

VALUTAZIONE QUALITATIVA DELLA PROTEINURIA MEDIANTE SDS-AGE AI FINI DELLA LOCALIZZAZIONE DEL DANNO RENALE NEL CANE E NEL GATTO

ORNELLA ABATE, VALENTINA VITTONI, RENATO ZANATTA, ALBERTO TARDUCCI, MICHELE BORGARELLI, CLAUDIO BELLINO, AURELIO CAGNASSO

Dipartimento di Patologia Animale - Settore di Clinica Medica - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Torino

Riassunto

La proteinuria è il primo, e talvolta l'unico, dato di laboratorio indicante una nefropatia in soggetti asintomatici. In questo studio è stata valutata l'attendibilità della caratterizzazione della proteinuria, effettuata mediante l'elettroforesi per pesi molecolari su gel d'agarosio (SDS-AGE), nell'identificare la sede del danno renale, confrontando i risultati ottenuti con quelli delle indagini istologiche. Sono stati esaminati 20 animali con proteinuria (6 gatti e 14 cani) in cui erano rilevabili segni clinici o reperti di laboratorio compatibili con una nefropatia. In tutti i soggetti è stata effettuata una valutazione qualitativa della proteinuria mediante l'elettroforesi SDS-AGE e l'esame istologico del rene. I risultati ottenuti indicano che esiste una buona corrispondenza fra SDS-AGE e indagini istologiche nell'indicare la localizzazione delle lesioni renali. Tale tecnica elettroforetica può essere quindi considerata un metodo valido, non invasivo e utile nella diagnosi delle patologie renali nel cane e nel gatto.

Summary

Proteinuria is often the first and only laboratory data indicative of nephropathy not clinically manifested. In the present study, we evaluated renal damage by characterization of proteinuria using agarose gel electrophoresis (SDS-AGE) in order to localize the renal damage. These results were compared to those obtained by standard histological examination. A total of 20 animals with proteinuria were examined including 6 cats and 14 dogs with clinically evident nephropathy or laboratory findings compatible with nephropathy. All animals were evaluated for qualitative proteinuria by SDS-AGE and histological examination of the renal parenchyma. Our results indicated that there is good correlation between SDS-AGE and histological exam for localization of renal lesions. The former method may be considered as a valid, noninvasive, and useful option for diagnosing renal pathologies in both dogs and cats.

INTRODUZIONE

La diagnosi precoce di nefropatia, per quanto difficile da porre sulla base dei dati clinici e delle comuni indagini di laboratorio, è di fondamentale importanza nell'approccio terapeutico. Numerose patologie renali del cane e del gatto sono associate alla presenza di proteinuria, che può essere l'unico, o comunque il primo, dato rilevabile indicante una nefropatia in soggetti asintomatici¹. In condizio-

ni di normalità le proteine che passano il filtro glomerulare sono rappresentate da piccole frazioni di albumina (circa 69 kDa) e polipeptidi a basso peso molecolare (compreso tra 1,5 e 69 kDa), che vengono riassorbiti a livello del tubulo prossimale. Nel cane e nel gatto, come nell'uomo, vi è una piccola perdita giornaliera di proteine con le urine in assenza di patologie renali, ma tale proteinuria, considerata fisiologica, il più delle volte non è evidenziabile dai comuni metodi utilizzati (strisce reattive), che possiedono una sensibilità sufficiente ad individuare concentrazioni di proteine superiori a 25 mg/dl.

Per interpretare la presenza di proteinuria bisogna inizialmente correlarla al peso specifico dell'urina: una reazione debolmente positiva alle prove colorimetriche con

¹ "Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 1/7/2004 ed accettato per pubblicazione dopo revisione il 20/12/2004".

strisce reattive, se accompagnata da un'elevata densità delle urine, può essere considerata fisiologica; al contrario, se il campione di urina ha un peso specifico basso, anche un risultato debolmente positivo richiede un approfondimento diagnostico^{2, 3, 4, 5, 6, 7}.

La tecnica di riferimento per valutare l'effettiva perdita proteica urinaria è la determinazione del contenuto proteico urinario mediante la raccolta dell'urina prodotta nelle 24 ore. Questa operazione, che richiede l'utilizzo di una gabbia metabolica, è di difficile attuazione nella normale pratica ambulatoriale. In alternativa, per accertare la significatività della proteinuria, si può utilizzare il rapporto proteinuria creatinuria (U-P/C), che non richiede la raccolta dell'urina delle 24 ore e sfrutta la concentrazione di creatinina urinaria quale indice della velocità di filtrazione glomerulare⁸. Correlando, quindi, la proteinuria con la creatinuria si elimina la variabilità del volume urinario nelle 24 ore e si può valutare quante proteine sono perse con l'urina. Nel cane e nel gatto un rapporto U-P/C inferiore a 0,5 indica una normale perdita proteica, tra 0,5 e 1 è dubbio, mentre è anormale se superiore ad 1^{9, 10}.

