

# VALUTAZIONE DEGLI ISOENZIMI DELLA FOSFATASI ALCALINA NEL CANE TRAMITE PRECIPITAZIONE CON LECTINA DI GERME DI GRANO ED INIBIZIONE CON TETRAMISOLO: RISULTATI PRELIMINARI

## ALKALINE PHOSPHATASE ISOENZYME EVALUATION IN DOGS USING WHEAT GERM LECTIN PRECIPITATION AND TETRAMISOLE INHIBITION: PRELIMINAR RESULTS

VERONICA MARCHETTI <sup>(1)</sup>, ELENA LUCHETTI <sup>(1)</sup>, GIOVANNI CARDINI <sup>(1)</sup>,  
ADRIANO PODESTÀ <sup>(2)</sup>, NICOLE FANTEI <sup>(3)</sup>

### RIASSUNTO

Nel siero di cane è possibile valutare l'attività di 3 isoenzimi della fosfatasi alcalina (ALP): l'isoenzima epatico (LALP), l'isoenzima osseo (BALP) e l'isoenzima glicocorticoido-indotto (CALP) che si trova solo in questa specie. Poiché nel cane la misurazione dell'ALP totale (TALP) nel siero risulta un test poco specifico, lo studio delle forme isoenzimatiche può aiutare nell'interpretazione di un suo incremento, in particolare in corso di iperadrenocorticismo, patologie neoplastiche e croniche in genere.

La quantificazione degli isoenzimi è stata eseguita su 19 campioni di plasma di cani con livelli di TALP superiori a 200 U/L (valori di riferimento 50-130 U/L) applicando la metodica che combina la precipitazione selettiva con WGL (*Wheat Germ Lectin*) all'inibizione chimica con tetramisolo 4,2 mM.

Nel 100% dei cani con morbo di Cushing la CALP rappresentava l'isoenzima predominante, mostrando quindi una buona accuratezza (89%) e specificità (85%) diagnostiche, ed un'ottima sensibilità (100%). Tra i valori di TALP e CALP non è stata evidenziata però alcuna correlazione significativa ( $p < 0,05$ ), così come non correlati significativamente risultano gli incrementi di LALP e CALP, riscontrati rispettivamente nell'88,9% e 11,1% dei pazienti con patologia cronica. Tale dato può essere messo in relazione ad una possibile induzione degli isoenzimi in diversi tessuti o l'induzione di enzimi a loro volta responsabili del rilascio degli isoenzimi dell'ALP dalle membrane cellulari.

Nel gruppo dei pazienti neoplastici è stata evidenziata una correlazione statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) fra i valori di TALP e di LALP, che risulta l'enzima prevalente nell'80% dei soggetti. Tale risultato suggerisce la possibilità di una patologia epatica subclinica nel paziente oncologico, o un aumento del cortisolo endogeno, che induce inizialmente un incremento della LALP e successivamente della CALP.

La valutazione degli isoenzimi dell'ALP attraverso questa metodica, che risulta economica e piuttosto rapida, può quindi essere utile nello screening dell'iperadrenocorticismo del

---

<sup>(1)</sup> Dipartimento di Clinica Veterinaria, Direttore Prof. Fabio Carlucci.

<sup>(2)</sup> Dipartimento di Anatomia, Biochimica e Fisiologia Veterinaria, Direttore Prof. Franco Martelli.

<sup>(3)</sup> Collaboratore esterno.

cane, nonché per lo studio dei meccanismi eziopatogenetici alla base dell'iperfosfatemia in corso di patologie croniche e neoplastiche.

Parole chiave: fosfatasi alcalina; isoenzimi; inibizione; precipitazione; cane.

### SUMMARY

In canine serum three isoenzymes are identified: liver ALP (LALP), bone ALP (BALP), corticosteroid-induced ALP (CALP) which is present only in this species. As total ALP activity (TALP) in serum has low specificity in dog, the evaluation of isoenzymes can be useful to interpretation of hyperphosphatasemia. Nineteen canine plasma samples with TALP activity over 200 U/L (reference range for healthy dogs: 50-130 U/L) were tested and isoenzymes were determinate with an assay combining wheat germ lectin (WGL) precipitation and chemical inhibition with tetramisole 4.2 mM.

