

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
MORFOFISIOLOGIA E PATOLOGIA VETERINARIA CON  
APPLICAZIONI BIOTECNOLOGICHE**

Ciclo XXIV

**Settore Concorsuale di afferenza: 07/H4**

**Settore Scientifico disciplinare: VET/07**

TITOLO TESI

**STUDIO SULLA PERFUSIONE DI FEGATO E MILZA IN  
ANIMALI NON CONVENZIONALI MEDIANTE  
ECOGRAFIA E TOMOGRAFIA COMPUTERIZZATA  
(TC) CON MEZZO DI CONTRASTO**

**Presentata da: Dott. Giordano NARDINI**

**Coordinatore Dottorato**

**Relatore**

**Chiar.mo Prof. Eraldo SEREN**

**Chiar.ma Prof.ssa Anna ZAGHINI**

**Esame finale anno 2013**



# Indice

## PARTE COMPILATIVA

Capitolo 1	ANIMALI ESOTICI: I NUOVI PET	1
1.1	La Convenzione di Washington	3
1.2	Animali non convenzionali oggetto dello studio	4
Capitolo 2	MEDICINA DEGLI ANIMALI ESOTICI	10
2.1	Contenimento, parametri fisiologici e profilassi delle specie di interesse	13
Capitolo 3	DIAGNOSTICA PER IMMAGINI NEGLI ANIMALI ESOTICI	16
3.1	Nuove tecniche di diagnostica per immagini: utilizzo del MDC	18
3.1.1	“Contrast Enhanced Ultrasounds” (CEUS)	18
3.1.2	Tomografia Computerizzata (TC) con mezzo di contrasto	23

## PARTE SPERIMENTALE

Capitolo 4	PREMESSA	31
4.1	Il fegato: fisiologia e patologia nelle specie di interesse	31
4.1.1	Furetto	31
4.1.2	Coniglio	35
4.1.3	Iguana	41
4.2	La milza: fisiologia e patologia nelle specie di interesse	49
4.2.1	Furetto	49
4.2.2	Coniglio	52
Capitolo 5	MATERIALI E METODI	54
5.1	Campione diagnostico	54
5.2	Valutazione dello stato di salute	55
5.3	Preparazione del paziente	56
5.4	Contenimento	57
5.5	CEUS	59

5.6	TC	60
5.7	Strumentazione utilizzata	61
5.7.1	CEUS	61
5.7.2	TC	63
Capitolo 6	RISULTATI E DISCUSSIONI	64
6.1	Furetto	64
6.1.1	Stato di salute	64
6.1.2	CEUS	66
6.1.3	Applicazione della tecnica CEUS al caso patologico Furo P	80
6.2	Coniglio	82
6.2.1	Stato di salute	82
6.2.2	CEUS	84
6.3	Iguana	95
6.3.1	Stato di salute	95
6.3.2	CEUS	98
6.3.3	TC	103
6.3.4	Applicazione della tecnica CEUS ai casi patologici	111
Capitolo 7	CONCLUSIONI	117
Capitolo 8	BIBLIOGRAFIA	119

## **PARTE COMPILATIVA**



## Capitolo 1. ANIMALI ESOTICI: I NUOVI PET

Nel dizionario italiano, la parola “esotico” presenta due principali definizioni: “straniero, che viene da un paese lontano” e “stravagante, originale, fuori dal comune”. Entrambi questi significati ben si accompagnano ai nuovi animali da compagnia, definiti animali esotici o, più recentemente, animali non convenzionali. Entrambi questi termini risultano però controversi: sebbene, infatti, la maggior parte della gente consideri pet solamente cane e gatto, altri animali definiti “non convenzionali”, come ad esempio il furetto, sono in realtà specie domestiche diffuse già dall’epoca romana e che, proprio come cane e gatto, hanno sviluppato caratteristiche peculiari che li differenziano dai corrispettivi selvatici. Allo stesso modo anche la terminologia “animali esotici” non sarebbe applicabile per alcune specie, tra cui le testuggini del genere *Testudo* e il coniglio, la cui origine è mediterranea. La varietà di animali tra mammiferi, uccelli, rettili e pesci che compete oggi per un posto in casa è infatti molto ampia, rendendo particolarmente difficile una denominazione comune. Ciò ha portato in tempi recenti anche a difficoltà normative, a causa di una mancata chiarezza nella distinzione tra animale domestico ed esotico.

Nel corso della presente dissertazione mi riferirò a questi animali come “animali esotici”, utilizzando questo aggettivo con il significato anglosassone di “exotic animals”, che comprende tutti gli animali da compagnia ad esclusione del cane e del gatto.

I primi animali esotici ad essere mantenuti e riprodotti in cattività per motivi diversi dall’alimentazione si pensa siano stati i pappagalli, i cui primi reperti risalgono all’epoca Egiziana. La riproduzione e il commercio di altre specie comuni di uccelli quali i canarini e i parrocchetti risale invece ad epoche più moderne, tra il XVII e il XVIII secolo. La domesticazione di furetto e coniglio si fa invece risalire ai Romani, mentre l’avvento degli altri piccoli mammiferi è più recente. Storicamente, infine, l’interesse per i rettili deriva dal fascino evocato dal “nuovo”, dal “diverso”. La passione per questi animali è poi scoppiata attorno agli anni ’40, interessando prima le tartarughe, poi l’iguana e infine le altre specie. Ovviamente, all’inizio si trattava di animali di cattura, la cui sopravvivenza era solitamente molto breve, sia a causa dello stress che della scarsa conoscenza in merito alle particolari esigenze gestionali di questi animali (Mitchell & Tully, 2008).

In Italia, negli ultimi 10 anni si è assistito ad un grande aumento dell’interesse nei confronti degli animali esotici. Tuttavia, soprattutto per alcune specie, queste si sono diffuse come alternativa al cane e al gatto come conseguenza delle piccole dimensioni (a volte solo

apparenti e associati alla giovane età, come nelle tartarughe d'acqua del genere *Trachemys* e in alcuni conigli venduti come nani) e del loro basso costo, considerando la gestione di questi animali meno impegnativa rispetto ai classici pet. Purtroppo ciò ha portato all'abbandono di moltissimi coniglietti e tartarughe "dalle orecchie rosse" (*Trachemys scripta elegans*) e simili, con conseguenze spesso devastanti per l'ambiente. Entrambe sono infatti specie invasive, a causa della loro prolificità e fertilità.

Grazie ad internet e alla nascita di moltissimi siti specializzati, esiste oggi una maggiore possibilità di reperire informazioni più corrette in merito all'animale che si sta per acquistare, sia in termini di biologia ed etologia che in termini di gestione. Negli ultimi anni l'attenzione al benessere di questi animali è molto cresciuta e sono stati raggiunti livelli molto alti nell'allevamento in cattività che oggi rappresenta per alcune specie l'unica speranza di conservazione in natura. Parallelamente è aumentata la richiesta di cure sempre più specialistiche e quindi l'esigenza di una medicina veterinaria di alto livello per queste specie, che deve essere oggi supportata dalle moderne tecnologie in campo medico.

Nella Tabella 1 sono elencati gli animali esotici maggiormente diffusi in Italia.

MAMMIFERI	
Lagomorfi	Coniglio.
Piccoli roditori	Cavia, cincillà, criceto, topi, gerbillo, ratto, citello, cane della prateria, degu, scoiattoli.
Mustelidi	Furetto, puzzola americana.
Marsupiali	Petauro dello zucchero, opossum.
Viverridi	Civetta delle palme, genetta, zibetto.
UCCELLI	
Passeriformi	Fringillidi, merli indiani (maine), piccoli esotici.
Psittaciformi	Pappagalli grandi, medi e piccoli.
Rapaci	Rapaci notturni e diurni.
RETTILI	
Cheloni	Testuggini terrestri e tartarughe d'acqua dolce.
Sauri	Camaleonte, iguana, gecko, drago barbuto, uromastice, e altri ancora.
Ofidi	Serpenti (specie provenienti da varie parti del mondo).

Tabella 1. Animali esotici maggiormente diffusi in Italia.

## 1.1 La Convenzione di Washington

Alcune delle specie che si stanno diffondendo nelle case Italiane sono caratterizzate dalla condizione di pericolo di estinzione allo stato naturale e sono pertanto soggette alla Convenzione di Washington. Questo importantissimo documento che regola il commercio internazionale delle specie a rischio di estinzione, risale al 1973 ed è in vigore in Italia dal 1975. Attualmente la norma è stata recepita da 175 paesi, definiti Parties. L'adesione alla convenzione è volontaria. L'Unione Europea rappresenta oggi un esponente molto importante della convenzione: tuttavia in Europa, i regolamenti relativi al settore CITES sono comunitari già dal 1° gennaio 1984, e pertanto applicati uniformemente su tutto il territorio. Le specie soggette alla convenzione sono listate in tre appendici cui sono associate disposizioni più o meno restrittive relativamente al commercio e alla detenzione. Le due Autorità Amministrative italiane che si occupano di questo settore sono il Ministero dello Sviluppo Economico - Direzione Generale per la Politica Commerciale Internazionale - Divisione III-CITES e il Ministero Delle Politiche Agricole e Forestali.

I pet più diffusi che devono sottostare alla certificazione CITES sono elencati nella Tabella 2. Non vengono fatte differenze tra i diversi allegati, in quanto esiste una deroga per le specie in allegato 1 (soggette a regole più rigide) in caso di soggetti nati in cattività, ai quali vengono applicati i regolamenti relativi alle specie in allegato 2.

MAMMIFERI	RETTILI	UCCELLI
Il cincillà è in lista, con esclusione però della forma domestica. Civetta delle palme e zibetto sono in Allegato III, e risultano protette solo in India, da cui è pertanto vietata l'importazione.	Sono in lista la maggior parte, comprese le specie autoctone di testuggini del genere <i>Testudo</i> ; sono escluse specie di tartaruga d'acqua del genere <i>Trachemys</i> e la maggior parte dei gechi.	Sono in lista i rapaci falconiformi e strigiformi, nonché gli psittaciformi, con eccezione degli inseparabili, della calopsitta e dei parrocchetti ondulado e dal collare.

