

# VALUTAZIONE DELLA VELOCITÀ DI FILTRAZIONE GLOMERULARE MEDIANTE CLEARANCE PLASMATICA DELLO IOEXOLO NEL CANE: CONFRONTO TRA METODI SEMPLIFICATI

## GLOMERULAR FILTRATION RATE EVALUATION IN THE DOG THROUGHOUT THE PLASMATIC CLEARANCE OF IOHEXOL: SIMPLIFIED METHODS

ILARIA LIPPI, VALENTINA MEUCCI, GRAZIA GUIDI, GIULIO SOLDANI

*Dipartimento di Clinica Veterinaria - Università di Pisa*

### Riassunto

La GFR (glomerular filtration rate - GFR) è un metodo per determinare la velocità di formazione del filtrato glomerulare attraverso i glomeruli renali e, diversamente dai parametri comunemente utilizzati nella pratica clinica (creatinina e urea plasmatica, peso specifico urinario), permette una diagnosi precoce di insufficienza renale. Lo ioexolo, mezzo di contrasto non ionico a bassa osmolarità, può essere utilizzato come marker di valutazione della GFR poiché presenta eliminazione esclusivamente renale sia nell'uomo che negli animali. Obiettivo del lavoro è stato di valutare metodi semplificati di determinazione della GFR nel cane attraverso clearance plasmatica dello ioexolo e l'attendibilità di formule di predizione della GFR derivate dalle equazioni di Cockcroft-Gault (formule derivate dalla concentrazione di creatinina).

Nei 35 cani dello studio la concentrazione plasmatica dello ioexolo è stata determinata in modo diretto mediante metodo HPLC ed è stata condotta un'analisi di regressione lineare tra il metodo di riferimento a 11 prelievi (GFR reale) (5', 15', 30', 45', 60', 90', 180', 240', 300', 420' e 24 ore) e i quattro modelli semplificati a 5 prelievi.

Tutte le combinazioni hanno evidenziato buoni valori di correlazione ma il Modello A (5', 15', 60', 90' e 180') è risultato il migliore. L'analisi di regressione lineare condotta tra la GFR reale e i valori di GFR ottenuti con formule predittive ha evidenziato assenza di correlazione significativa. La determinazione diretta della GFR rimane attualmente l'unico parametro di valutazione accurata della funzionalità renale. La GFR ottenuta mediante clearance plasmatica dello ioexolo a 5 prelievi presenta un accettabile margine di errore e può essere introdotta nella pratica clinica ambulatoriale per la diagnosi precoce di danno renale.

### Summary

*GFR (glomerular filtration rate - GFR) shows the rate of glomerular filtration through renal glomeruli and, despite of the most used parameters for the evaluation of renal dysfunction (plasmatic creatinine, urea and urinary specific gravity), allows an early diagnosis of renal failure. Iohexol, a non-ionic low osmolarity contrast medium, has renal clearance only and can be used as a reliable GFR marker in humans and animals. The purpose of the present study was to establish simplified methods of GFR determination in dogs through the plasmatic clearance of iohexol and to evaluate the accuracy of Cockcroft-Gault equations GFR prediction.*

*In the 35 dogs of our study the plasmatic concentration of iohexol was directly evaluated by using an HPLC method. A linear regression analysis among the reference 11-point method (5', 15', 30', 45', 60', 90', 180', 240', 300', 420' e 24 hours) and the four simplified five-sample models was performed.*

*The best time for sampling in the 5-sample method was 5, 15, 60, 90 and 180 minutes. The linear regression analysis among the reference 11-point method and the equations for the prediction of GFR in the dog showed no significant correlation. GFR determination can be considered the only reliable method to assess renal function in dogs. Plasma clearance of iohexol can be estimated in dogs from 5 blood samples with a reasonable margin of error and used as a good routine method of GFR evaluation in early diagnosis of nephropaties.*