The CALP is the prevalent isoenzyme in 100% of dogs with hyperadrenocorticism, showing a good accuracy (89%) and specificity (85%), and a very good sensitivity (100%). Serum total AP activity was not significantly and positively correlated ( $p < 0.05$ ) with CALP in patients with hyperadrenocorticism, and with LALP (88.9% of cases) and CALP (11.1% of cases) in dogs with chronic illness. This finding suggests possible induction of isoenzymes in several tissues or induction of enzymes responsible for release of ALP isoenzymes from cellular membranes.

In neoplastic group, a significant correlation ( $p < 0.05$ ) was noted within TALP and LALP values, prevalent isoenzymes in 80% of dogs. This finding can result from subclinical liver injury in neoplastic dog, or an increment of cortisol, that induce an early LALP increase and subsequently an increase of CALP.

In dogs, ALP isoenzymes determination, with this method, cheap and somewhat rapid, can result as a useful screening test for Cushing syndrome, and for study of ethiopathogenetic mechanisms of hyperphosphatasemia during chronic and neoplastic illness.

Key words: alkaline phosphatase; isoenzyme; inhibition; precipitation; dog.

### INTRODUZIONE

Nel cane la misurazione della fosfatasi alcalina totale (TALP) è considerato un test diagnostico poco specifico poiché i suoi valori nel siero possono aumentare in corso di molte patologie. In uno studio precedente, noi stessi (Marchetti et al., 2003) abbiamo avuto modo di confermare la scarsa specificità degli incrementi della TALP rilevabili in corso di neoplasie maligne, patologie epatobiliari, disendocrinie, terapia con glicocorticoidi o con fenobarbitale.

La misura della TALP raccoglie il segnale analitico prodotto da più isoenzimi o isoforme circolanti ad attività fosfatasi alcalina. Nel cane la fosfatasi alcalina (ALP) è sintetizzata in diversi organi, fra cui fegato, osso, intestino e rene, ma poiché l'emivita degli isoenzimi intestinale e renale è estremamente breve, nel siero è possibile reperire solo gli isoenzimi osseo (BALP) ed epatico (LALP), insieme ad un isoenzima corticosteroido-indotto (CALP). Il primo è prodotto dagli osteobla-

sti, gli altri due sono proteine estrinseche di membrana dell'epatocita (Syakalima & Takigushi, 1998). Nel cane esistono due geni ALP, uno che codifica l'isoenzima intestinale e quello corticosteroideo-indotto, ed uno che codifica per le altre forme enzimatiche. Gli isoenzimi codificati dallo stesso gene differiscono fra loro per tipo ed estensione di glicosilazione, per cui per quanto si parli correntemente di isoenzimi, sarebbe più corretto parlare di isoforme (Gaskill et al., 2004).

Alti livelli di BALP nel cane sono stati rilevati nei soggetti in accrescimento, con osteopatie nutrizionali, iperparatiroidismo, nefropatie e con rimaneggiamenti ossei (fratture in riparazione, osteomieliti, osteosarcomi) (Allen et al., 2000).

Per altro verso l'isoenzima epatico è associato a patologie epatiche e più frequentemente costituisce un marker di colestasi (Syakalima & Takigushi, 1998), mentre un incremento dell'attività della CALP è tipicamente associato a trattamenti farmacologici con glicocorticoidi o con un eccesso endogeno di cortisolo come si verifica in corso di iperadrenocorticismo. È altresì vero che incrementi della CALP sono segnalati anche in corso di diverse patologie croniche, probabilmente come effetto secondario dello stress prolungato (Syakalima & Takigushi, 1998; Gaskill et al., 2004).