Tabella 2. Animali esotici da compagnia inclusi nelle liste Cites (<http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>).

## 1.2 Animali non convenzionali oggetto dello studio

		<h1>FURETTO</h1> <p><i>Mustela putorius furo</i></p> <p>Classe: Mammiferi (<i>Mammalia</i>) ; Ordine: Carnivori (<i>Carnivora</i>) ;            Famiglia: Mustelidi (<i>Mustelidae</i>); Genere: <i>Mustela</i>;            Specie: <i>M. putorius</i> ; Sottospecie: <i>M. putorius furo</i></p>			
		Peso in età adulta F: 0,6 – 1 kg M: 1 – 3 Kg	Maturità sessuale 9 mesi	Durata della gravidanza 39 – 42 giorni	Età media in cattività 5 – 8 anni
Origine	<p>Il furetto è considerato la specie domestica della puzzola. In natura ad oggi esistono tre specie di puzzola, la puzzola europea (<i>Mustela putorius</i>), la puzzola delle steppe (<i>Mustela eversmanni</i>) e il furetto dai piedi neri (<i>Mustela nigripes</i>): si pensa che il furetto possa derivare dalla domesticazione tra i 2000 e i 3000 anni fa della puzzola europea, delle steppe, o di incroci tra queste due specie. Si pensa che questi animali fossero utilizzati per il controllo di roditori e conigli. Ci sono evidenze che i romani portassero furetti durante le loro invasioni, ma il legame diretto tra i romani e la nascita del furetto domestico non è mai stato confermato.</p>				
Particolarità anatomiche	<p>Una delle caratteristiche più conosciute dei furetti è la presenza di un paio di ghiandole perianali ben sviluppate. Esattamente come la puzzola, il furetto è in grado di rilasciarne il secreto dall'odore pungente se impaurito o eccitato, ma non è in grado di spruzzarlo a distanza. I dotti delle ghiandole sono posizionati attorno all'ano, a ore 4 e 8. A dispetto della comune credenza l'odore intenso tipico dei furetti è in realtà da attribuirsi alle numerose ghiandole sebacee. La presenza di ghiandole sudoripare poco sviluppate, rende il furetto più suscettibile ai colpi di calore rispetto ad altri mammiferi.</p> <p>I furetti sono carnivori stretti e posseggono peculiarità anatomiche e fisiologiche del tratto gastroenterico. La dentizione dei furetti è simile a quella degli altri carnivori: <math>2(I^3_3C^1_1P^3_3M^1_2)</math>. Il tratto intestinale è molto breve, caratterizzato fisiologicamente da un transito molto rapido e dalla incapacità alla digestione di fibra vegetale e ad utilizzare efficientemente i carboidrati.</p> <p>L'apparato genitale ricorda quello del cane, con la presenza di un osso penieno a "J" nel maschio. Rispetto ad altre specie il cuore occupa una posizione più caudale in torace, localizzato a livello di 6°-8° spazio intercostale. La trachea è particolarmente lunga e così anche i polmoni, tra l'altro dotati di una grande capacità di riempimento.</p>				
Aspetti biologici ed etologici	<p>Il furetto domestico presenta profonde differenze fisiologiche, riproduttive e comportamentali rispetto ai suoi progenitori selvatici.</p> <p>A differenza della puzzola i furetti si accoppiano due o più volte all'anno, portando alla luce cucciolate più numerose che arrivano fino a otto piccoli.</p> <p>In ambiente domestico i furetti sono conosciuti per essere molto affettuosi, sociali e gregari, al contrario delle specie selvatiche, tipicamente caratterizzate da individui predatori solitari. Il cambiamento etologico più evidente nel furetto, è dato dalla totale assenza di paura nei confronti dell'uomo e di oggetti non familiari, tutte caratteristiche tipiche delle specie addomesticate.</p>				
Status	<p>DOMESTICO (dichiarazione dell'ISPRA, Istituto Superiore per la Protezione e la Ricerca Ambientale, con valore legale in Italia)</p>				

Tabella 3a. Tabella informativa sul furetto. Bibliografia: Powers and Brown, 2012. Foto originale.

<b>Razze</b>	<p>Le diverse tipologie di furetto differiscono principalmente per la colorazione del mantello. Le principali variazioni riconosciute dall'American Ferret Association (<a href="http://www.ferret.org">www.ferret.org</a>) comprendono diverse associazioni tra colore base (nero, black sable, sable, champagne, cioccolato e cannella, albino e bianco occhi scuri), pattern di colore (solid – 100% colore base; standard – 90% colore base e 10% bianchi, con schiarimento colore base; roans – 40-50% colorati; point o siamese – presenza di punti di colore diverso) e pattern delle zone bianche (blaze – macchia a livello di fronte e nuca; panda – testa quasi completamente bianca; mitts – presenza di maschera facciale).</p> <p>La variazione albina è stata selezionata come razza da caccia; il bianco occhi neri (DEW- dark-eyed white) solid o standard, essendo tutto bianco, si differenzia dall'albino per il colore degli occhi.</p>	
<b>GESTIONE</b>		
<b>Stabulazione</b>	<b>In casa: SI</b>	<b>All'esterno: SI</b>
	<p><b>Note:</b> l'ambiente domestico presenta dei pericoli specialmente legati alla morsicature di fili elettrici.</p>	<p><b>Note:</b> rischio di colpo di calore a temperature &gt; 30°C ricovero caldo necessario per temperature &lt; 7°C</p>
	<b>In gabbia</b>	<b>Liberi in appartamento</b>
	<p>Essendo animali molto curiosi e sociali il confinamento in gabbia deve essere sempre alternato ad ore di libertà e ridotto al minimo indispensabile. Devono essere utilizzate gabbie di grandi dimensioni dotate di un buon arricchimento ambientale. Dimensioni minime consigliate per una coppia: 120x60x100 cm. Un nascondiglio buio dove dormire è indispensabile, costituito ad esempio da stracci o amache. Solitamente si abbeverano sia dal beverino che dalla ciotola che però tendono a rovesciare di continuo. Il furetto non deve essere considerato un animale da gabbia.</p>	<p>E' bene, in generale, non lasciare liberi i furetti senza supervisione in quanto la casa presenta dei potenziali pericoli. E' importante prestare attenzione a oggetti di gomma, cuscini e qualsiasi materiale che ingerito possa rappresentare un pericolo di intossicazione o ostruzione gastrointestinale. I furetti possono essere addestrati ad usare la lettiera per i propri bisogni, anche se solitamente amano defecare e urinare ove capita, in prossimità di un angolo.</p>
<b>Alimentazione</b>	<p>I furetti sono carnivori obbligati. In natura cacciano e si nutrono di piccoli mammiferi, uccelli, rane, crostacei, pesci, vermi, insetti e uova. I furetti costruiscono forti preferenze alimentari basate principalmente sull'odore, a seconda dei cibi che vengono conosciuti in età giovanile. Offrire da subito diversi tipi di cibo può pertanto risultare molto utile, in vista di un'eventuale necessità di cambi di dieta in età adulta. In generale, la dieta deve essere ricca di grassi animali, proteina animale di ottima qualità e povera in fibra e carboidrati. In alternativa a prede intere esistono in commercio preparazioni apposite per i furetti ben bilanciate da un punto di vista nutrizionale (in media 30-35% proteina e 15-20% lipidi) e generalmente apprezzate dagli animali. Supplementi accettabili all'utilizzo di mangimi secchi sono dati da uova (non necessariamente cotte), cibo umido per gatti, carne cruda. A causa del rapido transito intestinale bisogna sempre evitare digiuni più lunghi di tre ore, per non incorrere in condizioni di ipoglicemia. Un periodo di tre, massimo quattro ore è indicato anche come digiuno pre-chirurgico o preparatorio per indagini emato-biochimiche.</p>	

**Tabella 3b. Tabella informativa sul furetto. Bibliografia: Powers and Brown, 2012.**

		<h1>CONIGLIO</h1> <p><i>Oryctolagus cuniculus</i></p> <p>Classe: mammiferi; Ordine: lagomorfi; Famiglia: leporidi, Genere: <i>Oryctolagus</i>; Specie: <i>O. cuniculus</i></p>			
		Peso in età adulta dipendente dalla razza	Maturità sessuale 4-5 mesi razze piccole; 5-8 mesi razze grandi	Durata della gravidanza 30 – 32 giorni	Età media in cattività 7 - 8 anni
Origine	<p>Tutte le varietà di coniglio domestico discendono dal coniglio europeo <i>Oryctolagus cuniculus</i>, un tempo presente solamente nella Penisola Iberica e in Francia. La domesticazione del coniglio risale all'epoca romana, quando venivano allevati per la carne e per la caccia. Più che di una vera e propria domesticazione, risultata inutile per la buona indole e la facilità riproduttiva, si è in realtà trattato di una selezione verso razze a resa migliore (prolificità, precocità, taglia etc.).</p> <p>Oggi questo animale è diffuso ovunque come pet, mentre la maggior parte dei conigli allo stato selvatico appartiene a specie diverse, anche se spesso a loro volta definite comunemente conigli (es cottontail rabbit, <i>Syvilagus floridanus</i> in USA). Se liberato al di fuori del suo ambiente naturale, questo animale è invece in grado di creare seri danni all'ecosistema.</p>				
Particolarità anatomiche	<p>Le orecchie estremamente sviluppate sono la caratteristica più tipica del coniglio; in alcune razze l'estensione delle pinne arriva a costituire fino al 12% della superficie corporea. Nonostante questa superficie venga sfruttata per dissipare calore il coniglio presenta ghiandole sudoripare solamente a livello labiale ed è pertanto sensibile alle alte temperature. Altra caratteristica tipica del coniglio è rappresentata dai denti, a crescita continua e senza radici anatomiche, caratteristiche che lo accomunano ai roditori. La formula dentaria è <math>2(I^2_1C^0_0PM^3_2M^3_3)</math>. Le patologie dentali rappresentano uno dei problemi sanitari più frequenti e l'apparato gastroenterico è quello tipico degli erbivori monogastrici, con grande sviluppo del cieco. A differenza della maggior parte dei mammiferi domestici, il coniglio non presenta cuscinetti plantari, ma il piede è protetto da un folto strato di pelo. La peculiare fragilità delle ossa comparata con la capacità muscolare degli arti posteriori può portare ad autotraumatismi a seguito di movimenti bruschi e improvvisi.</p> <p>L'apparato riproduttivo della coniglia è caratterizzato da due corna uterine separate e dall'assenza del corpo dell'utero.</p>				
Aspetti biologici ed etologici	<p>Nonostante l'estrema differenziazione somatica presente tra le numerose razze e le differenze di taglia, mantello e carattere rispetto al coniglio selvatico, il "moderno" coniglio da compagnia mantiene ancora la maggior parte delle caratteristiche del suo progenitore, tra cui la socialità a gerarchia patriarcale, la territorialità, l'attitudine a scavare tane e la timidezza. Sebbene accettino di buon grado il rapporto con l'uomo senza particolare stress, il coraggio dei conigli di casa dipende esclusivamente dal singolo soggetto più che da un adattamento conseguente alla domesticazione.</p>				
Status	Animale da reddito, da laboratorio e da compagnia				