## INTRODUZIONE

La GFR (glomerular filtration rate - GFR) è un metodo per determinare la velocità con cui si forma il filtrato glomerulare per passaggio dal plasma attraverso i glomeruli renali e permette una valutazione quantitativa della funzionalità renale sia nell'animale sano che in quello malato. La sintomatologia dell'insufficienza renale è estremamente tardiva e compare soltanto quando l'animale ha perso più del 70% dei nefroni<sup>1</sup>. Infatti, grazie alla capacità di compenso renale i parametri comunemente analizzati come creatinina e urea plasmatica e peso specifico urinario, non appaiono alterati finché una buona parte della funzionalità renale non è ormai perduta (circa il 67%)<sup>2</sup> e rappresentano indicatori scarsamente sensibili della GFR<sup>3</sup>. D'altra parte essere in grado di stabilire una diagnosi precoce di disfunzione renale è importante sia per il paziente che per il proprietario, in quanto può aiutare a formulare una prognosi a lunga scadenza e a fornire tempestivamente una terapia medica di sostegno per la funzionalità renale. È infatti la diagnosi precoce degli stadi subclinici o borderline di insufficienza renale a costituire la sfida maggiore nella clinica veterinaria delle nefropatie. Da ciò scaturisce l'utilità della determinazione della GFR nella pratica clinica che non si limita alla diagnosi precoce, ma si estende al monitoraggio della progressione del danno renale, alla determinazione della funzione renale controlaterale prima di una nefrotomia o nefrectomia, alla valutazione della risposta ad una terapia in corso di patologia renale, alla modificazione della dose o della frequenza di somministrazione di farmaci eliminati per via renale<sup>4</sup>, alla preventiva valutazione della funzionalità renale in caso di necessità di terapia nefrolesiva. Nel cane la GFR può essere valutata mediante:

- Metodi che sfruttano la clearance urinaria (inulina, creatinina endogena, creatinina esogena)
- Metodi che sfruttano la clearance plasmatica (inulina, creatinina esogena, ioexolo, <sup>99m</sup>Tc-DTPA)
- Metodo scintigrafico renale (<sup>99m</sup>Tc-DTPA)<sup>4</sup>.

Le metodiche di valutazione della GFR che utilizzano lo studio della clearance urinaria (a) risultano poco praticabili nella routine diagnostica veterinaria in quanto necessitano di un'accurata raccolta delle urine prodotte. Ciò comporta l'utilizzo di gabbie metaboliche e una durata dell'esame che può arrivare alle 24 ore, con una conseguente ridotta compliance dell'animale e scarsa praticità per il proprietario. Nelle metodiche che prevedono l'utilizzo di cateteri urinari non è da sottovalutare, inoltre, il rischio di sviluppo di infezioni delle vie urinarie<sup>2</sup>. Gli studi di clearance plasmatici (b) presentano lo svantaggio di richiedere un numero elevato di prelievi ematici e la possibilità di errore nel calcolo dell'area sotto la curva concentrazione/tempo (AUC)<sup>4</sup>. La determinazione della GFR mediante l'utilizzo di composti radioattivi (c), come il <sup>99m</sup>Tc-DTPA, richiede strumentazioni complesse, particolari autorizzazioni e 24 ore di isolamento per il paziente. Il metodo scintigrafico offre il grande vantaggio di poter valutare, oltre alla GFR, la funzionalità renale, non solo complessiva ma anche individuale, e di non necessitare di campioni ematici o urinari. Il test utilizza, però, un composto radioattivo che richiede una particolare strumentazione ed un isolamento del paziente nelle 24 ore che seguono l'iniezione dell'analita<sup>4</sup>. Data la complessità di queste metodiche per la determinazio-

ne della GFR si è reso necessario mettere a punto, nel cane, un metodo che permettesse di ottenere un valore sufficientemente accurato di filtrazione glomerulare e contemporaneamente risultasse un test facilmente applicabile nella clinica ambulatoriale. Lo scopo di questo lavoro, infatti, è stato di valutare l'attendibilità di metodi semplificati di determinazione della GFR attraverso la clearance plasmatica dello ioexolo e di formule di predizione della GFR derivate dalle equazioni di Cockcroft-Gault (formule derivate dalla concentrazione di creatinina).