Oltre alla quantificazione della proteinuria è fondamentale la sua valutazione qualitativa che si può effettuare mediante frazionamento elettroforetico. Già da alcuni anni in medicina umana sono utilizzate metodiche elettroforetiche che si basano sulla separazione per pesi molecolari su gel di poliacrilamide (SDS-PAGE) o di agarosio (SDS-AGE), poiché dotate di maggior sensibilità, soprattutto nell'individuazione delle microproteine di origine tubulare¹¹; inoltre consentono di localizzare la sede delle lesioni renali e di monitorare il decorso della patologia¹². In medicina veterinaria è stata evidenziata l'attendibilità della metodica SDS-PAGE nella caratterizzazione della proteinuria in relazione all'aspetto istologico del danno renale¹³ ed è stata ipotizzata la presenza di una correlazione fra la gravità delle lesioni, soprattutto a livello glomerulare, e il tipo di proteinuria¹⁴. Recenti studi hanno dimostrato la maggior praticità d'utilizzo della metodica SDS-AGE nei cani e nei gatti, la sua affidabilità e alta specificità nel cane sia nell'evidenziare le lesioni renali puramente glomerulari e tubulari, sia nel riconoscimento delle proteinurie glomerulari non selettive nei casi di glomerulonefriti secondarie a leishmaniosi, nonché la sua utilità nel monitoraggio dei cani nefropatici in terapia^{15, 16, 17, 18}. Con tale tecnica elettroforetica, applicata sull'urina di cane, è stato inoltre evidenziato che le proteine urinarie a bassissimo peso molecolare sono associate in maniera significativa alla gravità del danno tubulo-interstiziale¹⁹.

La presente ricerca ha il fine di valutare l'attendibilità della caratterizzazione della proteinuria mediante elettroforesi per pesi molecolari su gel di agarosio (SDS-AGE) nel cane e nel gatto, comparando la localizzazione del danno renale individuata mediante tale metodica (proteinuria glomerulare, tubulare o mista) con i risultati delle indagini istologiche.

MATERIALI E METODI

Presso l'Ospedale Didattico della Facoltà di Medicina Veterinaria di Grugliasco (TO), sono stati esaminati 20 animali con proteinuria, 6 gatti e 14 cani (Tab. 1), differen-

Tabella 1
Segnalamento degli animali

Caso n°	Segnalamento	Sesso	Età
1	Gatto europeo	M	6 aa
2	Gatto europeo	F	14 aa
3	Cane maremmano	M	8 aa
4	Cane boxer	M	2 aa
5	Cane rottweiler	M	5 aa
6	Gatto europeo	F	5 aa
7	Cane meticcio	M	1 aa
8	Cane breton	F	5 aa
9	Gatto europeo	F	8 aa
10	Cane pastore tedesco	M	7 aa
11	Cane Labrador	F	5 aa
12	Gatto europeo	M	7 aa
13	Cane bassotto	M	3 aa
14	Gatto europeo	M	7 aa
15	Cane boxer	F	6 aa
16	Cane alano	F	1 aa
17	Cane meticcio	M	16 m
18	Cane boxer	M	9 aa
19	Cane meticcio	M	8 aa
20	Cane pastore tedesco	M	7 aa

F: femmina; M: maschio.

ti per età, sesso e razza, in cui erano rilevabili segni clinici e/o reperti di laboratorio (alterazioni di urea ematica, creatininemia, densità urinaria e rapporto proteinuria creatinuria, non dovute a cause extra-renali) compatibili con una nefropatia.

Tali soggetti sono stati selezionati in relazione all'assenza di alterazioni della coagulazione (tempo di protrombina, tempo di tromboplastina parziale e fibrinogeno entro i range di riferimento) e quindi alla possibilità di sottoporli a biopsia renale.

Sia i cani, sia i gatti sono stati premedicati con un'iniezione intramuscolare di medetomidina e acepromazina; successivamente è stata effettuata la somministrazione di boli endovenosi di diazepam e propofolo ad effetto. Durante l'anestesia e fino al risveglio i soggetti sono stati mantenuti in infusione endovenosa con soluzione fisiologica ai dosaggi di mantenimento. La cistocentesi ecoassistita è stata eseguita con i soggetti in decubito dorsale. In seguito gli animali sono stati posti in decubito laterale destro e previa tricotomia e disinfezione chirurgica dell'ipocondrio sinistro è stata effettuata la biopsia secondo le modalità descritte in letteratura²⁰. Da ogni soggetto è stato prelevato un singolo campione di tessuto renale (lunghezza cm 2,2 e diametro 18 G) che, conservato in formalina tampognata al 10%, è stato fissato, sezionato e colorato (Ematosilina Eosina, PAS, Tricromica di Goldner, Metamina, Rosso Congo e PTAH) per la successiva valutazione in microscopia ottica; il campione biotico è stato considerato diagnostico quando comprendeva almeno 5 glomeruli per sezione istologica. Tutti gli esami istologici sono stati effettuati presso un unico laboratorio.