Tabella 4a. Tabella informativa sul coniglio. Bibliografia: Naff & Craig, 2012; Vella & Donnelly, 2012; Harcourt-Brown, 2004. Foto originale.

<b>Razze</b>	<p>Esistono diverse razze, suddivise in due gruppi: fancy (comprende angora, lop, i conigli ariete: caratterizzati dal portamento delle orecchie verso il basso, e dwarf, i conigli nani) e fur, ulteriormente suddiviso in normal, rex, e satin. All'interno delle diverse razze sono inoltre descritte varietà di colore, per un totale di 500 varietà. Per riferimenti: American Rabbit Breeders Association ( <a href="http://www.arba.net">www.arba.net</a> ), British Rabbit Council ( <a href="http://www.thebrc.org">www.thebrc.org</a> ).</p>	
<b>GESTIONE</b>		
<b>Stabulazione</b>	<p><b>In casa:</b></p> <p><b>SI</b></p>	<p><b>All'esterno: SI</b></p> <p>Attenzione a temperature &lt; 4°C e &gt;28°C. Il fieno nel ricovero è ottimo come isolante termico.</p>
	<p style="text-align: center;"><b>In gabbia</b></p> <p>La gabbia dovrebbe essere concepita solamente come ricovero, mentre spazi più grandi sono necessari per garantire l'esercizio fisico, fondamentale per un benessere sia psicologico essendo animali molto sociali, sia fisico, favorendo tra l'altro la motilità gastro-intestinale.</p> <p>Le dimensioni di questo ricovero devono garantire almeno il decubito laterale nella massima estensione. Nel caso di più conigli, deve esserne presente uno per ogni individuo. Particolare attenzione deve essere posta nel substrato di questa zona, che deve essere soffice, asciutto e non polveroso.</p>	<p style="text-align: center;"><b>Liberi in appartamento</b></p> <p>Il coniglio può essere lasciato libero in casa o in ampi recinti, sia interni che esterni. Entrambe le soluzioni devono essere a prova di coniglio: non ci devono essere, ad esempio, fili elettrici da mordere, mentre devono essere garantiti dei ricoveri dove nascondersi e coricarsi, nonché per proteggersi da condizioni climatiche avverse specialmente in caso di stabulazione esterna. In caso di conigli mantenuti liberi in giardino, bisogna tenere in considerazione la loro attitudine a scavare e quindi adottare precauzioni per evitare eventuali fughe.</p> <p>I conigli possono essere facilmente addestrati ad usare la lettiera per i propri bisogni.</p>
<b>Alimentazione</b>	<p>I conigli sono erbivori monogastrici, il cui apparato gastrointestinale si è adattato a consumare una dieta con un'alta percentuale di fibra. Secondo un processo fisiologico particolare, a livello ciecale, si ha la produzione del ciecotrofo (feci morbide che si presentano a forma di grappolo), che viene assunto dal coniglio direttamente dall'ano e utilizzato come fonte di amminoacidi e vitamine. In generale, la dieta del coniglio da compagnia differisce profondamente da quella del coniglio da allevamento, in cui la qualità di vita a lungo termine non è considerata, a favore di un rapido accrescimento, fertilità e prolificità. Le diete commerciali, sebbene bilanciate, non garantiscono sempre una corretta nutrizione, in quanto povere di fibra lunga. Una dieta ottimale è costituita da un'elevata percentuale (fino al 100%) di fieno di buona qualità, eventualmente associato a verdura fresca (massimo 25%) e pellettato a base di fieno (no cereali e semi!). Il coniglio beve grosse quantità di acqua (fino a 150 ml/kg/die) a seconda del tipo di cibo offerto; la presenza nella dieta di verdure fresche ricche in acqua può diminuirne notevolmente l'assunzione.</p>	

**Tabella 4b. Tabella informativa sul coniglio. Bibliografia: Naff & Craig, 2012; Vella & Donnelly, 2012; Harcourt-Brown, 2004.**

	<h2 style="margin: 0;">IGUANA VERDE</h2> <p style="margin: 0;"><i>Iguana iguana</i></p> <p style="margin: 0;">Classe: <i>Reptilia</i>; Superordine: <i>Lepidosauria</i>;          Ordine: <i>Squamata</i>; Sottordine: <i>Lacertilia</i>          Famiglia: <i>Iguanidae</i>; Genere: <i>Iguana</i>; Specie: <i>I. iguana</i></p>		
<p>Dimensioni in età adulta dipendenti dalla località</p> <p>M: 360 mm di lunghezza rostro-cloaca; 1,3 kg di peso</p> <p>F: 325 mm; 1,1 kg</p>	<p>Maturità sessuale: 1 – 3 anni, legata alla taglia.</p> <p>F: taglia 250-270 mm</p> <p>M: taglia 170 mm</p>	<p>Ovodeposizione</p> <p>1-2 mesi dopo l'accoppiamento.</p> <p>Schiusa: dopo 90 giorni</p>	<p>Età media in cattività</p> <p>20 anni</p>
<p>Origine</p>	<p>Animale nativo del Centro e Sud America e tuttora diffuso in natura soprattutto in Messico. I primi esemplari tenuti in casa come pet sono documentati in Europa attorno all'anno 1950, ma si pensa che la sua popolarità sia incrementata successivamente, anche a seguito dalla sua diffusione come animale da laboratorio a partire dagli anni '60. Ad oggi quasi tutte le iguana di casa sono nate in cattività, grazie ad una pratica di allevamento iniziata attorno agli anni '80.</p>		
<p>Particolarità anatomiche</p>	<p>Le iguane sono rettili caratterizzati da un corpo cilindrico, con colorazione verde brillante. Gli arti sono muniti di robuste unghie che consentono di arrampicarsi con grande agilità. La bocca presenta piccoli denti dai bordi seghettati e ospita una lingua carnosa che ha una caratteristica colorazione più intensa in punta. L'attività di estroflessione della lingua ha una funzione olfattiva entrando in rapporto con l'organo di Jacobson, che si apre sulla volta della cavità orale. Sulla sommità della testa si trova il cosiddetto occhio parietale o terzo occhio, che non ha proprietà visive ma un ruolo nella regolazione dei cicli circadiani (recettore della luce). Le narici hanno, oltre alla funzione respiratoria, anche quella di eliminare i sali in eccesso nell'organismo. Le iguane sono dotate di un'ampia piega di pelle sotto la gola, detta giogaia, che oltre ad avere un ruolo nella termoregolazione, viene esibita compiendo movimenti verticali con la testa, soprattutto da parte dei maschi, come segnale di minaccia. Altro carattere tipico maggiormente pronunciato nei maschi adulti soprattutto durante la stagione di accoppiamento è dato dai pori femorali, presenti nella faccia inferiore delle cosce, che rilasciano un secreto che funge da marker territoriale. Il dimorfismo sessuale è presente dopo l'anno di età, con il maschio dotato di testa più massiccia, coda e unghie più lunghe, cresta, giogaia e pori femorali maggiormente sviluppati e dimensioni in generale maggiori. In genere i maschi assumono una tonalità di colore che vira maggiormente verso l'arancio, con riflessi azzurrati nella stagione riproduttiva. I maschi possiedono due organi copulatori alla base della coda detti emipeni, dei quali uno solo, a scelta, viene utilizzato durante l'accoppiamento. La coda, molto lunga e robusta, viene utilizzata per nuotare, ma anche come strumento di attacco: le "frustate" inferte sono generalmente molto dolorose. La coda può rompersi volontariamente o accidentalmente come nelle lucertole a scopo difensivo e ricresce successivamente con un aspetto differente (colore e forma delle squame). Le iguane sono ovipare, depongono da 20 a 70 uova una volta all'anno in profonde buche scavate nel terreno, esse si schiudono dopo circa 3 mesi.</p>		
<p>Status</p>	<p>Esotico, CITES allegato II</p>		