L'obiettivo principale di questo studio è stato quello di valutare quali forme isoenzimatiche fossero responsabili dell'incremento della fosfatasi alcalina in corso di iperadrenocorticismo, patologie neoplastiche e patologie croniche in genere nel cane, e se questa informazione possa essere di ausilio nell'interpretazione dell'iperfosfatemia. Un ulteriore obiettivo dello studio è stato quello di verificare l'accuratezza diagnostica, la sensibilità e la specificità di questo tipo di test nell'individuazione dell'iperadrenocorticismo nel cane.

## MATERIALI E METODI

### *Popolazione*

Sono stati inclusi nello studio 19 cani, di età non inferiore ad un anno, diversi per sesso e razza, che presentavano un valore di TALP superiore a 200 mU/ml (valori di riferimento 50-130 mU/ml), pari cioè a 1,5 volte il limite superiore dell'intervallo di riferimento normale (Laboratorio di Biochimica Clinica, Dipartimento di Clinica Veterinaria, Università di Pisa). In tutti i 19 soggetti era stato possibile giungere ad una diagnosi conclusiva tramite visita clinica, esami ematochimici e diagnostica per immagini.

### *Analisi quantitativa degli isoenzimi*

Le analisi sono state eseguite su campioni di plasma eparinato congelati e conservati a -20°C. Tutti i campioni sono stati analizzati entro 7 giorni dal congelamento, in accordo con i dati relativi alla stabilità dell'enzima riportati in bibliografia (Itoh et al., 2002).

Il dosaggio della fosfatasi alcalina totale e delle sue forme isoenzimatiche è stato eseguito mediante metodo cinetico con spettrofotometro SLIM Seac (Calenzano,

FI), a temperatura di reazione di 25°C. A 25 µl di plasma sono stati aggiunti 1500 µl di reagente di lavoro (A), ottenuto dall'aggiunta del reagente 1 (contenente p-nitrofenilfosfato 0,01 mol/L) e di 20 ml del reagente 2 (tampone DEA 1 mol/L, magnesio cloruro 0,5 mmol/L), e lasciati incubare in cuvette a 25°C per 60 secondi. La lunghezza d'onda utilizzata per la lettura spettrofotometrica dell'assorbanza era di 405 nm.

Gli isoenzimi della fosfatasi alcalina sono stati separati e quantificati combinando la precipitazione selettiva con WGL (Wheat Germ Lectin from *Triticum vulgare* - Sigma Aldrich, MI) per la determinazione di BALP e LALP, all'inibizione con tetramisolo (Tetramisolo idrocloruro - Sigma Aldrich, MI) per la valutazione dell'attività della CALP, secondo quanto riportato da Syakalima (Syakalima & Takigushi, 1997).

Il tetramisolo, ad una concentrazione di 4,2 mM, inibisce il 42% dell'attività della CALP e il 98% di quella degli isoenzimi BALP e LALP. Il WGL precipita il 92,3% di BALP, il 23,3% di LALP e il 50,6% di CALP (Syakalima & Takigushi, 1997).

La soluzione di WGL è stata ottenuta per aggiunta della polvere di WGL ad acqua distillata, alla concentrazione di 5 mg/ml, mentre la soluzione di tetramisolo (soluzione T) dall'aggiunta del tetramisolo al reagente di lavoro (A) per ottenere una concentrazione finale di 4,2 mM (1mg/ml).

A 25 µl di plasma sono stati aggiunti 1500 µl di soluzione T (4,2 mM di tetramisolo). La lettura allo spettrofotometro è stata eseguita dopo 72 secondi (Hoffmann et al., 1988) di incubazione in cuvette a 25°C ad una lunghezza d'onda di 405 nm. Il valore ottenuto, che corrisponde all'attività complessiva del 58% CALP, 2% di BALP e 2% di LALP, è stato moltiplicato per un fattore di correzione (1.81) per ottenere la concentrazione della CALP<sub>TOT</sub> (Syakalima & Takigushi, 1997).

A 50 µl di plasma sono stati aggiunti 50 µl di soluzione di WGL. La soluzione ottenuta è stata incubata a 37°C a bagnomaria per 30 minuti e centrifugata a 4000 rpm/3 min a temperatura ambiente.

