.

KOMATSUDA, A. &WAKUI, H. (2005) Nephronophthisis: diagnostic difficulties and recent advances in molecular genetic diagnostics. Clinical and Experimental Nephrology 9, 340-342.

KONRAD, M., SAUNIER, S., CALADO, J., GUBLER, M. C., BROYER, M. & ANTIGNAC, C. (1998) Familial juvenile nephronophthisis. Journal of Molecular Medicine 76, 310-316.

LEES, G. E. (1996) Congenital renal disease. In The Veterinary Clinics of North America - Renal Dysfunction. Vol 26. Ed D. J. Polzin. W. B. Saunders Co, Philadelphia, Penn. 26, 1379-1402.

LEES, G. E., BROWN, S. A., ELLIOTT, J., GRAUER, G. F. & VADEN, S. L. (2005) Assessment and management of proteinuria in dogs and cats: 2004 ACVIM Forum Consensus Statement (Small Animals) Journal of Veterinary Internal Medicine 19, 377-384.

LEES, G.E. (2010). Familial Renal Disease in Dogs. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the Dog and Cat. 7th ed. Eds S. J. Ettinger and E. D. Feldman. Elservier Saunders, St Louis, MO, USA pp. 2058-2062.

LEIBETSEDER, J. L. & NEUFELD, K. W. (1991) Effects of dietary protein and phosphorus levels in dogs with chronic renal failure. Proceedings of the Purina International Nutrient Symposium, January 1991, Orlando, Florida, USA, pp 35-38.

MAXIE, M. G. (1993) The urinary system. In: Pathology of Domestic Animals. Vol 2. 4th edn. Eds K. V. F. Jubb, P. C. Kennedy and N. Palmer. Academic Press, London, pp 457-468.

MORTON, L. D., SANECKI, R. K., GORDON, D. E., SOPIARZ, R. L., BELL, J. S. &SAKAS, S. (1990) Juvenile renal disease in miniature Schnauzer dogs. Veterinary Pathology 27, 455-458.

OSBORNE, C.A.,STEVENS J. B., LULICH J. P., ULRICH L. K., BIRD K. A., KOEHLER L.A., SWANSON L.L. (1995) A Clinician's Analysis of Urinalysis. In: Canine and Feline Nephrology and Urology. Eds C.A.Osborne and D.R. Finco. Williams and Wilkins, Media, PA, USA p. 141.

PEETERS, D. M., CLERCX, C., MICHIELS, L., DESMECHT, D., SNAPS, F., HENROTEAUZ, N.M. &DAY,M. (2000) Juvenile nephropathy in a Boxer, a Rottweiler, a Collie and an Irish Wolfhound. Australian Veterinary Journal 78, 162-165.

PICUT, C. A. & LEWIS, R. M. (1987a) Microscopic features of canine renal dysplasia. Veterinary Pathology 24, 156-163.

PICUT, C. A. & LEWIS, R. M. (1987b) Comparative pathology of canine hereditary nephropathies: an interpretive review. Veterinary Research Communications 11, 561-581.

POLZIN, D. J., OSBORNE, C. A. & ROSS, S. (2005) Chronic kidney disease. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the Dog and Cat. 6th ed. Eds S. J. Ettinger and E. D. Feldman. Elservier Saunders, St Louis, MO, USA pp 1756-1785.

REMILLARD, R: Obesity. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the Dog and Cat. 6th ed. Eds S. J. Ettinger and E. D. Feldman. Elservier Saunders, St Louis, MO, USA p 76.

RISDON, R. A., YOUNG, L. W. & CHRISPIN, A. R. (1975) Renal hypoplasia and dysplasia: a radiological and pathological correlation. Pediatric Radiology 3, 213-225.

SENIOR, D. (2005) Proteinuria. In: Proceedings of the 30th Congress of the World Small Animal Veterinary Association. Mexico City, Mexico, 11 – 14 May 2005.