## MATERIALI E METODI

Hanno fatto parte dello studio trentacinque cani di proprietà, appartenenti a diverse razze, di peso compreso tra 10,0 e 37,0 kg (media  $25,3 \pm 7,1$  kg), presentati al Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa per problematiche sanitarie diverse inerenti la necessità di una valutazione della funzionalità renale. Per ciascun paziente è stata compilata una cartella clinica ed eseguiti gli esami normalmente utilizzati per accertare la funzionalità renale. Si è proceduto quindi alla valutazione della GFR mediante iniezione di ioexolo. Le soluzioni iniettabili di ioexolo (Omnipaque® 300 mgI/ml) e iopentolo (Imagopaque® 300 mgI/ml) sono state gentilmente offerte dalla ditta Nycomed Amersham Sorin (Milano, Italia). Una volta posizionata un'agocannula a livello della vena cefalica destra o sinistra è stato prelevato, mediante siringa da 2,5 ml, un campione di sangue (di volume non inferiore ad 1 ml) da utilizzare come tempo 0 (t<sub>0</sub>), dopodiché si è iniettato lentamente lo ioexolo nell'arco di 60" alla dose di 64,7 mg/kg. Considerato il momento dell'iniezione come tempo 0, sono stati effettuati prelievi di sangue (1 ml) dalla vena cefalica controlaterale o, in caso di cani di piccola taglia o quando fosse difficile reperirla, dalla vena giugulare. I campionamenti sono stati eseguiti a 5', 15', 30', 45', 60', 90', 180', 240', 300', 420' e 24 ore ed il sangue raccolto in provette contenenti eparina. Il plasma è stato ottenuto mediante centrifugazione a 3000 rpm per 10 minuti e congelato a -20 °C fino al momento dell'analisi con metodica HPLC (Figura 1)<sup>5</sup>.

I risultati ottenuti sono stati elaborati al computer mediante il programma Easy Fit® per Macintosh (Istituto Mario Negri, Milano, Italia). Per ciascun soggetto sono

- Campione di plasma (50 µl) + Iopentolo in soluzione acquosa 50 µg/ml (50 µl)
- Agitare in vortex (60")
- Aggiungere CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 µl) + Acqua distillata (150 µl)
- Agitare in vortex (60")
- Centrifugare a 3000 rpm (10')
- Prelevare il soprannatante e centrifugare a 3000 rpm (10')
- Iniettare il campione in HPLC

FIGURA 1 - Schema del processo di estrazione dei campioni plasmatici prima della loro iniezione in HPLC.

state analizzate le curve della concentrazione plasmatica dello ioexolo in funzione del tempo e calcolati i parametri relativi ad un modello cinetico bicompartimentale aperto. L'analisi farmacocinetica è stata ripetuta dopo aver applicato modelli a numero ridotto di campionamenti: modello A (5', 15', 60', 90' e 180'), modello B (5', 45', 60', 240' e 300'), modello C (15', 45', 90', 240' e 420') e modello D (5', 30', 60', 180' e 300'). Per ogni soggetto è stata valutata la correlazione esistente tra il valore della GFR ottenuto mediante 11 campionamenti (GFR reale) e la GFR relativa ai modelli ridotti (Test di Pearson,  $p < 0,05$ ).

Per ciascun paziente, inoltre, è stata valutata la correlazione esistente tra il valore della GFR ottenuto mediante clearance plasmatica dello ioexolo ad 11 campionamenti (GFR reale) e la GFR stimata dalle seguenti equazioni predittive<sup>6</sup>, per l'applicazione delle quali è stato necessario convertire i valori di creatinina plasmatica dei soggetti da mg/dl a mmol/l secondo la relazione Creatinina (mmol/l) = Creatinina (mg/dl) x 10 x 8,84.

Equazione 1:  $GFR = 227 \times (1/\text{Creatinina plasmatica})$   
 Equazione 2:  $GFR = 246 \times (1/\text{Creatinina plasmatica}) - 0,1$

È stato infine effettuato uno studio di correlazione tra i valori di GFR reale e i valori di GFR stimati dal reciproco della creatinina.

## RISULTATI

La GFR è stata calcolata come rapporto tra la clearance plasmatica dello ioexolo ( $\text{ml min}^{-1}$ ) e la superficie corporea espressa in  $\text{m}^2$  (Figura 2).