Le urine sono state analizzate a fresco (entro due ore dal prelievo) per la determinazione della densità (metodo

refrattometrico) e per la preliminare valutazione della proteinuria utilizzando strisce reattive (Multistix 10 SG-Bayer). Ciascun campione di urina è stato centrifugato (1500 giri per 5 minuti) e sul surnatante, analizzato entro due ore dalla raccolta o conservato a -20°C per un massimo di 10 giorni, sono state determinate quantitativamente con test colorimetrici la proteinuria (metodo Pirogallolo Red - Sentinel CH) e la creatinuria (metodo Jaffé - ABX Diagnostics), per il calcolo del rapporto proteinuria creatinuria.

SDS-AGE

I campioni di urina centrifugata sono stati sottoposti ad elettroforesi SDS-AGE con metodica semi-automatica (Kit Hidragel 5 Proteinurie – Sebia laboratories) previa conservazione alla temperatura di -20°C per un massimo di 30 giorni, dopo l'aggiunta di 20 µl di sodio azide 0,02% per 1 ml di urina.

L'analisi dei traccati è stata eseguita visivamente utilizzando, come confronto, un controllo (fatto migrare insieme ai campioni urinari in esame) a quattro pesi molecolari (PM) noti: rispettivamente 14,3 – 26,6 – 66 – 150 kDa (Molecular Mass Control – SEBIA) (Fig. 1). In base alle proteine presenti la proteinuria è stata classificata, in accordo con quanto descritto in letteratura²¹, in:

- Proteinuria tubulare: caratterizzata da proteine a PM inferiore a 69 kDa e da tracce di albumina;
- Proteinuria glomerulare selettiva: caratterizzata da albumina (frazione prevalente) e proteine a PM inferiore a 150 kDa;
- Proteinuria glomerulare non selettiva: caratterizzata da albumina e proteine a PM superiore o uguale a 150 kDa;
- Proteinuria mista: caratterizzata dalla presenza sia di proteine tubulari che glomerulari; differenziabile in "mista incompleta" con proteine a PM tra 23 e 69 kDa, albumina e proteine a PM superiore o uguale a 150 kDa e "mista completa" con proteine a PM tra 14 e 69 kDa, albumina e proteine a PM superiore o uguale a 150 kDa.

Analisi statistica

Sono state calcolate la sensibilità e la specificità della metodica nell'individuare correttamente la sede del danno renale, confrontando i risultati delle migrazioni elettroforetiche con quelli degli esami istologici.

La totalità dei soggetti è stata suddivisa, in un primo momento, in due gruppi: uno comprendente i casi che presentavano sul tracciato elettroforetico bande proteiche di origine glomerulare, l'altro quelli che presentavano bande di origine tubulare; in questa suddivisione i soggetti con proteinuria mista sono stati inclusi in entrambi i gruppi, per la presenza di bande proteiche sia di natura glomerulare sia tubulare. Successivamente la totalità dei soggetti è stata suddivisa in tre gruppi: casi che presentavano proteinuria tubulare, casi con proteinuria glomerulare e casi con proteinuria mista; questi ultimi, in questa seconda suddivisione, erano considerati come gruppo a sé stante.

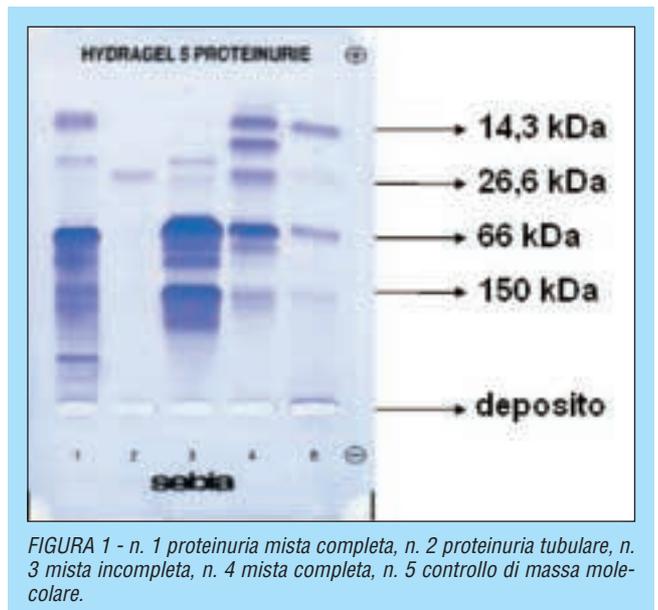


FIGURA 1 - n. 1 proteinuria mista completa, n. 2 proteinuria tubulare, n. 3 mista incompleta, n. 4 mista completa, n. 5 controllo di massa molecolare.