STOCKHAM S.L. (2002). Urinary System. In: Fundamentals in Veterinary Clinical Pathology. Eds. S.L.Stockhalm, M.A.Scott. Blackwell Publishing Company, Iowa, USA. P.289.

TIZARD J. R. (2004) Immune Complexes and Type III Hypersensitivity. In: Veterinary Immunology, an introduction. 7th ed. Ed. J.R.Tizard. Saunders, Philadelphia, PN, USA. pag.332.

VADEN, S. (2004) Familial renal disease in dogs and cats: current classification and pathology. Proceedings of 14th ECVIM Congress. Barcelona, Spain, 9 – 11 September 2004.

VERLANDER J. W.(2007): Water balance. In: Textbook of Veterinary Physiology, Fourth Edition. Eds. Cunnigham J.G., Bradley G.K., Saunders Elsevier, St Louis, MO, USA. p. 548.

ZINI E, BONFANTI U, ZATELLI A.(2004). Diagnostic relevance of qualitative proteinuria evaluated by use of sodium dodecyl sulfate-agarose gel electrophoresis and comparison with renal histologic findings in dogs. Am J Vet Res. 2004 Jul;65(7):964-71..

WALDHERR, R., LENNERT, T.,WEBER, H. P., FODISCH, J. G. & SCHARER, K. (1998) The nephronophthisis complex, a clinic pathological study in children. Virchows Archiv. A, Pathological Anatomy and Histology 394, 235-254.

WHITELEY, M.H., BELL J.S., ROTHMAN D.A. (2011) Novel Allelic Variants in the Canine Cyclooxgenase-2 (Cox-2) Promoter Are Associated with Renal Dysplasia in Dogs. PLoS ONE | www.plosone.org 1 February 2011 | Volume 6 | Issue 2 | e16684.

Am J Pathol. 2001 Oct;159(4):1465-75.

YANG J, LIU Y. (2001). Dissection of key events in tubular epithelial to myofibroblast transition and its implications in renal interstitial fibrosis. Am J Pathol 159: 1465-1475.

Appendice 1: Classificazione IRIS della CKD: da Elliot (2009)

Stadio	1	2	3	4
Valore Creatinina: mg/dl **µmol/l**	< 1.4(cani)-<1.6(gatti) <125(cani)-<140(gatti)	1.4 -2.0(cani) 1.6-2.8(gatti) 125-180(cani) 140-250(gatti)	2.1-5.0(cani);2.9-5.0(gatti) 181-40(cani);251-440(gatti)	>5.0(cani/gatti) >440(cani/gatti)
Aspetti Clinici	Non-azotemici. Può essere presente: anomalie dell'aspetto renale, incapacità a concentrare correttamente l'urina, proteinuria, riscontri istologici non normali (biopsia)	Lieve azotemia renale. Sintomi clinici usualmente lievi o assenti	Azotemia renale Moderata. Possono essere presenti segni clinici (anche extra renali)	Grave azotemia renale. Normalmente associata ad innumerevoli sintomi extra-renali.

Sottostadiazione proteinuria

Proteinuria rapporto PU/CU	< 0.2 cani e gatti	0.2 – 0.4 cani 0.2 – 0.5 gatti	> 0.4 cani > 0.5 gatti
Interpretazione	Non proteinurico (**NP**)	Borderline proteinurico (**BP**)	Proteinurico (**P**)

Sottostadiazione pressione arteriosa

Sistolica(mm Hg)	< 150	150–159	160-179	≥ 180
Diastolica(mm Hg)	< 95	95–99	100-119	≥ 120
Rischio che l'elevata PA possa danneggiare ulteriormente il rene ed altri organi bersaglio (cuore, cervello, corioretina) **nc:** no complicazioni **c:** complicazioni **NM:** non misurata	Minima o Nessuna **N**	Lieve **L**	Moderata **M**	Elevata (High) **H**