In questo studio è stato adottato il modello cinetico bicompartimentale aperto in quanto fornisce una buona stima della GFR in un ampio range di funzionalità renale con un coefficiente di correlazione  $R^2 > 0,99$ . Il valore della GFR si è mostrato all'interno del range di riferimento per lo ioexolo ( $75,0 \pm 15,0 \text{ ml/min-m}^2$ ) in 20 dei soggetti esaminati (GFR media =  $89,5 \pm 7,7 \text{ ml/min-m}^2$ ) e al di sotto dello stesso nei restanti 15 cani (GFR media =  $43,6 \pm 3,0 \text{ ml/min-m}^2$ ). È stato osservato che la concentrazione plasmatica dello ioexolo in un cane non nefropatico, a tre ore dall'iniezione, scende al di sotto della soglia di determinazione (Figura 3). In un soggetto nefropatico, invece, si forma una fase di plateau e lo ioexolo è identificabile nel plasma fino a 24 ore dall'iniezione (Figura 4).

Sono state sperimentate combinazioni di prelievi a numero ridotto di campionamenti ematici. Quattro modelli a cinque prelievi (A, B, C, D) per la determinazione della GFR hanno fornito i risultati migliori in termini di correlazione con la GFR reale e compliance del paziente e del proprietario. Tutti i modelli (A, B, C e D) a numero ridotto di campionamenti hanno evidenziato una correlazione lineare positiva con i valori della GFR reale (Figure 5, 6, 7 e 8). Al contrario, la GFR stimata dalle equazioni predittive (1 e 2) non ha presentato correlazione significativa con la GFR reale (Figure 9 e 10) come anche con il reciproco della creatinina (Figura 11). I risultati degli studi di correlazione effettuati sono riportati nella Tabella 1.

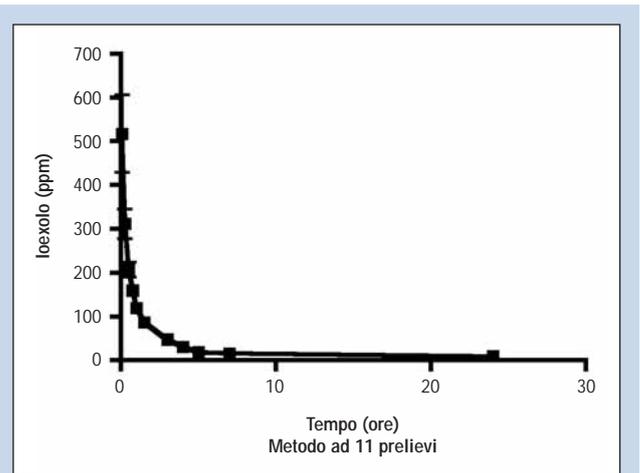


FIGURA 2 - Grafico dell'andamento della concentrazione plasmatica media dello ioexolo, espressa in ppm, ai diversi tempi dei prelievi nei 35 cani dello studio.

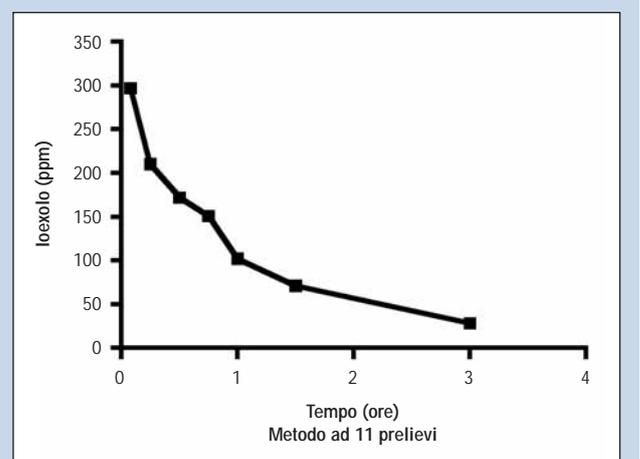


FIGURA 3 - Grafico dell'andamento della concentrazione plasmatica dello ioexolo (espressa in ppm) in un cane non nefropatico. È possibile osservare che la concentrazione dello ioexolo nel plasma, dopo tre ore dalla sua iniezione, scende al di sotto della soglia di determinazione.