RISULTATI

I dati relativi alle indagini di laboratorio effettuate, al tipo di proteinuria riscontrato e alla diagnosi istopatologica sono riportati nella tabella 2.

I valori delle proteine urinarie nel cane sono compresi tra 36 e 616 mg/dl (media 255), nel gatto tra 16 e 496 mg/dl (media 121).

I valori U-P/C nei 20 animali considerati sono compresi tra 0,2 e 24,5 e risultano inferiori nel gatto, con estremi tra 0,2 e 4,4 (media 1,6), rispetto al cane con estremi tra 0,6 e 24,5 (media 5,8).

La valutazione qualitativa della proteinuria mediante SDS-AGE ha permesso l'identificazione di quattro pattern elettroforetici: 13 casi di proteinuria mista (di cui 8 con proteinuria mista incompleta e 5 completa), 2 casi di proteinuria glomerulare selettiva, 3 di proteinuria glomerulare non selettiva e 2 di proteinuria tubulare (Fig. 2).

L'esame istologico ha localizzato il danno renale a livello glomerulare in 9 casi, a livello tubulo-interstiziale in 3 e in entrambe le sedi in 6; in 2 casi (n. 5 e n. 15) l'esame istologico da prelievo bioptico non ha evidenziato alterazioni del parenchima renale.

Il confronto fra quadro elettroforetico e istologico ha evidenziato un totale accordo in 12 casi (5 gatti e 7 cani); in 5 casi, a proteinurie di tipo misto, corrispondeva un danno localizzato esclusivamente a livello glomerulare; in un caso (n. 14) a una proteinuria glomerulare non selettiva corrispondeva un danno localizzato all'interstizio.

I valori relativi a sensibilità e specificità, calcolati suddividendo la totalità dei soggetti come descritto in precedenza, sono riportati nelle tabelle 3 e 4.

DISCUSSIONE

Questo studio evidenzia una non totale corrispondenza fra i risultati del frazionamento proteico urinario eseguito con SDS-AGE e l'esame istologico nella localizzazione del danno renale.

Tabella 2
Indagini di laboratorio e diagnosi istopatologica

N°	p.s.	Prot. mg/dl	U-P/C	SDS-AGE	Esame istologico
1	1038	26	0,2	Glomerulare selettiva	Glomerulopatia mesangiale di modesta entità
2	1033	26	0,2	Glomerulare selettiva	Glomerulopatia ischemica di modesta entità
3	1005	36	0,6	Mista incompleta	Glomerulopatia ischemica, nefrite interstiziale
4	1018	523	7,8	Mista incompleta	Glomerulopatia mesangiale
5	1035	215	1,2	Mista incompleta	Parenchima renale a normale morfologia
6	1028	496	2,0	Glomerulare non selettiva	Glomerulopatia mesangiale proliferativa
7	1019	616	24,5	Mista completa	Glomerulonefrite membranosa
8	1002	181	14,3	Mista completa	Amiloidosi glomerulare
9	1011	32	2,2	Tubulare	Nefrite interstiziale con aree di fibrosi
10	1005	127	5,0	Mista incompleta	Glomerulosclerosi, fibrosi interstiziale e atrofia tubulare
11	1006	46	1,5	Tubulare	Nefrite interstiziale
12	1016	16	0,3	Mista incompleta	Glomerulopatia mesangiale, nefrite interstiziale
13	1043	339	2,5	Mista incompleta	Glomerulonefrite mesangiale
14	1010	130	4,4	Glomerulare non selettiva	Nefrite interstiziale
15	1014	378	11,2	Mista incompleta	Parenchima renale a normale morfologia
16	1014	107	1,7	Mista completa	Glomerulonefrite mesangiale, nefrite interstiziale
17	1010	182	3,6	Mista completa	Glomerulosclerosi, fibrosi interstiziale
18	1026	208	1,5	Glomerulare non selettiva	Glomerulopatia mesangiale
19	1044	150	0,7	Mista incompleta	Glomerulopatia mesangiale
20	1032	467	4,8	Mista completa	Glomerulopatia mesangiale, nefrosi tubulare

p.s.: peso specifico urinario; prot.: proteinuria; U-P/C: rapporto proteinuria creatinuria.