Appendice 2

EMATOLOGIA

1. **Dependent Variable: WBC (K/µl)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	16,587	8,122	2,449
2,000	26	0	12,285	3,116	0,611
3,000	47	0	11,766	3,004	0,438

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	209,997	104,999	6,456	0,003
Residual	81	1317,426	16,265		
Total	83	1527,423			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,003).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,846
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
1,000 vs. 3,000	4,821	3,569	0,000606	0,017	Yes
1,000 vs. 2,000	4,303	2,966	0,00396	0,025	Yes
2,000 vs. 3,000	0,518	0,526	0,600	0,050	No

2. **Dependent Variable: RBC (M/ µl)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,714)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	7,208	0,421	0,127
2,000	26	0	7,513	0,645	0,126
3,000	47	0	7,405	0,711	0,104

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,727	0,363	0,832	0,439
Residual	81	35,403	0,437		
Total	83	36,130			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,439).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

3. **Dependent Variable: HGB (g/dL)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,261)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	17,291	0,787	0,237
2,000	26	0	17,781	1,752	0,344
3,000	47	0	17,255	2,174	0,317

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	4,841	2,421	0,653	0,523
Residual	81	300,286	3,707		
Total	83	305,127			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,523).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

4. **Dependent Variable: HCT (%)**

Normality Test: Passed (P = 0,446)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,386)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	45,082	4,214	1,271
2,000	26	0	44,950	3,446	0,676
3,000	47	0	44,672	4,735	0,691

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	2,213	1,106	0,0595	0,942
Residual	81	1505,775	18,590		
Total	83	1507,988			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,942).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

5. **Dependent Variable: MCV (fL)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,103)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	62,680	6,206	1,871
2,000	26	0	60,019	4,038	0,792
3,000	47	0	60,466	4,601	0,671

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	57,178	28,589	1,311	0,275
Residual	81	1766,270	21,806		
Total	83	1823,448			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,275).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,095
The power of the performed test (0,095) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

6. **Dependent Variable: MCH (pg)**

Normality Test: Passed (P = 0,060)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,434)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	24,051	1,283	0,387
2,000	26	0	23,685	1,450	0,284
3,000	47	0	23,355	2,311	0,337

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	5,012	2,506	0,645	0,527
Residual	81	314,663	3,885		
Total	83	319,675			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,527).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

7. **Dependent Variable: MCHC (g/dL)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,365)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	38,605	3,163	0,954
2,000	26	0	39,581	2,784	0,546
3,000	47	0	38,600	2,599	0,379

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	17,238	8,619	1,155	0,320
Residual	81	604,553	7,464		
Total	83	621,791			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,320).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,071
The power of the performed test (0,071) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

8. **Dependent Variable: RDW (%)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,592)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	1	15,860	1,687	0,533
2,000	26	0	17,119	1,842	0,361
3,000	47	0	18,081	2,619	0,382

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	46,511	23,255	4,368	0,016
Residual	80	425,937	5,324		
Total	82	472,448			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,016).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,616
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
3,000 vs. 1,000	2,221	2,764	0,00709	0,017	Yes
3,000 vs. 2,000	0,962	1,705	0,0921	0,025	No
2,000 vs. 1,000	1,259	1,467	0,146	0,050	No

9. **Dependent Variable: Piastrine (K/ µl)**

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,649)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	239,909	67,104	20,232
2,000	26	0	219,115	79,105	15,514
3,000	47	0	206,157	64,013	9,337

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	10926,150	5463,075	1,135	0,327

Residual	81	389963,778	4814,368
Total	83	400889,928	

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,327).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,068
The power of the performed test (0,068) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

10. Dependent Variable: Neutr (K/ µl)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	11,916	6,895	2,079
2,000	26	0	8,535	2,493	0,489
3,000	47	0	8,161	2,398	0,350

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	127,771	63,886	5,780	0,005
Residual	81	895,241	11,052		
Total	83	1023,012			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,005).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,788
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
1,000 vs. 3,000	3,756	3,373	0,00114	0,017	Yes
1,000 vs. 2,000	3,381	2,828	0,00590	0,025	Yes
2,000 vs. 3,000	0,374	0,460	0,646	0,050	No