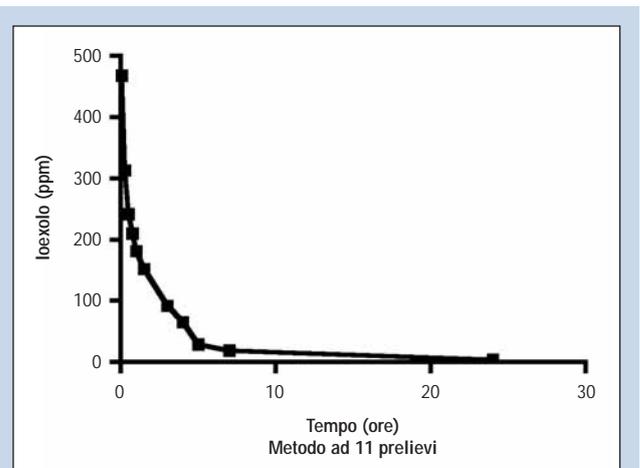


FIGURA 4 - Grafico dell'andamento della concentrazione plasmatica dello ioexolo (espressa in ppm) in un cane nefropatico. È possibile osservare che la velocità di eliminazione dello ioexolo si riduce dopo tre ore dall'iniezione e la pendenza della curva di decadimento plasmatico dell'analisi diminuisce portando alla formazione di un plateau di escrezione. Lo ioexolo in un soggetto nefropatico è ancora presente nel plasma in quantità identificabile a 24 ore dall'iniezione.

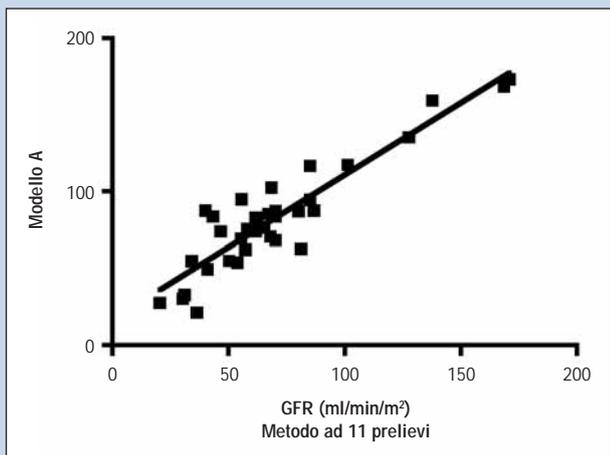


FIGURA 5 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR ottenuti mediante il modello semplificato A. La GFR è espressa in ml/min/m<sup>2</sup>. Il grafico evidenzia una correlazione lineare positiva tra il modello A e la GFR reale, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9173 e R<sup>2</sup> di 0,8415.

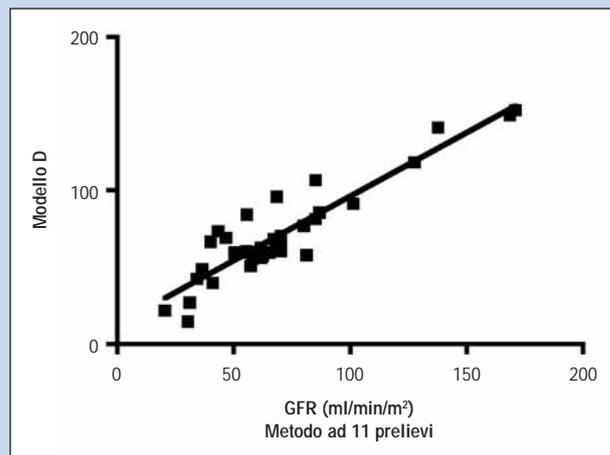


FIGURA 8 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR ottenuti mediante il modello semplificato D. La GFR è espressa in ml/min/m<sup>2</sup>. Il grafico evidenzia una correlazione lineare positiva tra il modello D e la GFR reale, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9201 e R<sup>2</sup> di 0,8465.

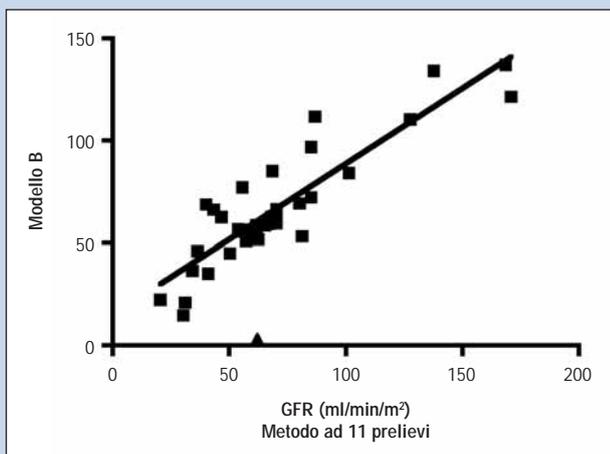


FIGURA 6 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR ottenuti mediante il modello semplificato B. La GFR è espressa in ml/min/m<sup>2</sup>. Il grafico evidenzia una correlazione lineare positiva tra il modello B e la GFR reale, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,8911 e R<sup>2</sup> di 0,7940.