**Tabella 5a. Tabella informativa sull'iguana comune. Bibliografia: Frye, 1995; Jacobson, 2003. Foto originale.**

Aspetti biologici ed etologici	<p>Le iguane sono considerate i “conigli” della foresta tropicale, essendo prive di sistemi difensivi efficaci contro i predatori, da cui tendono per lo più a fuggire. Questi animali si spostano facilmente e non sembrano avere comportamenti di territorialità, ma convivono tra loro senza che si instauri alcun tipo di gerarchia, anche perché gli individui che condividono la stessa area cambiano continuamente. Durante il periodo degli accoppiamenti, invece, i maschi tendono a formare territori di monta, per cui si instaurano delle gerarchie. In cattività, dove risorse di cibo, acqua e illuminazione sono limitate nello spazio, i soggetti maschi mostrano segni di territorialità anche al di fuori della stagione degli accoppiamenti, competendo per le risorse. Il rapporto con l’uomo è buono, soprattutto se abituato fin dall’età giovanile. Questi rettili sembrano essere quelli che riconoscono maggiormente il proprietario, tuttavia, durante il periodo degli amori, sia maschi che femmine possono mostrare segni di aggressività verso l’uomo.</p>
<b>GESTIONE</b>	
<p>In quanto rettile tropicale deve essere stabulata in terrari preparati a regola d’arte per esaudire le sue particolari necessità fisiologiche, non è dunque possibile gestire un’iguana libera in casa, se non durante il periodo estivo, quando possono anche essere stabulate in terrari esterni.</p>	
<p><b>Riscaldamento:</b> La fonte di calore ideale è fornita da una lampada spot in grado di creare una zona calda dove l’iguana possa ricevere il calore per irraggiamento e un ambiente a diversi gradienti di temperatura, che le permetta di autoregolare la propria temperatura spostandosi nell’ambiente. E’ importante proteggere le fonti di calore in modo da evitare il contatto diretto con l’animale e conseguenti inevitabili ustioni.</p> <p><b>Preferred Optimal Temperature Zone (POTZ):</b> 21-39 °C (intervallo di temperatura preferito)</p> <p><b>Umidità:</b> garantire 85-95% tramite umidificazione costante dell’ambiente</p> <p><b>Illuminazione:</b> Come tutti i rettili diurni necessita di una fonte adeguata di raggi UVB (280-320 nm) per sintetizzare correttamente la vitamina D<sub>3</sub>, essenziale per il metabolismo del calcio. Durante i periodi caldi può essere tenuta all’esterno per godere della luce naturale, mentre in casa bisogna munirsi di lampade adeguate, meglio se ai vapori di mercurio, in grado di garantire contemporaneamente luce, raggi UVB adeguati e calore. Queste lampade non devono essere schermate da plastica o vetro.</p> <p><b>Gabbia:</b> dimensioni per un soggetto, gabbia permanente: 3 x 4,6 x 1,8 m; “shift cage” (trasportabile dall’esterno all’interno quando ad esempio le temperature notturne scendono al di sotto dei 20 °C): 0,6x0,6x1,8 m.</p> <p><b>Arredamento:</b> deve mirare a replicare l’ambiente naturale dell’iguana e garantirne l’attività arboricola e di esplorazione. Diversi tipi di piante possono essere associate a rami di diverso diametro. Come substrato si possono usare cortecce di legno di grosse dimensioni e rocce finte. In caso di strutture esterne devono essere assicurate una zona di ombra e una tana in cui potersi rifugiare, quest’ultima può essere costruita in legno e posta al centro del terrario e può essere riscaldata se le temperature scendono al di sotto dei 20 °C.</p>	
Alimentazione	<p>In natura le iguane spendono poco più di due ore per alimentarsi, mentre nel resto del tempo sono per lo più inattive. Della dieta naturale si sa ancora poco, ma si pensa essere costituita per lo più da foglie, e in minima parte da fiori e frutti. In cattività viene in genere offerta una dieta erbivora, tale da garantire le richieste energetiche e nutrizionali; si possono alternare diverse qualità di foglie, offrendole ben mescolate per sfavorire la selezione. Tuttavia, le patologie nutrizionali rimangono comunque piuttosto frequenti in cattività. E’ possibile aggiungere degli integratori (in particolare carbonato di calcio), ma è spesso difficile controllarne l’effettivo consumo. In alternativa alla dieta casalinga, sono presenti in commercio alimenti preparati per iguane, anche se generalmente non soddisfano il completo fabbisogno dell’animale.</p>

**Tabella 5b. Tabella informativa sull’iguana comune. Bibliografia: Frye, 1995; Jacobson, 2003.**

## **Capitolo 2.   MEDICINA DEGLI ANIMALI ESOTICI**

Se un tempo il ruolo “principe” del medico veterinario era la gestione degli animali da produzione, oggi la maggior parte delle facoltà a livello mondiale ha subito una notevole flessione verso un maggior interesse anche nell’ambito degli animali da compagnia, più o meno consistente a seconda delle zone. La medicina degli animali esotici è invece una pratica ancora più giovane che, sebbene stia trovando spazio negli istituti statunitensi, britannici e del Nord Europa, è ancora molto limitata nelle aule italiane. Universalmente, però, se un tempo erano i veterinari di bovini, cani o gatti ad improvvisarsi in diagnosi e piani terapeutici anche delle specie non convenzionali, oggi la presenza dello specialista in animali esotici garantisce un buon livello di cure anche in questo settore. Fortunatamente, infatti, diversi testi e giornali scientifici indicizzati specializzati sono in grado di colmare le lacune lasciate dall’insegnamento attuale, e molte strutture in diverse parti del mondo mettono a disposizione la loro competenza e la loro casistica per il training di giovani studenti o neolaureati che vogliano intraprendere questa strada.

Anche in Italia, a seguito del grande aumento di questi animali nelle case degli italiani, e del loro riconoscimento a livello sociale, la conoscenza delle nozioni di base sulle specie più diffuse risulta utile a qualunque veterinario privato, per il quale non è più così infrequente la richiesta di visitare, ad esempio, un coniglio. A questo scopo, seminari e workshop sulla medicina di piccoli mammiferi, rettili e uccelli, sono costantemente organizzati all’interno di conferenze di aggiornamento sui piccoli animali e iniziano ad essere tenuti anche all’interno di molte università. Nel panorama veterinario europeo e italiano, stanno sorgendo specialisti che si occupano per la maggior parte, e in alcuni casi esclusivamente, di queste specie. Sebbene alcuni autori dimostrino maggiore interesse per alcune discipline (es. cardiologia, nefrologia etc.), la prima selezione si fa sul tipo di pazienti maggiormente trattati, con specializzazioni che arrivano ad essere separate per uccelli, rettili e piccoli mammiferi. A conferma di ciò vi è la suddivisione del college europeo di “Zoological Medicine”, fondato nel 1993 in merito alle specie aviarie e che comprende oggi cinque diverse specialità: oltre all’Avian Medicine, nel 2009 sono state istituite le aree Small Mammals Medicine, Herpetological Medicine, e Wildlife Population Health, mentre una nuova, Zoo Health Medicine, è nata nel 2012.

Una lista delle principali società veterinarie per animali esotici è presente nella Tabella 6.

MAMMIFERI	RETTILI	UCCELLI
SIVAE (ITA)		
AEMV (int)	ARAV (int)	AAV (int)
ECZM small mammals (EU)	ECZM reptiles (EU)	ECZM avian (EU)
ACZM (USA)		

**Tabella 6. Lista delle principali società per veterinari di animali esotici.**

Indipendentemente dalla specie, la medicina degli animali esotici presenta delle peculiarità rispetto alla pratica con i piccoli animali. A parte il furetto infatti, quasi tutte le specie esotiche si identificano come delle prede e sono pertanto evolute mascherando il più possibile i sintomi di malattia come strategia di sopravvivenza. Molti di questi animali (piccoli mammiferi e uccelli) presentano inoltre un metabolismo molto accelerato e un grado di stressabilità molto alto, con rischio di shock o autotraumatismo a seguito semplicemente della visita clinica. Pertanto è fondamentale una profonda conoscenza delle diverse specie per chi si avvicina a questo genere di pazienti. Bisogna infatti avere estrema padronanza della visita clinica in modo da limitare al massimo le manualità sugli animali, aumentando invece l'osservazione e l'anamnesi. La maggior parte delle patologie di questi animali può infatti essere correlata in maniera più o meno diretta ad errori nella gestione e nell'alimentazione dell'animale, spesso sottovalutati dal proprietario e pertanto non riportati in "prima battuta". Un buon veterinario per animali esotici deve dunque riuscire ad ottenere informazioni dettagliate dal cliente, e deve essere preparato a visite molto più lunghe rispetto a quelle di un cane ed un gatto. Aspetti base di alimentazione e gestione devono sempre essere presi in considerazione, sia per una migliore diagnosi sia come educazione del cliente, allo scopo di limitare i problemi di natura gestionale. Infine, è indispensabile essere consapevoli di come la semplice visita clinica sia in genere insufficiente per una corretta diagnosi, e debba poter essere in ogni caso supportata dalle principali tecniche di diagnostica per immagini e di laboratorio.

Proprio riguardo a queste particolari necessità, una clinica per animali esotici necessita di caratteristiche appropriate. Primo accorgimento imprescindibile è quello di possedere un ricovero dedicato per piccoli mammiferi, rettili e uccelli. Nel caso dei rettili il ricovero dovrà prevedere la presenza di terrari dotati di illuminazione e fonti di riscaldamento adeguate per riprodurre le condizioni di temperatura e umidità ideali per ciascuna specie ricoverata. Questo

fattore è da ritenersi indispensabile per il successo terapeutico. Oltre ai ricoveri, sarebbe opportuno prevedere anche aree separate a livello di sala d'attesa.

Nella cura degli animali esotici, le maggiori difficoltà si riscontrano a causa delle piccole dimensioni, per cui alcuni macchinari tarati per specie più grandi possono non risultare particolarmente sensibili in questi animali: come ad esempio le macchine per il monitoraggio anestesilogico e le apparecchiature radiografiche. Anche alcune preparazioni farmacologiche possono risultare troppo concentrate per l'utilizzo in animali molto piccoli, così come alcuni macchinari di analisi lavorano su quantità di sangue troppo elevate per essere prelevate in certe specie: a questo proposito la macchina VetScan dell'Abaxis è la maggiormente diffusa nella pratica degli animali esotici, lavorando su quantità di plasma pari a 0,1 ml e in grado anche di leggere campioni di 0,1 ml di sangue intero per ottenere un profilo biochimico completo.