Il surnatante veniva trattato con 1500 µl di reagente di lavoro (A) per determinare l'attività fosfataseica sul surnatante (TALP<sub>SUR</sub> = 49,4% CALP + 75,7% LALP + 7,7% BALP). Il valore ottenuto era moltiplicato per 2 per correggere l'effetto di diluizione.

La concentrazione della BALP è stata ottenuta dal calcolo che segue, in cui CALP<sub>P</sub> e TALP<sub>P</sub> sono rispettivamente la CALP e la TALP precipitate.

$$CALP_P = CALP_{TOT} - CALP_{SUR}$$

$$TALP_P = TALP_{TOT} - TALP_{SUR}$$

$$BALP = TALP_P - CALP_P$$

dove l'attività di BALP corrisponde più precisamente al 92,3% di BALP più 23,3% di LALP.

La LALP viene calcolata effettuando la seguente sottrazione:

$$LALP = TALP - CALP - BALP$$

*Analisi dei dati*

È stata valutata la correlazione fra gruppi calcolando il coefficiente di correlazione di Spearman ( $r_s$ ), considerando la significatività per  $p < 0,05$ .

Inoltre è stata valutata l'accuratezza diagnostica, la sensibilità e la specificità della CALP nell'individuazione di uno stato di iperadrenocorticismo, secondo le seguenti formule:

$$\text{Accuratezza diagnostica: } \frac{VP + VN}{n^{\circ} \text{ campioni}}$$

$$\text{Sensibilità: } \frac{VP}{VP + FN}$$

$$\text{Specificità: } \frac{VN}{VN + FP}$$

dove VP sono i veri positivi, VN i veri negativi, FN i falsi negativi e gli FP i falsi positivi.

## RISULTATI

Sono stati inclusi nello studio 19 cani, di cui 5 con diagnosi di iperadrenocorticismo, 5 con neoplasie non ossee (2/5 con metastasi epatiche) e 9 con patologie croniche, ovvero presenti da almeno 15 giorni (1 cardiopatia, 3 insufficienza renale, 1 mielodisplasia, 1 artrite, 1 diabete mellito, 1 dermatite, 1 ascesso polmonare) (Tab. I).

Come si evince dalla Tab. I e dal Graf. 1, in tutti i soggetti con iperadrenocorticismo prevaleva la CALP. L'80% dei pazienti affetti da neoplasia presentava un incremento maggiore della LALP ed il 20% della CALP. Infine nel 88,9% dei soggetti con patologie croniche prevaleva la LALP e nell'11,1% la CALP.

Nella sindrome di Cushing (5 casi) il test statistico applicato non ha dimostrato nessuna correlazione significativa ( $p < 0,05$ ) tra i valori della TALP e quelli della CALP ( $r_s = 0,70$ ) (Tab. II).

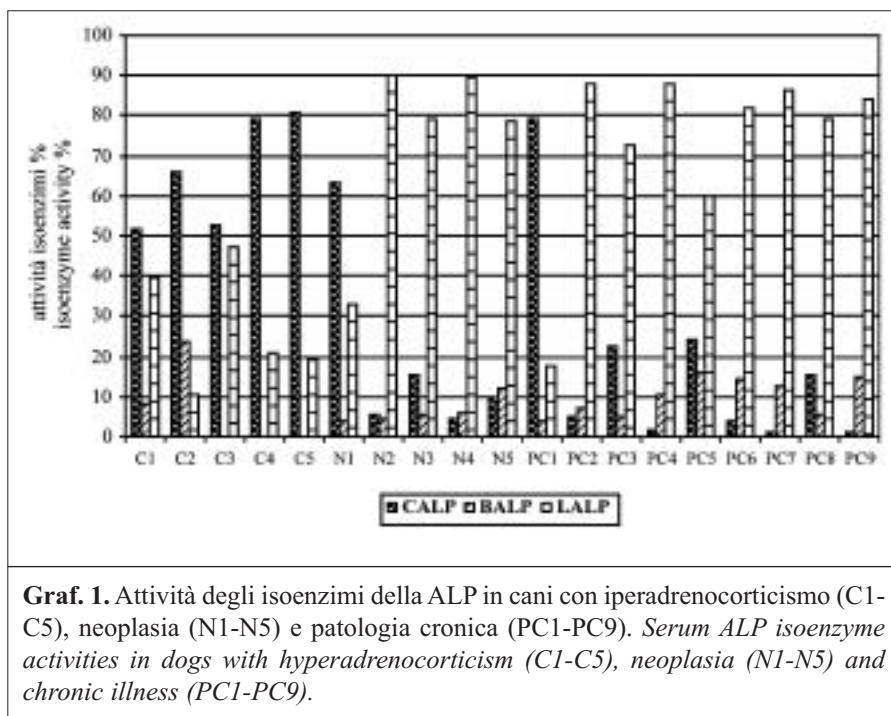
Anche nei 9 casi di patologie croniche il valore di  $r_s$ , calcolato correlando rispettivamente i valori di TALP a quelli della LALP e CALP ( $r_s = 0,38$ ;  $r_s = 0,2$ ), è risultato non statisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) (Tab. II).