11. Dependent Variable: Lym (K/ µl)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,319)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	2,505	1,028	0,310
2,000	26	0	2,384	1,106	0,217
3,000	47	0	2,240	0,817	0,119

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,781	0,391	0,440	0,645
Residual	81	71,852	0,887		
Total	83	72,634			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,645).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

12. Dependent Variable: Mono (K/ µl)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	0,984	0,629	0,190

2,000	26	0	0,595	0,339	0,0666
3,000	47	0	0,660	0,316	0,0460

Source of Variation	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	2	1,226	0,613	4,349	0,016
Residual	81	11,416	0,141		
Total	83	12,641			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,016).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,614
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**Unadjusted P**	**Critical Level**	**Significant?**
1,000 vs. 2,000	0,389	2,883	0,00504	0,017	Yes
1,000 vs. 3,000	0,325	2,582	0,0116	0,025	Yes
3,000 vs. 2,000	0,0647	0,705	0,483	0,050	No

13. Dependent Variable: Eos (K/ µl)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,461)

Group Name	**N**	**Missing**	**Mean**	**Std Dev**	**SEM**
1,000	11	0	0,640	0,436	0,131
2,000	26	0	0,532	0,532	0,104
3,000	47	0	0,492	0,372	0,0543

Source of Variation	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	2	0,197	0,0987	0,521	0,596
Residual	81	15,354	0,190		
Total	83	15,552			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,596).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

14. Dependent Variable: Baso (K/ µl)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,052)

Group Name	**N**	**Missing**	**Mean**	**Std Dev**	**SEM**
1,000	11	0	0,338	0,384	0,116
2,000	26	0	0,233	0,172	0,0336
3,000	47	0	0,210	0,208	0,0303

Source of Variation	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	2	0,147	0,0735	1,419	0,248
Residual	81	4,194	0,0518		
Total	83	4,341			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,248).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,112
The power of the performed test (0,112) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

15. Dependent Variable: # Neutro (%)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,972)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	70,427	7,440	2,243
2,000	26	0	69,638	8,393	1,646
3,000	47	0	69,077	7,747	1,130

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	17,939	8,970	0,143	0,867
Residual	81	5075,568	62,661		
Total	83	5093,507			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,867).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

16. Dependent Variable: # Lym (%)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,390)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	16,690	6,769	2,041
2,000	26	0	19,327	7,639	1,498
3,000	47	0	19,346	5,717	0,834

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	67,110	33,555	0,795	0,455
Residual	81	3420,292	42,226		
Total	83	3487,402			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,455).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

17. Dependent Variable: # Mono (%)

Normality Test: Passed (P = 0,220)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,647)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	5,681	2,035	0,614
2,000	26	0	4,938	2,731	0,536
3,000	47	0	5,591	2,656	0,387

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	8,148	4,074	0,597	0,553
Residual	81	552,422	6,820		
Total	83	560,570			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,553).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

18. Dependent Variable: # Eos (%)

Normality Test: Passed (P = 0,081)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,582)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	4,346	2,543	0,767
2,000	26	0	4,233	3,592	0,704
3,000	47	0	4,300	3,012	0,439

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,124	0,0619	0,00623	0,994
Residual	81	804,537	9,933		
Total	83	804,660			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,994).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049

The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

19. Dependent Variable: # Baso (%)

Normality Test: Failed (P < 0,050)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,979)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	1,675	1,266	0,382
2,000	26	0	1,766	1,364	0,267
3,000	47	0	1,689	1,383	0,202

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,115	0,0577	0,0310	0,969
Residual	81	150,525	1,858		
Total	83	150,640			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,969).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049

The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

EMATOCHIMICA

20. Dependent Variable: Prot tot g/dl

Normality Test: Passed (P = 0,074)

Equal Variance Test: Passed (P = 0,444)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	1	5,809	0,567	0,179
2,000	26	0	6,052	0,460	0,0902
3,000	47	0	5,943	0,603	0,0880

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,462	0,231	0,741	0,480
Residual	80	24,920	0,311		
Total	82	25,381			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,480).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049

The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.

Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

21. Dependent Variable: Creatinina mg/dl

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,843)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	0,888	0,155	0,0467
2,000	26	0	0,975	0,191	0,0374
3,000	47	0	0,941	0,177	0,0258

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,0601	0,0300	0,938	0,395
Residual	81	2,593	0,0320		
Total	83	2,654			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,395).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

22. Dependent Variable: Urea mg/dl

Normality Test: Passed (P = 0,157)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,079)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	28,709	5,029	1,516
2,000	26	0	32,192	6,165	1,209
3,000	47	0	32,043	8,745	1,276

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	110,027	55,014	0,944	0,393
Residual	81	4720,862	58,282		
Total	83	4830,890			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,393).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

ESAME URINE

23. Dependent Variable: Peso specifico

Normality Test: Passed (P = 0,201)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	1008,000	2,683	0,809
2,000	26	0	1020,462	3,603	0,707
3,000	47	0	1037,660	7,329	1,069

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	10245,795	5122,897	144,734	<0,001
Residual	81	2867,015	35,395		
Total	83	13112,810			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).
Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
3,000 vs. 1,000	29,660	14,884	6,827E-025	0,017	Yes
3,000 vs. 2,000	17,198	11,827	2,499E-019	0,025	Yes
2,000 vs. 1,000	12,462	5,823	0,000000112	0,050	Yes

24. Dependent Variable: pH

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,914)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	7,182	1,007	0,304
2,000	26	0	6,385	0,993	0,195
3,000	47	0	6,223	1,093	0,159

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	8,195	4,098	3,700	0,029
Residual	81	89,694	1,107		
Total	83	97,890			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,029).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,512
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
1,000 vs. 3,000	0,958	2,719	0,00800	0,017	Yes
1,000 vs. 2,000	0,797	2,106	0,0383	0,025	No
2,000 vs. 3,000	0,161	0,627	0,533	0,050	No

25. Dependent Variable: Glucosio

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 1,000)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	0,000	0,000	0,000
2,000	26	0	0,000	0,000	0,000
3,000	47	0	0,000	0,000	0,000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,000	0,000	1,000	1,000
Residual	81	0,000	0,000		
Total	83	0,000			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 1,000).
Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

26. Dependent Variable: Corpi Chetonici

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	0,000	0,000	0,000
2,000	26	0	0,000	0,000	0,000
3,000	47	0	0,362	0,486	0,0708

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	2,708	1,354	10,109	<0,001
Residual	81	10,851	0,134		
Total	83	13,560			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,980
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	**Diff of Means**	**t**	**Unadjusted P**	**Critical Level**	**Significant?**
3,000 vs. 2,000	0,362	4,043	0,000119	0,017	Yes
3,000 vs. 1,000	0,362	2,950	0,00415	0,025	Yes
1,000 vs. 2,000	0,000	0,000	1,000	0,050	No

27. Dependent Variable: Urobilinogeno

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 1,000)

Group Name	**N**	**Missing**	**Mean**	**Std Dev**	**SEM**
1,000	11	0	0,000	0,000	0,000
2,000	26	0	0,000	0,000	0,000
3,000	47	0	0,000	0,000	0,000

Source of Variation	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	2	0,000	0,000	1,000	1,000
Residual	81	0,000	0,000		
Total	83	0,000			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 1,000).
Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

28. Dependent Variable: Birilubina

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	**N**	**Missing**	**Mean**	**Std Dev**	**SEM**
1,000	11	0	0,273	0,647	0,195
2,000	26	0	0,0385	0,196	0,0385
3,000	47	0	0,277	0,540	0,0787