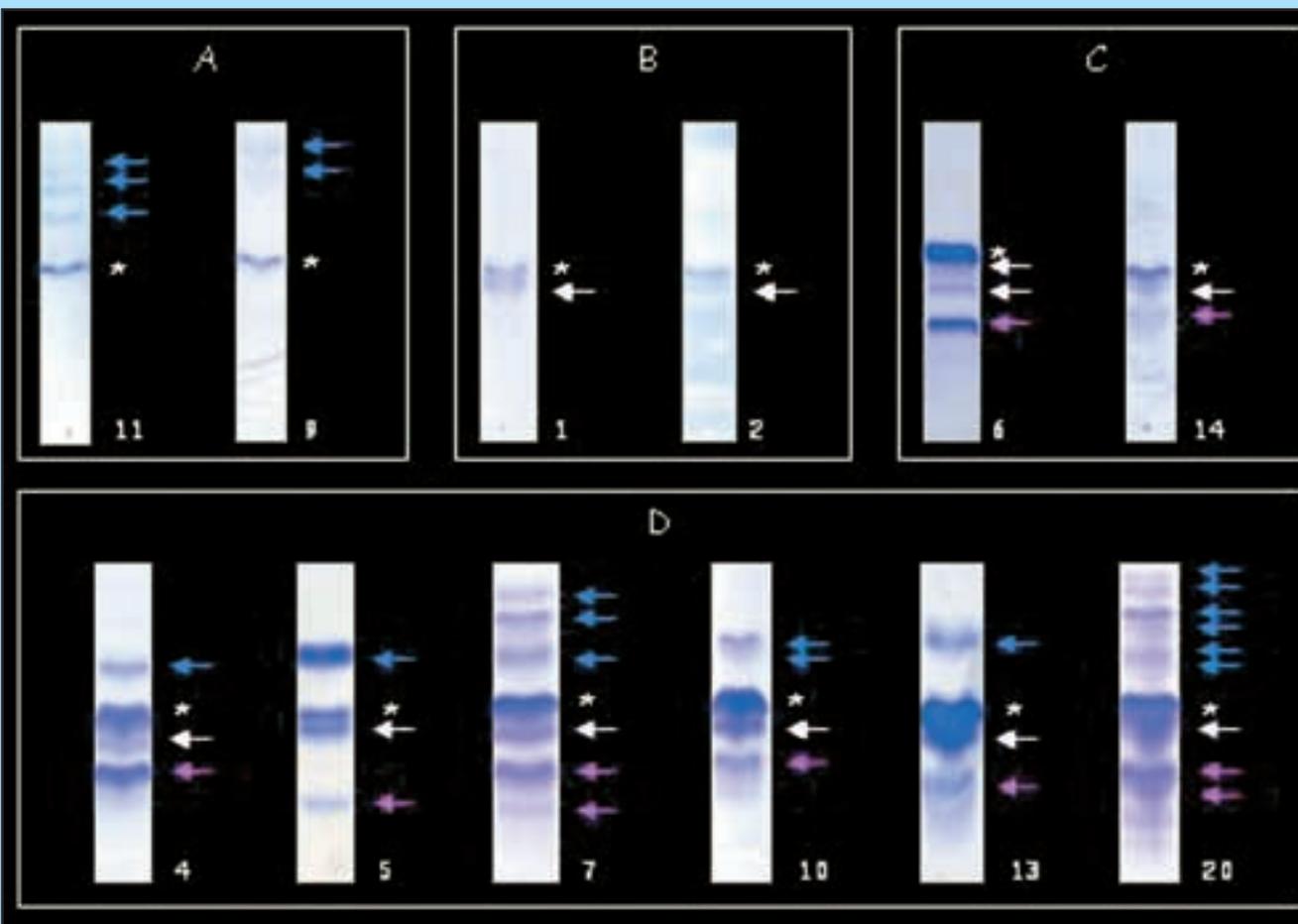


FIGURA 2 - A. proteinuria tubulare: albumina (*) e proteine a PM < 69 kDa (freccia blu). B. proteinuria glomerulare selettiva: albumina e proteine a PM $\geq 150kDa$ (freccia bianca). C. proteinuria glomerulare non selettiva: albumina e proteine a PM $\geq 150kDa$ (freccia rossa). D. proteinuria mista: incompleta (n. 4, 5, 10, 13) con proteine a PM tra 23 e 69 kDa, albumina e proteine a PM $\geq 150 kDa$; completa (n. 7, 20) con proteine a PM tra 14 e 69 kDa, albumina e proteine a PM $\geq 150 kDa$.

Suddividendo gli animali in due gruppi (Tab. 3) si osserva che l' SDS-AGE ha un'elevata sensibilità nell'evidenziare le proteine sia di origine tubulare, sia di origine glomerulare, ma una scarsa specificità; questo ultimo dato potrebbe dipendere dal basso numero di animali esenti da lesioni renali.