Nei 5 casi di neoplasie invece il test statistico ha dimostrato una correlazione positiva statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) tra la TALP e la LALP ( $r_s = 0,90$ ) (Tab. II).

Sulla base dei dati contenuti in Tab. I, il valore di accuratezza diagnostica della CALP nella diagnosi di iperadrenocorticismo è risultato pari a 89%, con una specificità del 85% ed una sensibilità del 100%.

Casi clinici	TALP	CALP	BALP	LALP
	U/L	U/L	U/L	U/L
		%	%	%
Iperadrenocorticismo <i>Hyperadrenocorticism</i>	217.5	112.7	<b>51.8</b>	18.2
			8.4	86.6
				39.8
Iperadrenocorticismo <i>Hyperadrenocorticism</i>	417.7	276.6	<b>66.2</b>	97.8
			23.4	43.3
				10.4
Iperadrenocorticismo <i>Hyperadrenocorticism</i>	576	303.9	<b>52.8</b>	0
			0	272
				47.2
Iperadrenocorticismo <i>Hyperadrenocorticism</i>	556.9	440.7	<b>79.1</b>	0
			0	116.2
				20.9
Iperadrenocorticismo <i>Hyperadrenocorticism</i>	417.8	338.6	<b>81</b>	0
			0	79.2
				19
Liposarcoma <i>Liposarcoma</i>	258.7	162.9	<b>63</b>	10.6
			4.1	85.2
				32.9
Linfoma IV stadio <i>Lymphoma IV stage</i>	273	26.6	9.7	32.4
			11.9	214.1
				<b>78.4</b>
Neoplasia mammaria con metastasi epatica <i>Mammary neoplasia with metastasis</i>	222	12.1	5.4	9.7
			4.4	200.2
				<b>90.2</b>
Neoplasia polmonare <i>Pulmonary neoplasia</i>	4500	193	4.3	275
			6.1	4032
				<b>89.6</b>

<i>(segue) Tab. I. Valori della fosfatasi alcalina totale e dei vari isoenzimi (in grassetto è segnato l'isoenzima prevalente). Total alkaline phosphatase and isoenzyme values (prevalent isoenzyme is marked).</i>									
Casi clinici	TALP U/L	CALP U/L	%	BALP U/L	%	LALP U/L	%	TALP U/L	%
Neoplasia mammaria <i>Mammary neoplasia</i>	636.6	97.5	15.3	35.7	5.6	503.4	<b>79.1</b>		
Insufficienza cardiaca congestizia <i>Heart failure</i>	928.4	733.4	<b>79</b>	33.4	3.6	61.6	17.4		
Insufficienza renale <i>Renal Failure</i>	455	22.8	5	31.4	6.9	400.8	<b>88.1</b>		
Insufficienza renale <i>Renal Failure</i>	330	74.2	22.5	16.8	5.1	239	<b>72.4</b>		
Mielodisplasia <i>Myelodisplasia</i>	356.2	5.4	1.5	37.7	10.6	313.1	<b>87.9</b>		
Artrite immunomediata <i>Immunomeditated arthritis</i>	203	49.2	24.2	32.4	16	121.4	<b>59.8</b>		
Diabete mellito <i>Diabete mellitus</i>	292.9	12.1	4.1	41.4	14.1	239.4	<b>81.8</b>		
Insufficienza renale <i>Renal failure</i>	391.8	4.2	1.1	50.2	12.8	337.4	<b>86.1</b>		
Dermatopatia cronica <i>Chronic dermatitis</i>	636.6	97.5	15.3	35.7	5.6	503.4	<b>79.1</b>		
Ascesso polmonare <i>Pulmonar abscess</i>	671.1	7.8	1.2	98.8	14.7	564.5	<b>84.1</b>		