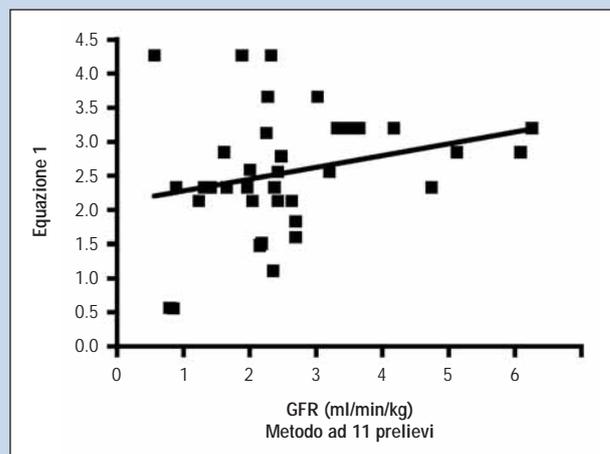


FIGURA 9 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR ottenuti mediante Equazione 1. La GFR è espressa in ml/min/kg. Il grafico evidenzia assenza di correlazione lineare positiva tra la GFR reale e la GFR stimata dall'Equazione 1, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,2593 e R<sup>2</sup> di 0,0672.

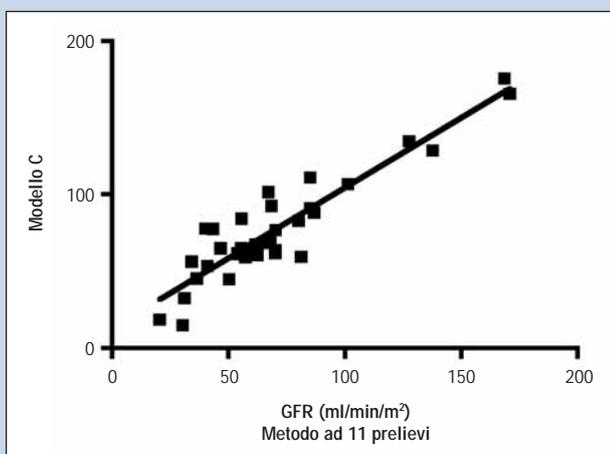


FIGURA 7 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR ottenuti mediante il modello semplificato C. La GFR è espressa in ml/min/m<sup>2</sup>. Il grafico evidenzia una correlazione lineare positiva tra il modello C e la GFR reale, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,9208 e R<sup>2</sup> di 0,8480.

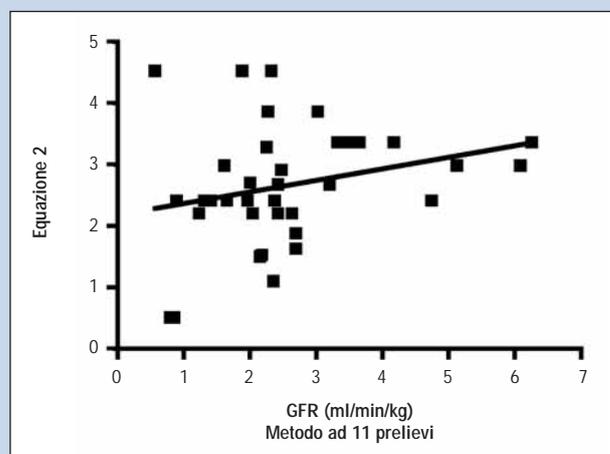


FIGURA 10 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR ottenuti mediante Equazione 2. La GFR è espressa in ml/min/kg. Il grafico evidenzia assenza di correlazione lineare positiva tra la GFR reale e la GFR stimata dall'Equazione 2, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,2598 e R<sup>2</sup> di 0,0675.