Considerando invece i soggetti con proteinuria mista come gruppo a sé stante, differenziandoli da quelli con proteinuria esclusivamente tubulare o glomerulare (Tab. 4), si evidenzia che la metodica possiede un'elevata sensibilità e una minore specificità nel localizzare le lesioni miste, un'elevata specificità e una minore sensibilità nel rivelare quelle puramente tubulari ed elevata specificità ma bassa sensibilità nell'individuare le lesioni puramente glomerulari.

Nei casi in cui si riscontrino proteinurie esclusivamente tubulari o glomerulari risulta quindi estremamente probabile la presenza delle relative lesioni renali. Tuttavia, l' SDS-AGE, dotata di elevata sensibilità e minore specificità nel riconoscimento delle proteine di origine glomerulare e tubulo-interstiziale, potrebbe sovrastimare le lesioni presenti.

La possibile falsa positività nella localizzazione del danno si è avuta in 7 soggetti: 5 con proteinuria mista, la cui componente tubulare, localizzata in 4 casi in zona 25 kDa, non è stata confermata dall'esame istologico e 2 con assenza di lesioni e presenza di proteinuria patologica, confermata da alti valori di U-P/C. Tale disaccordo potrebbe essere ricondotto, almeno in parte, al fatto che la biopsia non è sempre in grado di fornire una diagnosi corretta in presenza di lesioni focali²². È da notare peraltro che la presenza di bande proteiche localizzate esclusivamente in zona 25 kDa potrebbe non essere ricondotta a un danno tubulo-interstiziale ma a un sovraccarico di catene leggere libere in circolo. Tali molecole, normalmente filtrate a livello glomerulare, non riescono ad essere riassorbite del tutto dal comparto tubulo-interstiziale funzionante, come già evidenziato in corso di patologie che provocano una forte stimolazione immunitaria^{23, 24}.

Nel caso n. 14, affetto unicamente da nefrite interstiziale, in cui non si sono evidenziate proteine di origine tubulare bensì una proteinuria indicante un danno glomerulare, l'inadeguata identificazione elettroforetica delle proteine tubulari potrebbe essere imputata al campione di urina molto diluita e/o a lesioni interstiziali poco estese¹⁹. Come già sottolineato precedentemente il mancato ritrovamento di lesioni glomerulari può essere spiegato con la presenza di un danno focale o non visibile in microscopia ottica^{22, 25}.

I pattern elettroforetici ottenuti con SDS-AGE non sembrano peraltro correlati ai diversi aspetti istologici delle lesioni, come già descritto in uno studio effettuato utilizzando la metodica SDS-PAGE¹⁴. Limitando, infatti, l'analisi ai 12 casi in cui le due metodiche concordano nella localizzazione del danno renale, a lesioni renali con differenti caratteristiche istologiche corrispondono talvolta proteinurie simili (Fig. 3).

Una corrispondenza si rileva esclusivamente in 2 casi (n. 1 e 2), con modesta proteinuria e scarsa sintomatologia, in cui si evidenzia una proteinuria di tipo glomerulare selettivo e l'esame istologico individua la presenza di glomerulopatie di lieve entità, a prognosi favorevole. Sembra inoltre che le proteinurie miste di tipo completo possano essere associate a danni renali gravi, poiché i soggetti giunti a morte (n° 7, 8, 16, 17, 20) per insufficienza renale presentavano questo tipo di proteinuria. Tale riscontro è in accordo con quanto riportato in medicina umana e veterinaria, dove è stata evidenziata una correlazione tra la presenza di proteine a bassissimo peso molecolare e la gravità della compromissione renale in atto^{12, 19, 26, 27}.

Tabella 3
Sensibilità e specificità della metodica SDS-AGE nel riconoscimento delle proteine di origine tubulare e glomerulare