A discapito del notevole sviluppo e perfezionamento della medicina degli animali esotici, recenti epidemie di monkeypox e SARS hanno rimarcato la necessità di una maggiore conoscenza delle malattie infettive anche delle specie più strane che vengono comunemente importate da paesi dell'est e vendute nei nostri negozi. Non necessitando di alcuna documentazione CITES, il commercio di alcuni animali è poco controllato e mal regolamentato con seri rischi epidemiologici di salute pubblica. E' dovere morale e professionale del veterinario di animali esotici essere sempre informato a questo riguardo, e preoccuparsi di elargire ai proprietari una corretta educazione sanitaria preventiva.

## 2.1 Contenimento, parametri fisiologici e profilassi delle specie di interesse

### Furetto

<b>Contenimento</b>			
<p>Il furetto è in genere un animale docile e la visita può essere effettuata senza assistenza. Tuttavia grazie alla sua vivacità e alla forma affusolata del corpo, il furetto è un maestro nel divincolarsi e non è sempre semplice il contenimento. I suoi mezzi di difesa comprendono morsi e graffi.</p>			
			
<p>Tenere il furetto sospeso per la collottola o sostenendolo sotto alle zampe anteriori è di solito un buon contenimento per l'auscultazione e la palpazione addominale</p>	<p>In furetti particolarmente agitati e combattivi è necessario un contenimento da parte di un secondo operatore, che mantenga il furetto contemporaneamente dalla collottola e dalle zampe posteriori, facendo attenzione a non distenderle con forza, operazione mal tollerata dal paziente.</p>	<p>Molti furetti si lasciano facilmente distrarre da preparazioni vitaminiche in pasta, che possono essere offerte al momento della prestazione per far accettare procedure cliniche quali vista, ecografia, iniezioni, etc..</p>	
<b>Parametri fisiologici</b>			
Temperatura rettale (°C)	38 – 39,5	Polso (bpm)	180-250
<b>Profilassi</b>			
Rabbia (dai 3 mesi, annuale)		Cimurro (dai 2 mesi, annuale)	

Tabella 7. Contenimento, parametri fisiologici e patologie che necessitano di profilassi nel furetto. Bibliografia: Quesenberry & Carpenter, 2012. Foto originali.

## Coniglio

<b>Contenimento</b>			
<p>Il contenimento del coniglio deve prevedere diverse attenzioni vista l'elevata stressabilità dell'animale ed il conseguente rischio di autotraumatismo alla colonna per movimenti improvvisi. Il supporto del quarto posteriore con una mano risulta fondamentale, a questo proposito si consiglia in genere di avvalersi della collaborazione di un secondo operatore per ridurre lo stress delle manipolazioni o, se possibile, di visitare il coniglio a terra su di un asciugamano. Per nessun motivo il coniglio deve essere afferrato per le orecchie.</p>			
			
<p>In assenza di un aiuto, è possibile utilizzare il proprio corpo per impedire al coniglio di girarsi o indietreggiare durante le manipolazioni.</p>	<p>Nei soggetti tranquilli può essere sufficiente per il contenimento, porre una mano sugli occhi, che minimizza lo stress dell'animale, e una mano sulla groppa a impedire l'indietreggiamento.</p>	<p>Durante l'ispezione del cavo orale un secondo operatore mantiene in posizione corretta l'animale praticando una lieve pressione a livello di zona lombare.</p>	
<b>Parametri fisiologici</b>			
Temperatura rettale (°C)	38,5 - 40	Polso (bpm)	130 - 325
<b>Profilassi</b>			
<p>Mixomatosi (dai 2 mesi, semestrale o annuale a seconda del tipo di vaccino)</p>		<p>MEV (malattia emorragica virale) (dai 2 mesi, semestrale o annuale a seconda del tipo di vaccino)</p>	

Tabella 8. Contenimento, parametri fisiologici e patologie che necessitano di profilassi nel coniglio. Bibliografia: Harcourt-Brown, 2004. Foto originali.

## Iguana

<b>Contenimento</b>			
<p>Generalmente le iguane tenute come pet diventano piuttosto docili con il proprietario e semplici da contenere. Tuttavia posseggono come armi di difesa le unghie, molto affilate e la coda. Esse possono inferire anche morsi molto dolorosi.</p>			
			
<p>Contenimento di un'iguana adulta: bloccare contemporaneamente il cinto pelvico e il cinto scapolare.</p>		<p>In caso di iguane poco gestibili, queste possono essere avvolte in un asciugamano, rendendo inoffensive le zampe e mantenendo la testa lontana dall'operatore.</p>	
<b>Parametri fisiologici</b>			
Temperatura rettale (°C)	dipendente dalla temperatura esterna	Polso (bpm)	40 - 70 a 24 °C
<b>Profilassi</b>			
nessuna			

Tabella 9. Contenimento, parametri fisiologici e patologie che necessitano di profilassi nell'iguana. Bibliografia: Frye, 1995; Jacobson, 2003. Foto originali.

## Capitolo 3.

### DIAGNOSTICA PER IMMAGINI NEGLI ANIMALI ESOTICI

La diagnostica per immagini rappresenta una tecnica molto importante negli animali esotici, dove l'esame obiettivo generale e l'anamnesi raramente sono in grado di offrire le informazioni necessarie ad ottenere una diagnosi. Le diverse tecniche radiografiche, ecografiche e altre tecniche tomografiche avanzate, come la Tomografia Computerizzata (TC) e la Risonanza Magnetica (RM) sono state inizialmente adattate a partire dalle metodiche comunemente usate nei piccoli animali e successivamente affinate in base alle esigenze particolari delle diverse specie.

Considerando la quantità di informazioni in grado di offrire, le applicazioni, i bassi costi e la minima invasività, la radiologia è la metodica diagnostica maggiormente utilizzata in tutte le specie esotiche. La maggior parte dell'attrezzatura radiologica standard può essere utilizzata anche per studi radiografici in pazienti non convenzionali. A causa delle dimensioni spesso ridotte, tuttavia, l'utilizzo di cassette e pellicole ad alta definizione garantisce un risultato migliore rispetto a sistemi schermo-pellicola in uso per specie convenzionali. A questo scopo vengono generalmente utilizzati sistemi schermo-pellicola da mammografia. Viste le dimensioni ridotte di diversi animali non convenzionali, nella maggior parte dei casi vengono eseguiti studi dell'intero corpo ("total body"). La proiezione laterale è di solito facilmente ottenibile, mentre il posizionamento in decubito dorsale può presentare alcune difficoltà e rappresentare fonte di stress: per questo è indicato in alcuni casi effettuare una proiezione dorsoventrale (anziché ventrodorsale). In alternativa si può procedere ad una leggera sedazione, che permette di massimizzare il risultato diminuendo rischi di autotraumatismo e shock da stress. Questo accorgimento è praticamente sempre necessario nei volatili, dove in generale il posizionamento è mal tollerato. Oltre all'esame radiografico dell'intero corpo del soggetto si possono eseguire studi specifici per le singole strutture corporee, importanti soprattutto nei conigli e nelle cavie allo scopo di indagare i denti e le bolle timpaniche, dove per ottenere un posizionamento corretto è necessaria la sedazione. Le proiezioni comunemente utilizzate nelle tartarughe sono invece tre: 1) dorsoventrale, 2) cranio-caudale (con raggio orizzontale) e 3) laterale (destra o sinistra). La proiezione dorsoventrale è utile ad ispezionare l'apparato muscolo-scheletrico e digerente, e le proiezioni cranio-caudale e laterale sono indispensabili per indagare i polmoni.

L'ecografia è un'altra modalità di immagine oggi particolarmente utilizzata in medicina veterinaria. I nuovi software e le sonde elettroniche ad alta frequenza consentono di ottenere studi anche di strutture molto piccole con un'ottima risoluzione spaziale: solitamente vengono utilizzate sonde microconvex con frequenza di 7-9 MHz e lineari con frequenza di 7,5-15 MHz a seconda delle dimensioni del soggetto e della struttura da studiare (Krautwald et al., 2011). L'utilizzo dell'ecografia, sebbene possibile in tutte le specie compresi rettili ed uccelli, risulta più agevole nei piccoli mammiferi vista la loro somiglianza anatomica con cane e gatto. Tuttavia, anche queste specie presentano delle caratteristiche peculiari che devono essere tenute in considerazione per non commettere errori grossolani. L'applicazione di questa tecnica a rettili ed uccelli richiede invece maggiore esperienza sia di ordine tecnico che anatomico. A differenza dell'esame radiografico, l'ecografia può essere effettuata senza sedazione anche negli uccelli, pur considerando le possibili conseguenze dello stress da manipolazione nelle specie più piccole (Krautwald et al., 2011).

Tomografia Computerizzata e Risonanza Magnetica che hanno, anche in queste specie, un grande valore diagnostico, vengono ancora scarsamente utilizzate a livello clinico principalmente per i costi ancora troppo elevati. L'utilizzo della TC è in notevole aumento, soprattutto nella medicina dei piccoli mammiferi, dove risulta una tecnica molto importante per l'indagine delle patologie dentali. Queste tecniche avanzate di diagnostica per immagini, così come l'ecografia, sono delle tecniche tomografiche. L'etimologia del termine tomografia deriva dal greco "tomos" cioè fetta, per cui sono modalità diagnostiche che studiano il corpo in tante fette e vengono così evitate le sovrapposizioni delle varie strutture anatomiche come nella radiologia tradizionale. Di contro, TC e RM necessitano di un'anestesia generale per il contenimento del soggetto. Nella medicina degli animali esotici la TC trova oggi maggiore applicazione rispetto alla RM, grazie anche alla possibilità di ottenere studi dell'intero corpo in pochi secondi. Ciò è favorito dai sistemi a elica o spirali e in particolare con le recenti tecnologie multistrato (Ohlert and Scharf, 2007); al contrario la RM richiede tempi di esecuzione molto lunghi con conseguente aumento del rischio anestesiológico.