**Tab. II.** Valori ottenuti (r) dall'applicazione del test non parametrico di correlazione di Spearman. Significatività per  $p < 0,05$ . *Values from non-parametric Spearman correlation coefficient (r) tests. Significance was defined as  $p < 0.05$ .*

	Isoenzimi isoenzymes	r	p
Iperadenocorticismo <i>Hyperadrenocorticism</i>	TALP vs. CALP	0.70	> 0.05
Patologie croniche <i>Chronic illness</i>	TALP vs. CALP	0.2	> 0.05
	TALP vs. LALP	0.38	> 0.05
Patologie neoplastiche <i>Tumors</i>	TALP vs. LALP	0.90	< 0.05

## DISCUSSIONE

Nei cani con sindrome di Cushing l'isoenzima glicocorticoide-indotto (CALP) è risultato il più elevato ed il test ha dimostrato una sensibilità del 100% con una buona accuratezza diagnostica (89%) ed una specificità dell'85% per la diagnosi di



iperadrenocorticismo. Data l'elevata sensibilità si può concludere che il rilievo di un basso livello di CALP può ragionevolmente farci escludere la sindrome di Cushing, ma la moderata specificità suggerisce comunque cautela interpretativa di fronte ad un suo incremento in ragione del fatto che la CALP può aumentare in molte patologie sia epatiche che extraepatiche.

Da questo punto di vista i nostri risultati concordano con quelli riportati in letteratura da diversi autori, secondo cui la determinazione della CALP, sia con la sola inibizione con levamisolo (Solter et al., 1993), sia con il metodo combinato WGL/levamisolo (Syakalima & Takigushi, 1998), sia con l'elettroforesi su gel d'agarosio (Proverbio e Pozza, 1999), debba essere utilizzata per la diagnosi di esclusione.

Inoltre l'analisi statistica ha permesso di evidenziare che l'iperfosfatemia nei casi di Cushing non è significativamente correlata all'incremento della CALP, a conferma del fatto che nell'iperadrenocorticismo si ha un aumento anche degli altri isoenzimi. Questo dato suggerisce una possibile induzione degli isoenzimi in diversi tessuti o l'induzione di enzimi a loro volta responsabili del rilascio degli isoenzimi dell'ALP dalle membrane cellulari, come già segnalato da altri autori (Solter & Hoffmann, 1995; Solter & Hoffmann, 1999; Gaskill et al., 2004).

Per quanto riguarda le patologie croniche, l'isoenzima epatico è risultato quello predominante. I dati ottenuti collimano con quanto riportato in letteratura ove è descritto che lo stress cronico indotto dalla patologia determina la secrezione endogena di glicocorticoidi, a cui segue un iniziale innalzamento della LALP, che persiste per circa un mese. Tale innalzamento è legato all'accumulo intracitoplasmatico di glicogeno, secondario all'eccesso di glicocorticoidi, che determina degenerazione vacuolare e quindi una colestasi intraepatica (Hadley et al., 1990). Ad una maggiore degenerazione vacuolare si affianca l'effetto di induzione dell'espressione del gene CALP (Syakalima & Takigushi, 1998). Anche in uno dei nostri casi, l'unico con la CALP prevalente, la patologia, un'insufficienza cardiaca congestizia, era presente da più di 2 mesi.