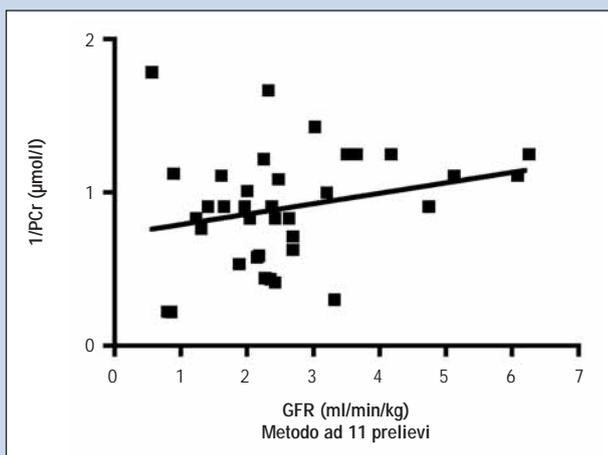


FIGURA 11 - Grafico dello studio di correlazione, effettuato nei 35 cani, tra i valori di GFR reale dei singoli soggetti e i valori di GFR predetti mediante il reciproco della creatinina plasmatica (1/PCr) espressa in  $\mu\text{mol/l}$ . La GFR è indicata in  $\text{ml/min/kg}$ . Il grafico evidenzia assenza di correlazione lineare positiva tra la GFR reale e la GFR stimata da 1/PCr, caratterizzata da un coefficiente di Pearson di 0,2466 e  $R^2$  di 0,0608.

## CONCLUSIONI

La GFR è ritenuta uno dei più precoci e sensibili indicatori di disfunzione renale<sup>7</sup> e, poiché direttamente correlata alla massa renale funzionante<sup>8</sup>, viene considerata il “gold standard test” per la valutazione quantitativa della funzionalità renale. Nonostante ciò, la GFR viene solo raramente utilizzata come strumento di diagnosi precoce a causa delle difficoltà tecniche e di esecuzione. Lo studio di clearance plasmatica dello ioexolo in singolo bolo viene effettuato tramite sistema HPLC e risulta più facilmente eseguibile e meglio tollerato dall'animale rispetto all'infusione continua<sup>9</sup>. Questa metodica, tuttavia, necessita di ben 11 prelievi ematici, di cui l'ultimo a 24 ore dall'iniezione dello ioexolo. È stato possibile osservare che riducendo il numero dei prelievi tra undici e sei si ottengono buoni valori di correlazione ma con un numero troppo alto di campioni che ha effetti negativi sulla compliance del paziente. Un numero di prelievi inferiore a quattro non consente l'analisi con il software utilizzato. I risultati migliori sono stati ottenuti con quattro protocolli a cinque prelievi. Sebbene tutti i modelli abbiano presentato una correlazione lineare positiva con la GFR reale, il modello A, in cui sono stati mantenuti i prelievi a 5' - 15' - 60' - 90' - 180' è risultato il migliore se consideriamo congiuntamente il grado di cor-

relazione che esso mostra con il valore della GFR reale e il vantaggio in termini di tempo per il cane e il proprietario. Questo nuovo protocollo permette infatti di eseguire un esame di clearance plasmatica dello ioexolo in sole tre ore dimezzando il numero dei prelievi. Il valore della GFR ottenuto con questo metodo viene espresso in  $\text{ml/min/m}^2$  in modo da ottenere, data la grande variabilità di taglia dei pazienti, una valutazione più accurata. Infatti, per cani di piccola taglia, avendo essi una maggiore superficie corporea, si può andar incontro ad una sovrastima della GFR quando la si esprime in  $\text{ml/min/kg}$ <sup>10,11</sup>. I cani sottoposti a valutazione della GFR sono stati anche oggetto dell'applicazione di formule predittive della velocità di filtrazione glomerulare<sup>6</sup>. Nel cane, pur non essendo raccomandabile derivare la GFR a partire dalla creatinina plasmatica a causa della scarsa precisione di tale analita<sup>11</sup>, sono state messe a punto due formule che, applicate ai soggetti del presente studio, non hanno evidenziato alcuna correlazione con la GFR reale.