### **3.1 Nuove tecniche di diagnostica per immagini: utilizzo del Mezzo di Contrasto (MDC)**

Negli ultimi decenni la diagnostica per immagini ha fatto grossi passi avanti, grazie all'avvento di nuove tecnologie in grado di aumentare la risoluzione e ridurre gli artefatti. Oltre a software e macchine sempre più sofisticati, l'introduzione dell'utilizzo dei mezzi di contrasto, sia in radiologia che in ecografia, ha permesso di aumentare le informazioni sulla vascolarizzazione e perfusione degli organi. In questo modo è possibile ottenere maggiori informazioni riguardo la localizzazione ed estensione della lesione, oltre a consentire una più appropriata prognosi e migliore piano terapeutico. Questo progresso sta oggi trovando larga applicazione anche in campo veterinario, con moltissime potenzialità anche nell'ambito delle specie esotiche.

#### **3.1.1 “Contrast Enhanced Ultrasounds” (CEUS)**

Il primo utilizzo di un mezzo di contrasto in corso di esame ecografico è avvenuto per caso più di 40 anni fa, quando bolle d'aria introdotte accidentalmente tramite catetere endovenoso di un paziente sono state nettamente distinte dall'ecografo (Gramiak and Shah, 1968). Successivamente, preparati di soluzione salina sterile agitata così da ottenere delle bolle di gas sono stati utilizzati come rudimentali mezzi di contrasto (Bokor, 2000). I difetti di questa preparazione erano dati essenzialmente dalla sua estrema instabilità, con tempi di visualizzazione insufficienti per eseguire tutte le valutazioni necessarie a ottenere uno studio diagnostico, e dalle grosse dimensioni (>50  $\mu\text{m}$ ), le quali non permettevano l'attraversamento del circolo polmonare, impedendo così un'importante applicazione a livello di cuore sinistro e miocardio, oltre che la diffusione del contrasto tramite la circolazione sistemica. Da quegli anni ad oggi studi del settore hanno portato allo sviluppo di mezzi di contrasto sempre più sofisticati, che rispondono alle esigenze di stabilità e permanenza a livello vascolare e che sono totalmente inerti per il paziente. Le microbolle che compongono i diversi agenti possono essere costituite da aria (agenti di prima generazione quali il Levovist® (Schering AG)) o da un altro gas inerte (agenti di seconda generazione quali Optison®, Definity® e Sonovue®) (Ohlerth and O'Brien, 2007). Un'altra differenza sostanziale tra queste due categorie è data dalle caratteristiche del così detto guscio di stabilizzazione, la cui elasticità negli agenti di seconda generazione garantisce un segnale più costante per intensità e durata. Attualmente, i mezzi di contrasto maggiormente utilizzati a livello mondiale appartengono a questa seconda categoria, e sono Definity® (Bristol Myers Squibb) negli Stati Uniti e Canada e Sonovue® (Bracco Pharmaceuticals) in Europa. Entrambi sono considerati sicuri sia in

medicina umana che veterinaria, a differenza dell'Optison® (Mallinckrodt, Inc.) il quale, contenendo albumina umana nella membrana esterna, presenta ovvie limitazioni in medicina veterinaria a causa del rischio immunologico (O'Brien and Holmes, 2007). Reazioni di tipo allergico sono state segnalate in letteratura a seguito del suo utilizzo nel cane (Yamaya and Niizeki, 2004). I mezzi di contrasto del futuro saranno quelli di terza generazione, caratterizzati da microbolle di aria o di perfluorocarburi, massimamente stabilizzate dalla presenza di una capsula rigida composta da polimeri (Ohlerth and O'Brien, 2007).

Il mezzo di contrasto può essere iniettato sia per via endovenosa che endoarteriosa, in bolo o per infusione, ed impiega 10-30 secondi per raggiungere i diversi organi attraverso la circolazione sistemica. Il gas verrà poi totalmente eliminato durante l'espiazione, mentre le componenti della membrana protettiva verranno filtrate a livello renale ed eliminate dal fegato (Ohlerth and O'Brien, 2007). Variazioni al normale comportamento intravascolare delle microbolle possono poi verificarsi a seconda delle caratteristiche del guscio utilizzato. Sebbene, infatti, i nuovi mezzi di contrasto furono primariamente progettati per essere "blood pool agents", e dunque per permanere all'interno dello spazio vascolare, per alcuni di essi è stata messa in evidenza, successivamente alla fase vascolare, una fase tardiva di evidenziazione a livello di fegato. Il meccanismo sottostante a questa specificità per il parenchima epatico è tutt'oggi ancora dibattuto e non del tutto chiarificato (Ohlerth and O'Brien, 2007). Le due ipotesi principali sono una fagocitosi da parte delle cellule del Kupffer (Yanagisawa et al., 2007) oppure un rallentamento meccanico a livello del complesso circolo sinusoidale (Kono et al., 2002). A seconda dei diversi mezzi di contrasto, l'una o l'altra ipotesi sono maggiormente accreditate. Dimensioni delle particelle, presenza di recettori di superficie e carica del guscio giocano un ruolo essenziale nell'eventuale fagocitosi da parte delle cellule del Kupffer, rendendo Sonazoid® e Levovist® più facilmente soggetti a questo evento rispetto ad Imavist® e Sonovue® (Yanagisawa et al., 2007). Inoltre, nel caso di Sonovist® (Schering AG, Berlin) e Nycomed® (Amersham, Oslo, Norway), l'ipotesi della fagocitosi è ulteriormente supportata dal loro ritrovamento all'interno delle cellule del Kupffer (Kono et al. 2002; Leen and Horgan, 2003). D'altro canto, per quanto riguarda il mezzo di contrasto Imavist®, uno studio microscopico sul suo comportamento a livello epatico, ha dimostrato come le bolle stazionarie siano omogeneamente diffuse, nonostante le cellule del Kupffer siano maggiormente concentrate nella zona periportale. Ciò supporta l'ipotesi che la fase di visualizzazione epatica tardiva sia conseguente, nel caso di questo agente, ad un "ingorgo" determinato dal rallentamento del flusso a livello sinusoidale, che diventa meno efficiente nel movimentare le particelle di contrasto (Kono et al., 2002).

Molti autori appoggiano questa ipotesi anche per Sonovue® (Leen and Horgan, 2003; Ohlerth and O'Brien, 2007). A prescindere dalla motivazione tecnica, la permanenza prolungata a livello sinusoidale garantisce una visualizzazione dettagliata: molti autori, infatti, si riferiscono a questa fase come alla fase sinusoidale (Ohlerth and O'Brien, 2007). Di conseguenza, i mezzi di contrasto dotati di questa particolarità sono ad oggi considerati dei marker dello spazio sinusoidale, in grado pertanto di classificare alcune lesioni epatiche come metastatiche in base alla mancata evidenziazione durante la fase tardiva, dovuta all'assenza dei sinusoidi; essi costituiscono pertanto i mezzi di contrasto di prima scelta nelle indagini del fegato (Kono et al., 2002; Leen and Horgan, 2003; Bleuzen et al., 2006; Nicolau et al., 2006). In aggiunta alla fase sinusoidale, uno studio avrebbe messo in evidenza come nel caso del Sonovue® esista anche una fase splenica, che perdurerebbe oltre le fasi vascolare ed epatica. Secondo gli autori, questo mezzo di contrasto sarebbe dunque caratterizzato da un tropismo selettivo per il parenchima splenico, a seguito di un meccanismo tuttavia non determinato, mentre nessuna affinità sarebbe presente con il parenchima epatico (Lim et al., 2004). Se questa ipotesi venisse confermata, Sonovue® assumerebbe un'importanza diagnostica nell'evidenziazione e caratterizzazione di lesioni spleniche di diversa natura.

In generale, il significato del CEUS è quello di indagare il grado e le caratteristiche della perfusione di organi, in generale, e di lesioni, in particolare. Non essendo il MDC in grado di diffondere attraverso l'endotelio, la sua visualizzazione ecografica si traduce in un'evidenziazione della vascolarizzazione nelle sue varie parti. La capacità di questi agenti di determinare un contrasto tra i tessuti studiati e quelli circostanti dipende dalla risposta non lineare all'interazione con gli ultrasuoni, con produzione di un segnale armonico quando risuona alla loro frequenza di risonanza (O'Brien and Holmes, 2007). In realtà, il comportamento delle microbolle una volta colpite dagli ultrasuoni è variabile, dipendente sia da fattori intrinseci quali il tipo di gas e le caratteristiche del guscio, ma soprattutto dal potere acustico dell'onda incidente. Potenza del sistema ecografico, frequenza e attenuazione dell'onda andando in profondità nei tessuti, sono tutte caratteristiche che influenzano il potere acustico. Tra queste l'indice meccanico (mechanical index - MI), che riflette la potenza dell'onda misurando il potenziale danno meccanico ai tessuti, viene regolato nel sistema per modificare il potere acustico. La risposta delle microbolle si caratterizza come lineare in caso di utilizzo di potenze acustiche molto basse ( $MI < 0,1$ ), mentre risulta di tipo armonico quando questa aumenta ( $0,1 < MI < 0,5$ ; 1-20 MHz), fino a distruzione delle microbolle per  $MI > 0,5$  (Ohlerth and O'Brien, 2007). Il fenomeno di rottura delle microbolle è stato storicamente sfruttato al fine di ottenere una rappresentazione istantanea della distribuzione nel tessuto o