Tra le patologie croniche un'osservazione particolare riguarda l'insufficienza renale. In letteratura è riportato che nel cane in caso di iperparatiroidismo secondario renale si può avere, anche se in maniera incostante, un incremento della fosfatasi alcalina e in particolare della BALP (Allen et al., 2000). Nell'uomo in corso di insufficienza renale acuta e cronica si verifica un significativo aumento dell'ALP, con incremento della frazione ossea e diminuzione dell'isoenzima epatico (Sanchez et al., 2002), ma in nessuno dei nostri casi si è verificato un aumento della BALP.

Per quanto concerne i pazienti oncologici, mentre nell'osteosarcoma è stato ampiamente dimostrato che l'incremento della TALP è dovuto essenzialmente all'isoenzima osseo per incremento dell'attività osteoblastica (Enhrart et al., 1998; Garzotto et al., 2000), in corso di patologie neoplastiche diverse da questa alcuni autori riportano che l'incremento dell'attività fosfatasi totale nel siero può essere legato alla produzione di una proteina correlata al paratormone (PTHrP - Parathyroid Hormone-Related Protein), come ben documentato nel linfoma e nel melanoma (Kubota et al., 2002).

In realtà se così fosse nei nostri casi, l'isoenzima che ci aspetteremmo incrementato, per azione della PTHrP sul metabolismo osseo, sarebbe ancora la BALP, anche se con meccanismo patogenetico diverso dall'osteosarcoma. Questo non si è verificato in nessuno dei cani del gruppo delle neoplasie, poichè in un caso è aumentata la CALP, mentre negli altri quattro la LALP. Sebbene si debba tener conto che 2 dei 4 casi con LALP aumentata avessero metastasi epatiche, con una correlazione positiva statisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) con l'iperfosfatemia, oltre al danno epatico diretto si debbono prendere in considerazione altri meccanismi eziopatogenetici.

Una possibilità è che l'incremento dell'ALP nel paziente neoplastico possa essere l'espressione della patologia cronica, e lo stress rappresentare ancora il meccanismo eziopatogenetico di base. Un'altra possibilità è sicuramente quella di un danno epatico subclinico o comunque precoce.

## CONCLUSIONI

La determinazione degli isoenzimi della fosfatasi alcalina, basata sulla combinazione della precipitazione selettiva con WGL e l'inibizione chimica con tetramisolo, è risultata una metodica oltre che economica anche relativamente semplice e veloce. Tutte le metodiche ad oggi utilizzate per tale valutazione presentano limiti talvolta invalicabili ed anche l'inibizione selettiva porta con sé delle problematiche, *in primis* la sovrastima dell'isoenzima osseo, la sottostima di quello epatico e la presenza di, per quanto piccole, percentuali di isoenzimi che non vengono precipitate o inibite.

Pur non trascurando quanto detto, i nostri risultati suggeriscono una sua utilità diagnostica sia nello screening per la sindrome di Cushing, sia nello studio dei meccanismi eziopatogenetici che stanno alla base della comune iperfosfatemia che si rileva in varie patologie extraepatiche nel cane.

In particolare, la determinazione degli isoenzimi può a nostro parere essere particolarmente utile nello studio dei meccanismi patogenetici alla base dell'iperfosfatemia in pazienti con diverse neoplasie in quanto ancora poche informazioni sono attualmente disponibili nella letteratura medica veterinaria.

Questi risultati preliminari ci inducono a ritenere che, soprattutto con l'ampliamento della casistica, possano emergere dati interessanti ed utili per il clinico nell'interpretazione degli esami di laboratorio, nonché fornire spunti di riflessione sull'eziopatogenesi delle molte patologie che inducono incrementi spesso significativi della fosfatasi alcalina totale nel cane.