	Proteine tubulari	Proteine glomerulari
Sensibilità	89%	100%
Specificità	36%	40%

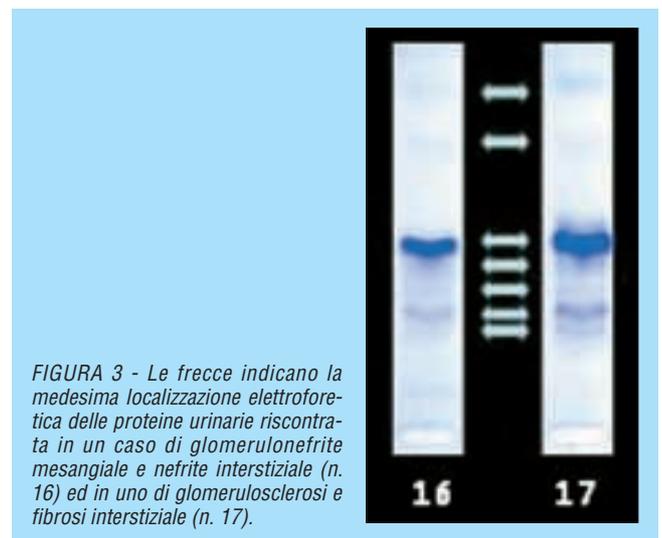


FIGURA 3 - Le frecce indicano la medesima localizzazione elettroforetica delle proteine urinarie riscontrata in un caso di glomerulonefrite mesangiale e nefrite interstiziale (n. 16) ed in uno di glomerulosclerosi e fibrosi interstiziale (n. 17).

Tabella 4
Sensibilità e specificità della metodica SDS-AGE nel riconoscimento del danno misto, tubulo-interstiziale e glomerulare

	Danno misto	Danno tubulo-interstiziale	Danno glomerulare
Sensibilità	100%	67%	47%
Specificità	50%	100%	91%

CONCLUSIONI

L'SDS-AGE si è dimostrata una metodica valida nell'identificazione delle lesioni esclusivamente tubulo-interstiziali, mentre nel riconoscimento delle lesioni miste mostra una carenza di specificità. L'identificazione del danno esclusivamente glomerulare, anche se dotata di una bassa sensibilità, possiede un'elevata specificità. Tali risultati concordano con la maggior parte degli studi effettuati in medicina umana e veterinaria^{11, 16, 17, 18, 19}; tuttavia per valutare l'effettiva capacità diagnostica dell'SDS-AGE, sarebbe opportuno confrontarla con la valutazione istologica del parenchima renale "in toto", in modo da escludere possibili variabili relative al campionamento del tessuto renale. Occorre comunque ricordare che tale metodica presenta dei limiti in quanto è possibile evidenziare la presenza di proteinuria in soggetti non nefropatici, bensì affetti da patologie infiammatorie o neoplastiche a carico delle basse vie urinarie²⁸; a tale riguardo risulta essenziale, per l'interpretazione clinica, disporre almeno di un profilo biochimico di base e di un esame urinario completo che escluda la presenza di infiammazione.

Risulta peraltro utile associare la valutazione qualitativa della proteinuria all'esame istologico da prelievo biotico, per completarne eventuali carenze diagnostiche; fermo restando che la biopsia rimane l'unico metodo per ottenere informazioni sul tipo delle lesioni, consentendo una corretta diagnosi "in vivo" e la successiva valutazione prognostica. Se la capacità diagnostica, nella localizzazione del danno, e la capacità prognostica, relativa alla gravità del danno, verranno confermate da ulteriori studi, l'elettroforesi urinaria per pesi molecolari su gel di agarosio, grazie alla non invasività e semplicità d'esecuzione, potrà rivestire un ruolo di fondamentale importanza nel monitoraggio delle patologie renali proteino-disperdenti, come già avviene in medicina umana.

Parole chiave

Cane, gatto, proteinuria, elettroforesi, SDS-AGE.

Key words

Dog, cat, proteinuria, electrophoresis, SDS-AGE.