In conclusione si può affermare che le formule predittive attualmente utilizzate nel cane per la stima della GFR non sono in grado di fornire al medico veterinario maggiori informazioni sullo stato e la progressione della patologia renale rispetto alla creatinina plasmatica. La determinazione della GFR rimane l'unico valido strumento di diagnosi precoce e di valutazione quantitativa del danno renale. La clearance plasmatica dello ioexolo, a numero ridotto di campionamenti, risulta un metodo accurato e facilmente applicabile per il calcolo della GFR. Lo ioexolo possiede le caratteristiche del marker ideale per l'identificazione della GFR e, al dosaggio utilizzato in questo studio, può essere usato in sicurezza anche in pazienti nefropatici. Considerato l'alto grado di correlazione che il modello A presenta con la GFR reale, e la possibilità di eseguire l'esame in sole tre ore, tale protocollo sembra possedere i requisiti per divenire un ausilio importante nella diagnostica ambulatoriale precoce delle malattie renali del cane.

## Parole chiave

GFR, ioexolo, diagnosi precoce, insufficienza renale, cane.

## Key words

GFR, ioexol, early diagnosis, renal failure, dog.

Tabella 1

Risultati dello studio di correlazione effettuato tra i modelli semplificati (A, B, C, D), le equazioni predittive (Equazione 1 e 2) e reciproco della creatinina con la GFR reale. NC: numero dei casi, Pearson: coefficiente di Pearson, P-value: P-value two-tailed, CS: correlazione significativa,  $R^2$ : coefficiente di correlazione

	Mod A	Mod B	Mod C	Mod D	Eq 1	Eq 2	1/PCr
NC	35	35	35	35	35	35	35
Pearson	0,9173	0,8911	0,9208	0,9201	0,2593	0,2598	0,2466
P-value	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,1267	0,1259	0,1470
CS	SI	SI	SI	SI	NO	NO	NO
$R^2$	0,8415	0,7940	0,8480	0,8465	0,0672	0,0675	0,0608

## Bibliografia

1. Gleadhill A: Evaluation of screening tests for renal insufficiency in the dog. J Small Anim Pract 35: 391-396, 1994.
2. Watson ADJ, Lefebvre HP, Concordet D, Laroute V, et al: Plasma exogenous creatinine clearance test in dogs: comparison with other methods and proposed limited sampling strategy. J Vet Intern Med 16: 22-33, 2002.
3. Finco DR: Valutazione della funzionalità renale. In: Nefrologia e Urologia del Cane e del Gatto. Ed. UTET. Italia, Torino, 1999, pp 219-232.
4. Kerl ME, Cook CR: Glomerular filtration rate and renal scintigraphy. Clin Tech Small Anim Pract 20: 31-38, 2005.
5. Meucci V, Gasperini A, Soldani G, Guidi G., et al: A new HPLC method to determine glomerular filtration rate and effective renal plasma flow in conscious dogs by single intravenous administration of iohexol and p-aminohippuric acid. J Chrom Sci 42: 107-111, 2004.
6. Finco DR, Brown SA, Vaden SL, Ferguson DC: Relationship between plasma creatinine and glomerular filtration rate in dogs. J Vet Pharmacol Ther 18: 318-421, 1995.
7. Heiene R, Moe L: Pharmacokinetic aspects of measurement of glomerular filtration rate in the dog: a review. J Vet Intern Med 12: 401-414, 1998.
8. Braun JP, Lefebvre HP: Early detection of renal disease in the canine patient. EJCAP 15: 59-65, 2005.
9. Frennby B, Sterner G: Contrast media as markers of GFR. Eur Radiol 12: 475-484, 2002.
10. Haller M, Muller W, Binder H, Estelberger W, et al: Single-injection inulin clearance. A simplified method for measuring glomerular filtration rate in dogs. Res Vet Sci 64: 151-156, 1998.
11. Di Bartola SP: Clinical Approach and Laboratory Evaluation of Renal Disease. In: Textbook of Veterinary Internal Medicine. Ed. WB Saunders. USA, Pennsylvania, Philadelphia, 2000, pp 1600-1614.



+ **interattivo**  
+ **multimediale**  
+ **informato**

**Scopri  
@nmvi Oggi  
sul tuo  
cellulare**

✓ **leggi**  
✓ **scarica**  
✓ **condividi**

**1.979 visitatori  
al giorno su  
[www.anmvioggi.it](http://www.anmvioggi.it)**