## BIBLIOGRAFIA

- ALLEN L.C.V., ALLEN M.J., BREUR G.J., HOFFMANN W.E., RICHARDSON D.C. (2000). A comparison of two techniques for the determination of serum bone-specific alkaline phosphatase activity in dogs. *Res. Vet. Sci.*, 68: 231-235.
- ENHRART N., DERNELL W.S., HOFFMANN W.E., WEIGEL R.M., POWERS B.E., WITHROW S.J. (1998). Prognostic importance of alkaline phosphatase activity in serum from dogs with appendicular osteosarcoma. *JAVMA*, 213 (7): 1002-1006.
- GARZOTTO C.K., BERG J., HOFFMANN W.E., RAND W.M. (2000). Prognostic significance of serum alkaline phosphatase activity in canine appendicular osteosarcoma. *J. Vet. Int. Med.*, 14: 587-592.
- GASKILL C.L., HOFFMANN W.E., CRIBB A.E. (2004). Serum alkaline phosphatase isoenzyme profiles in phenobarbital-treated epileptic dogs. *Vet. Clin. Path.*, 33 (4): 215-222.
- HADLEY S.P., HOFFMANN W.E., KUHNLENSCHMIDT M.S., SANECKI R.K., DORNER J.L. (1990). Effect of glucocorticoid on alkaline phosphatase, alanine aminotransferase, and gamma-glutamyltransferase in cultured dog hepatocytes. *Enzyme*, 43: 89-98.
- HOFFMANN W.E., SANECKI R.K., DOMER J.L. (1988). A technique for automated quantification of canine glucocorticoid-induced isoenzyme of alkaline phosphatase. *Vet. Clin. Path.*, 17 (3): 66-70.
- ITOH H., KAKUDA T., GENDA G., SAKONJU L., TAKASE K. (2002). Canine serum alkaline phosphatase isoenzymes detected by polyacrylamide gel disk electrophoresis. *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (1): 35-39.
- KUBOTA A., KANO R., MIZUNO T. (2002). Parathyroid hormone-related protein (PTHrP) produced by dog lymphoma cells. *J. Vet. Med. Sci.*, 64 (9): 835-837.
- MARCHETTI V., DELLA SANTA D., CARDINI G., RINGRESSI M. (2003). Alti livelli sierici di fosfatasi alcalina nel cane. Studio retrospettivo su 75 casi. *Atti SISVET*, 57: 279-280.
- PROVERBIO D., POZZA O., (1999). Ipercortisolemia nel cane: valutazione dell'isoenzima corticosteroideo indotto della fosfatasi alcalina mediante elettroforesi su gel d'agarosio. *Atti SISVET*, 53: 251-252.
- SANCHEZ N., FERNANDEZ-CONTE M., BLANCO M., SAMANIEGO C. (2002). Alkaline phosphatase isoenzymes in the serum of patients with renal insufficiency. *An. Med. Int.*, 19 (9): 449-452.
- SYAKALIMA M., TAKIGUCHI M. (1998). The canine alkaline phosphatases: a review of the isoenzymes in serum, analytical methods and their diagnostic application. *Jpn. J. Vet. Res.*, 46: 3-11.
- SYAKALIMA M., TAKIGUCHI M., YASUDO J., HASHIMOTO A. (1997). Separation and quantification of corticosteroid-induced, bone and liver alkaline phosphatase isoenzymes in canine serum. *J. Vet. Med. ser. A*, 44: 603-610.
- SOLTER P.F., HOFFMANN W.E. (1995). Canine corticosteroid-induced alkaline phosphatase in serum was solubilized by phospholipase activity in vivo. *Am. J. Physiol.*, 269: G278-G286
- SOLTER P.F., HOFFMANN W.E. (1999). Solubilization of liver alkaline phosphatase isoenzyme during cholestasis in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, 60: 1010-1015.
- SOLTER P.F., HOFFMANN W.E., HUNGERFORD L.L., PETERSON M.E., DORNER J.L. (1993). Assessment of corticosteroid induced alkaline phosphatase isoenzyme as a screening test for hyperadrenocorticism in dogs. *JAVMA*, 203 (4): 534-538.