organo dei mezzi di contrasto di prima generazione, i quali non erano altrimenti in grado di produrre segnali di ritorno sufficientemente potenti (Rossi, 2007). Questa tecnica, definita Emissione Acustica Stimolata (AES) o Flash Echo Imaging non consente un esame dinamico in tempo reale della struttura esaminata (Rossi, 2007), ed è stata pertanto abbandonata dopo l'avvento dei mezzi di contrasto di seconda generazione. Poiché MI molto basso ( $<0,1$ ) viene utilizzato solo dalle tecnologie Doppler, il comportamento lineare delle microbolle viene invece sfruttato unicamente per aumentare l'intensità degli echi di ritorno incrementando la visualizzazione del segnale Doppler; il mezzo di contrasto maggiormente implicato in questo tipo di studi è stato il Levovist® (O'Brien and Holmes, 2007; Rossi, 2007). Più frequentemente viene sfruttata l'emissione di onde armoniche e la capacità delle microbolle di risonare laddove i tessuti adiacenti non lo fanno, il che permette all'ecografo di costruire un'immagine specifica sul segnale del contrasto (Specchi, 2011). Al fine di aumentare ulteriormente la visualizzazione delle microbolle all'interno dei tessuti, sono state messe a punto diverse tecnologie in grado di captare selettivamente la risposta non lineare dei mezzi di contrasto e ridurre il più possibile gli artefatti (O'Brien and Holmes, 2007; Rossi, 2007). Tuttavia, a seguito della soppressione del segnale fondamentale tutti i tessuti non risonanti appaiono neri nello schermo, con la conseguente perdita di ogni riferimento anatomico. Ciò può obbligare l'operatore a cambiare più volte le impostazioni, passando dalla modalità fondamentale a quella armonica, con rottura delle bolle conseguentemente alla potenza acustica maggiore utilizzata di routine nella modalità standard (O'Brien and Holmes, 2007). Alcuni di questi sistemi, tra cui quello Esaote (CnTI System, Esaote, Genova, Italia), si basa sull'utilizzo di una stretta banda di ultrasuoni in uscita associata ad una selezione digitale del segnale di seconda armonica di ritorno. Ciò consente una ottima visualizzazione del MDC e l'efficace soppressione del segnale di fondo prodotto dal tessuto (Lencioni et al., 2002).

L'utilizzo del contrasto come supporto alla diagnostica fu inizialmente introdotto nel campo della cardiologia, soprattutto per la diagnosi di infarti cardiaci. Successivamente fu largamente impiegato in medicina umana per l'indagine di diversi organi parenchimatosi, con la maggior parte degli studi focalizzati sull'indagine del fegato (Piscaglia & Bolondi, 2006; Stewart and Sidhu, 2006). Le applicazioni epatiche del CEUS, ormai ben dettagliate e standardizzate, hanno oggi raggiunto i massimi livelli in medicina umana, assumendo valori diagnostici assimilabili o addirittura migliori rispetto a indagini più costose quali TC e RM per quanto riguarda ad esempio la determinazione e caratterizzazione di lesioni focali (Leen and Horgan, 2003; Bleuzen, 2006; Stewart and Sidhu, 2006; Trillaud et al., 2009). Altri organi indagati nell'uomo con questa tecnica comprendono milza, (Thorelius, 2004), reni

(Thorelius, 2004), pancreas (Thorelius, 2004), intestino (Thorelius, 2004; Serra et al., 2007; Jin-Mei et al., 2009), polmoni (Caremani et al., 2008), seno (Schroeder et al., 2003; Balleyguiera et al., 2009), muscoli (Thorelius, 2004), e cervello (Thorelius, 2004).

Solitamente studi preliminari in merito alla perfusione di organi sani tramite l'analisi di curve tempo-intensità vengono poi seguiti da lavori in merito alle variazioni in situazioni patologiche e, dunque, alle applicazioni cliniche. Attualmente, la principale applicazione clinica di questa tecnica è l'individuazione e la caratterizzazione di noduli e masse basandosi sul pattern perfusionale. Tuttavia, l'ecocontrastografia può essere potenzialmente applicata nell'individuazione di ogni tipo di lesione caratterizzata da vascolarizzazione e perfusione diversa rispetto al tessuto sano circostante, come nel caso delle lesioni neoplastiche, o da un apporto sanguigno marcatamente ridotto come nel caso di infarti, lacerazioni, necrosi o cisti non vascolarizzate (Thorelius, 2004). E' pertanto molto studiata l'applicazione del CEUS in traumatologia come parte del FAST scan (Focused Assessment Sonography in Trauma), durante il triage dopo trauma addominale contusivo, per valutare eventuali lesioni parenchimatose in milza, reni e fegato (Thorelius, 2004; Stewart and Sidhu, 2006). Altri studi suggeriscono l'utilizzo del CEUS per identificare i linfonodi sentinella di un tumore primario iniettando il contrasto per via sottocutanea (Stewart and Sidhu, 2006), per la diagnosi di occlusione delle tube (Exacoustos, et al., 2009), come coadiuvante alla RM nella diagnosi di sinoviti (Stewart and Sidhu, 2006), per identificare eventuali milze accessorie nella zona perisplenica (Görg & Bert, 2006). Infine, è molto attiva la ricerca in merito all'uso delle microbolle a scopo terapeutico, per la somministrazione intra-organo di farmaci, sostanze trombolitiche e sequenze di DNA all'interno della terapia genica (Unger et al., 2004; Liu et al., 2006; Stewart and Sidhu, 2006). Queste tecniche innovative si basano sull'introduzione di particolari sostanze all'interno delle microbolle, possibile grazie allo spazio determinato dalla bassa densità del gas che si trova all'interno del guscio protettivo (Unger et al., 2004), le quali vengono rilasciate nel sito desiderato sfruttando la rottura delle membrane a seguito dell'interazione con onde a  $MI > 0,5$  (Unger et al., 2004; Liu et al., 2006). Definity® e Optison® sono state finora implicate a questo scopo (Unger et al., 2004).

Sebbene i mezzi di contrasto non siano usati di routine nei pazienti veterinari, principalmente a causa dei costi, recentemente sono stati pubblicati diversi lavori sull'utilizzo del CEUS. Indagini diagnostiche sono state effettuate nel cane per quanto riguarda il fegato (Ziegler et al., 2003; Nyman et al., 2005; Ohlerth and O'Brien, 2007), la milza (Ohlerth and O'Brien, 2007; Ohlerth et al., 2007; Rossi et al. 2008 e 2010), i linfonodi (Ohlerth and O'Brien, 2007; Wang et al., 2010), la prostata (Russo et al. 2009, Bacci et al. 2010, Vignoli et al. 2011, Russo

et al. 2012), i tumori superficiali (Ohlerth and O'Brien, 2007), i reni (Wei et al., 2001; Haers et al. 2010), le surrenali (Pey et al. 2011) e nel gatto in reni (Webster and Holloway, 2008; Leinonen et al., 2011), pancreas (Ohlerth and O'Brien, 2007, Rademacher et al. 2008) e apparato gastroenterico (Diana et al. 2011), e nel corpo luteo ovarico nella specie ovina (Sboros, et al., 2011).

### **3.1.2 Tomografia Computerizzata (TC) con mezzo di contrasto**

La tomografia computerizzata è una tecnica di diagnostica per immagini avanzata che permette di ottenere la visualizzazione di sezioni seriali della zona presa in esame basandosi sull'elaborazione dei valori densitometrici ricavati dai coefficienti di assorbimento di un fascio di raggi X, utilizzando lo stesso principio della radiografia. La grande innovazione della TC è l'utilizzo di software di analisi correlati alla formazione delle immagini, che ha aperto la strada all'era delle immagini digitali.

Nel sistema tradizionale di tipo analogico i raggi X dopo aver interagito con i tessuti vanno ad impressionare un materiale sensibile determinando la formazione di un'immagine che riproduce il differente assorbimento delle radiazioni da parte dei tessuti stessi, dipendente dal loro numero atomico, dalla loro densità e dal loro spessore. Nella tecnologia digitale, invece, i dati relativi all'attenuazione del raggio X da parte dei tessuti vengono decodificati in forma numerica da parte di detettori. I fotoni che arrivano ai detettori generano impulsi elettrici che vengono poi codificati in forma numerica (conversione analogico-digitale); da qui il termine digitale, dall'inglese "digit", che significa numero. Dopodiché il computer provvede a ricostruire delle immagini in forma analogica (riconversione digitale-analogica) (Vignoli, 2005). Nel sistema TC i valori numerici dell'attenuazione del fascio sono definiti Hounsfield Units (HU), cioè consentono di valutare la densità dei vari tessuti. La TC è molto più sensibile della radiologia alle diverse densità, consentendo la differenziazione ad esempio di liquido e tessuti molli che la radiologia non può differenziare.

I sistemi TC sono sistemi tomografici, termine che deriva dal greco "tomos", che significa tagliare, e "gramma", che significa fetta. Questa tecnica diagnostica infatti prevede l'acquisizione di diverse immagini corrispondenti a una sottile sezione assiale del corpo. Ogni sezione è visualizzata in due dimensioni (pixel), sebbene corrisponda in realtà ad una porzione tridimensionale di tessuto (voxel); la terza dimensione è data dallo spessore della sezione stessa (Ohlerth and Scharf, 2007). Tanto più sottile è lo spessore della fetta e tanto maggiore è la risoluzione spaziale, per cui aumenta la possibilità di vedere delle piccole lesioni. La TC ha una risoluzione spaziale maggiore rispetto alla RM, la quale invece è superiore nella risoluzione di contrasto per i tessuti molli. Oltre alle immagini acquisite

direttamente, è possibile nella fase di “post processing” la ricostruzione multi planare o tridimensionale delle immagini grazie all'utilizzo di specifici software. Questo rende la TC superiore alla RM, che invece richiede l'acquisizione delle immagini in tutti i piani spaziali, aumentando notevolmente i tempi di acquisizione. Queste ricostruzioni tridimensionali risultano inoltre molto efficaci per la divulgazione scientifica e professionale, per l'insegnamento universitario e per la comunicazione con i proprietari di animali (Mackey et al., 2008).