Bibliografia

- Pagès JP, Trouillet JL: Les Protéinuries. *Prat Med Chir Anim Cie* 6: 585-597, 1990.
- Barsanti JA, Finco DR: Protein Concentration in Urine of Normal Dogs. *Am J Vet Res* 40: 1583-1588, 1979.
- Biewenga WJ, Gruys E, Hendricks HJ: Urinary Protein Loss in the Dog. *Nephrological Study of 29 Dogs Without Signs of Renal Disease. Res Vet Sci* 33: 336-374, 1982.
- Di Bartola SP, Spaulding GL, Chew D, et al: Urinary Protein Excretion and Immunopathologic Findings in Dogs with Glomerular Disease. *J Am Vet Med Assoc* 177 (1): 73-77, 1980.
- Grauer GF, Thomas CB, Eicker SW: Estimation of Quantitative Proteinuria in the Dog Using the Urine Protein-to-Creatinine Ratio from a Random Voided Sample. *Am J Vet Res* 46: 2216-2219, 1985.
- McCaw DL, Knapp DW, Hewett JE: Effect of Collection Time and Exercise Restriction on the Prediction of Urine Protein Excretion Using Urine Protein/Creatinine Ratio in Dog. *Am J Vet Res* 46: 1665-1669, 1985.
- Meyer DJ, Harvey JW: *Veterinary Laboratory Medicine. Interpretation & Diagnosis.* Philadelphia, WB Saunders Co, 1998.
- Finco DR: Urinary protein loss. In: *Canine and Feline Nephrology and Urology.* Ed by Osborne CA, Finco DR, Baltimore, Williams & Wilkins, 1995, pp 211-215.
- Gregory CR: Urinary system. In: *Veterinary Laboratory Medicine. Clinical Pathology.* Ed by Duncan & Prasse's, Iowa, Iowa State Press, 2003, pp 231-259.
- Sodikoff CH: Esame delle urine. In: *Medicina di laboratorio del cane e del gatto. Guida pratica alle diagnosi di laboratorio.* Ed by Sodikoff, Milano, Masson, 2001, pp 71-88.
- Innocenti D, Ciapini A, Galli GA, et al: Proteine urinarie: studio della efficacia di due test elettroforetici per la valutazione del follow up di pazienti neuropatici e trapiantati renali. 14° Congresso Nazionale SIMeL, Santa Margherita di Pula (Ca), 2000, p 245.
- Bazzi C, Petrini C, Rizza V, et al: Characterization of Proteinuria in Primary Glomerulonephritides. SDS-PAGE Patterns: Clinical Significance and Prognostic Value of Low Molecular Weight ("Tubular") Proteins. *Am J Kidney Dis* 29: 27-35, 1997.
- Meyer-Lindenberg A, Wohlsein P, Trautwein G, et al: Urinproteinanalyse Mit Der Sodium-Dodecyl-Sulfat-Polyacrylamid-Gradientengel Elektrophorese (SDS-PAGE) Bei Gesunden Und Nierenkranken Katzen. *J Vet Med A* 44: 39-54, 1997.
- Biewenga WJ, Gruys E: Proteinuria in the Dog: A Clinicopathological Study in 51 Proteinuric Dogs. *Res Vet Sci* 41: 257-264, 1986.
- Vittone V, Abate O, Borgarelli M, et al: Valutazione qualitativa della proteinuria in cani affetti da leishmaniosi mediante elettroforesi per pesi molecolari (SDS-AGE). *Atti SISVet* 57, Ischia, 2003, p 329-330.
- Zanatta R, Abate O, Borgarelli M, et al: Valutazione qualitativa della proteinuria mediante elettroforesi per pesi molecolari su gel di agarosio (SDS-AGE) ai fini della localizzazione del danno renale. *Atti SISVet* 56, Giardini Naxos, 2002, p 301-302.
- Zatelli A, Zini E, Bonfanti U, et al: Correlation Between Qualitative Proteinuria Assessed with SDS-AGE and Renal Histopathologic Findings in Dogs. 12th ECVIM-CA Congress, Munich, 2002, p 183.
- Zatelli A, Borgarelli M, Santilli R et al: Glomerular Lesions in Dogs Infected with Leishmania Organism. *Am J Vet Res* 64 (5): 558-561, 2003.
- Zini E, Bonfanti U, Zatelli A: 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* 7: 964-971, 2004.
- Bartges JW, Osborne CA: Canine and feline renal biopsy. In: *Canine and Feline Nephrology and Urology.* Ed by Osborne CA, Finco DR, Baltimore, Williams & Wilkins, 1995, pp 211-215.
- Petrini C, Rizza V, Bazzi C: Moderni metodi di analisi e caratterizzazione della proteinuria. in: *attualità nefrologiche e dialitiche.* Ed by Wichting, Milano, 1995.
- Barr F: Percutaneous Biopsy of Abdominal Organs Under Ultrasound Guidance. *J Small Anim Pract* 36: 105-113, 1995.
- Zini E, Bonfanti U, Zatelli A: Normal Renal Histopathology and Free Light Chain Proteinuria During Infections in Dogs. 13th ECVIM-CA Congress, Uppsala, 2003, 155.
- Varela F, Font X, Valladares JE, et al: Thrombocytopenia and Light-Chain Proteinuria in a Dog Naturally Infected with Ehrlichia Canis. *J Vet Intern Med* 11: 309-311, 1997.
- Minkus G, Reusch C, Harauf A, et al: Evaluation of Renal Biopsies in Cats and Dogs: Histopathology in Comparison with Clinical Data. *J Small Anim Pract* 35: 465-472, 1994.
- D'Amico G, Ferrario F, Rastaldi MP: Tubulointerstitial Damage in Glomerular Diseases: Its Role in the Progression of Renal Damage. *Am J Kidney Dis* 26: 124-132, 1995.
- Reichert LJM, Koene RAP, Wetzels JFM: Prognostic Factors in Idiopathic Membranous Nephropathy. *Am J Kidney Dis* 31: 1-11, 1998.
- Vaden SL, Pressler BM, Lappin MR, et al: Effects of Urinary Tract Inflammation and Sample Blood Contamination on Urine Albumin and Total Protein Concentrations in Canine Urine Samples. *Vet Clin Pathol* 33 (1): 14-19, 2004.