Source of Variation	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	2	1,012	0,506	2,210	0,116
Residual	81	18,548	0,229		
Total	83	19,560			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,116).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,247
The power of the performed test (0,247) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

29. Dependent Variable: Eritrociti/Emoglobina

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	**N**	**Missing**	**Mean**	**Std Dev**	**SEM**
1,000	11	0	0,636	1,286	0,388
2,000	26	0	0,115	0,431	0,0846
3,000	47	0	0,170	0,670	0,0977

Source of Variation	**DF**	**SS**	**MS**	**F**	**P**
Between Groups	2	2,305	1,153	2,232	0,114
Residual	81	41,838	0,517		
Total	83	44,143			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,114).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,251
The power of the performed test (0,251) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

30. Dependent Variable: Nitriti

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 1,000)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	4	0,000	0,000	0,000
2,000	26	8	0,000	0,000	0,000
3,000	47	7	0,000	0,000	0,000

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,000	0,000	1,000	1,000
Residual	62	0,000	0,000		
Total	64	0,000			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 1,000).
Power of performed test with alpha = 0,050: 1,000

31. Dependent Variable: Proteine (dipstick)

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,303)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	0	0,545	0,522	0,157
2,000	26	0	1,000	0,894	0,175
3,000	47	0	1,000	0,834	0,122

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	1,975	0,988	1,462	0,238
Residual	81	54,727	0,676		
Total	83	56,702			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,238).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,118
The power of the performed test (0,118) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

32. Dependent Variable: Proteine U mg/dl

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,755)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	1	15,410	12,235	3,869
2,000	26	0	21,062	15,623	3,064
3,000	47	0	17,823	17,999	2,625

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	287,412	143,706	0,514	0,600
Residual	80	22350,675	279,383		
Total	82	22638,087			

The differences in the mean values among the treatment groups are not great enough to exclude the possibility that the difference is due to random sampling variability; there is not a statistically significant difference (P = 0,600).

Power of performed test with alpha = 0,050: 0,049
The power of the performed test (0,049) is below the desired power of 0,800.
Less than desired power indicates you are less likely to detect a difference when one actually exists. Negative results should be interpreted cautiously.

33. Dependent Variable: Creatinina U mg/dl

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Passed (P = 0,079)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	1	193,168	148,734	47,034
2,000	26	0	146,865	51,571	10,114
3,000	47	0	371,729	377,366	55,044

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	931711,074	465855,537	5,468	0,006
Residual	80	6816213,503	85202,669		
Total	82	7747924,577			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = 0,006).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,756
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
3,000 vs. 2,000	224,864	3,152	0,00228	0,017	Yes
3,000 vs. 1,000	178,561	1,757	0,0828	0,025	No
1,000 vs. 2,000	46,303	0,426	0,671	0,050	No

34. Dependent Variable: PU/CU

Normality Test: Failed (P < 0,050)
Equal Variance Test: Failed (P < 0,050)

Group Name	N	Missing	Mean	Std Dev	SEM
1,000	11	1	0,121	0,149	0,0473
2,000	26	0	0,148	0,114	0,0223
3,000	47	0	0,0616	0,0614	0,00895

Source of Variation	DF	SS	MS	F	P
Between Groups	2	0,134	0,0668	7,656	<0,001
Residual	80	0,698	0,00872		
Total	82	0,831			

The differences in the mean values among the treatment groups are greater than would be expected by chance; there is a statistically significant difference (P = <0,001).
Power of performed test with alpha = 0,050: 0,917
All Pairwise Multiple Comparison Procedures (Holm-Sidak method):
Overall significance level = 0,05
Comparisons for factor: **CLASSE P.S.**

Comparison	Diff of Means	t	Unadjusted P	Critical Level	Significant?
2,000 vs. 3,000	0,0869	3,807	0,000274	0,017	Yes
1,000 vs. 3,000	0,0594	1,827	0,0714	0,025	No
2,000 vs. 1,000	0,0275	0,790	0,432	0,050	No