La TC presenta due principali vantaggi rispetto alla radiologia classica: il primo è dato dalla possibilità di visualizzare l'anatomia degli organi interni senza la sovrapposizione con le strutture circostanti, superando i limiti dati dallo schiacciamento bidimensionale dell'immagine radiografica. Il secondo vantaggio dell'ottimizzazione digitale, è la capacità per il software di captare e rappresentare circa 4000 sfumature di grigio corrispondenti a diversi valori HU, rispetto alle 5 tonalità caratteristiche dell'RX convenzionale, come già accennato in precedenza. Sebbene l'uomo sia in genere in grado di distinguerne soltanto 20, l'operatore ha la possibilità di indagare uno specifico range di valori HU definito window (finestra), a seconda del tipo di tessuti che si vuole meglio visualizzare (Vignoli, 2005). Ciò garantisce una risoluzione di contrasto nettamente superiore nella TC rispetto alla comune tecnica radiografica.

I fattori limitanti che hanno ritardato l'utilizzo clinico nella routine veterinaria della TC rispetto alla medicina umana sono i costi molto maggiori rispetto alla radiologia e la necessità dell'anestesia generale. Sebbene i costi siano ancora piuttosto elevati, le moderne tecnologie a multistrato o multidetettore garantiscono un'acquisizione rapidissima dell'immagine, con diminuzione dei tempi di anestesia e, pertanto, dei rischi ad essa correlati (Ohlerth and Sharf, 2007; Mackey et al., 2008).

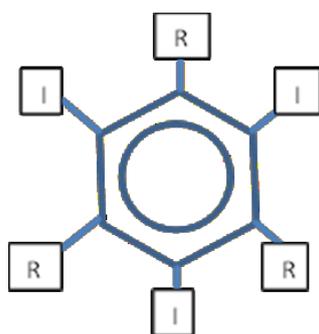
Correntemente, l'applicazione clinica di questa modalità diagnostica è pertanto in aumento anche in medicina veterinaria, soprattutto nei campi della neurologia, dell'oncologia, dell'ortopedia (Ohlerth and Scharf, 2007) e dell'odontostomatologia (Mackey et al., 2008).

Inoltre, questa tecnica è molto utilizzata in medicina veterinaria per lo studio in vivo di determinate strutture anatomiche, sia nella loro presentazione fisiologica che per quanto riguarda alterazioni patologiche. Ciò è vero sia negli animali convenzionali che negli animali esotici. I primi studi anatomici effettuati nei cani utilizzando la TC hanno riguardato il cranio, con particolare interesse alle strutture di naso, orbita e del sistema nervoso centrale (Ohlerth and Scharf, 2007; Puchalski, 2012). Per quanto riguarda invece gli esotici questa tecnica è stata utilizzata soprattutto per indagare la cavità orale di lagomorfi e roditori (Mackey et al.,

2008), il cranio dei pazienti aviari (Mackey et al., 2008), l'apparato scheletrico dei rettili in generale (Preziosi et al., 2007; Mackey et al., 2008), con particolare interesse nelle strutture craniche (Arencibia et al., 2006; Maisano et al., 2006; Rieppel, 2007; Valente et al., 2007; Banzato et al., 2012), e le strutture intracelomatiche in particolare dei cheloni, dove altre tecniche in vivo trovano enormi limitazioni conseguentemente alla presenza del carapace (Valente et al., 2007).

Come nella maggior parte delle tecniche diagnostiche, anche nella TC si è sviluppato l'uso di sostanze capaci di intensificare il contrasto tra i tessuti, in modo da studiare l'anatomia vascolare dell'area ed individuare e caratterizzare eventuali strutture patologiche. A questo scopo vengono utilizzati gli stessi contrasti positivi e negativi già testati per la radiologia classica, somministrati per via venosa, arteriosa o subaracnoidea. Per contrasto positivo si intende una sostanza che porta ad un aumento del valore di attenuazione, con conseguente visualizzazione tendente al bianco dei vasi e tessuti in cui si localizza. Il concetto fisico che sta alla base di questo risultato è la natura metallica dei mezzi di contrasto (MDC), caratterizzati da alta densità elettronica, da cui dipende direttamente l'attenuazione dei raggi X (Tidwell, 1999; Feltrin et al., 2004; Thomsen, 2006; Ohlerth and Scharf, 2007). Per MDC negativi, invece, si intendono quelle sostanze a bassa densità, come aria o anidride carbonica, che, al contrario, contrastano grazie alla riduzione di assorbimento indotta dalla loro presenza (Feltrin et al., 2004). Alcuni di questi, utilizzati nella tecnica CEUS, sono stati descritti nel precedente capitolo 3.1.1.

I MDC positivi sono quelli baritati e iodati, questi ultimi sono maggiormente utilizzati in TC (Dawson, 2004; Thomsen, 2006). In generale, lo iodio (I) rappresenta ad oggi l'elemento pesante che si ritrova con maggior frequenza nei moderni mezzi di contrasto, solitamente veicolato da un anello benzenico, il quale assicura legami chimici stabili con 3 atomi di I. Il complesso garantisce contemporaneamente un alto assorbimento dei raggi X e una bassa



tossicità (Feltrin et al., 2004). In realtà, sebbene tutti i MDC iodati presentino alla base questa stessa struttura, le proprietà fisico-chimiche e biologiche di ognuno dipendono dalle caratteristiche delle catene laterali, disponibili in posizione 1-3-5 dell'anello benzenico (Figura 1). Sono infatti queste ad essere state modificate nel tempo, ottenendo MDC sempre più performanti e con minori effetti collaterali.

**Figura 1.** Schema base dei mezzi di contrasto iodati. L'anello benzenico lega 3 atomi di Iodio in posizione 2-4-6 (I), da cui dipende il potere contrastografico del mezzo di contrasto, e 3 catene laterali in posizione 1-3-5 (R), da cui dipendono invece le caratteristiche fisico-chimiche e biologiche.

Il primo contrasto iniettabile utilizzato nella diagnostica radiografica è stato lo ioduro sodico (Ioduron®), dove lo iodio era utilizzato come sale. Questa sostanza, introdotta nella pratica clinica attorno al 1920, è stata in realtà poco utilizzata a causa della sua scarsa capacità di contrasto e dell'alta tossicità (Feltrin et al., 2004; Thomsen, 2006). L'anello benzenico è stato introdotto come veicolo solo successivamente, attorno agli anni '50, quando vennero messi a punto MDC caratterizzati da una migliore tolleranza, grazie alla proprietà di legarsi meno alle proteine nobili, ottenuta selezionando catene laterali con meno siti idrofobi, dove avvengono questi legami (Feltrin et. al, 2004; Thomsen, 2006). La caratteristica fondamentale di questa generazione di MDC è data però dall'elevata osmolarità, 5-8 volte superiore rispetto a quella plasmatica, per cui vengono definiti HOCA (High-Osmolarity Contrast Agent). Ciò è conseguente alla dissociazione elettrolitica di questi sali con produzione di due particelle ioniche (anione e catione) che richiamano molte molecole di acqua (Feltrin et al., 2004). Poiché gli effetti collaterali ancora presenti in queste soluzioni erano da imputarsi più a questa caratteristica di iperosmolarità che agli effetti chemiotossici, l'avvento dei LOCA (Low-Osmolarity Contrast Agent), attorno agli anni '70, ha rappresentato il secondo passo importante verso la costituzione di mezzi di contrasto più sicuri. Poiché l'osmolarità è direttamente proporzionale al numero delle particelle in soluzione, è stato possibile ottenerne l'abbassamento tramite la sintesi di prodotti che non si dissociassero, costituiti cioè da molecole non ioniche. A questo scopo il gruppo carbossilico COOH presente nei mezzi di contrasto HOCA in posizione 1 e salificato con Na<sup>+</sup> o metilglucamina, è stato sostituito da un'amide (CONH<sub>2</sub>). Si ottiene così una molecola a 3 atomi di Iodio in un'unica particella attiva, definita a ratio 3:1, mentre lo stesso monomero in forma ionica presentava i 3 ioni suddivisi in due particelle (ratio 3:2): in questo modo, il potere contrastografico aumenta a parità di particelle presenti in soluzione (3 I al posto di 1,5 I) e l'osmolarità è ridotta a circa 2 volte quella del sangue (Thomsen, 2006). Un'ulteriore evoluzione è stata l'intuizione della possibilità di diminuire l'osmolarità relativa degli HOCA aumentando il numero di atomi di Iodio presenti per singola molecola. Venne così sintetizzato lo ioxaglato, l'unico MDC ionico a bassa osmolarità. Questo dimero a 6 atomi di Iodio garantisce, seppur separandosi in due molecole ioniche in soluzione, 3 atomi di Iodio per singola molecola, risultando pertanto paragonabile ai monomeri LOCA non ionici (Feltrin et al., 2004; Thomsen, 2006). Tuttavia, nonostante la minore osmolarità, a questa molecola sono comunque legati gli effetti chemiotossici attribuibili alla presenza di cariche elettriche e di cationi di sodio o metilglucamina. I vantaggi pratici dimostrati dai MDC non ionici sono invece garantiti, oltre che dalla bassa osmolarità, dalla presenza di catene laterali idrofiliche, le quali determinano una ridotta tendenza a legarsi alle proteine, ad inibire gli enzimi e ad aderire alle membrane

cellulari alterandone la funzione (Feltrin et al., 2004). I contrasti dimerici non ionici furono finalmente introdotti nel 1980 a seguito dell'applicazione ai MDC non ionici dell'idea che stava alla base della sintesi dello ioxagato: l'osmolarità di questi contrasti è finalmente simile a quella del sangue, con conseguente aumento della tollerabilità da parte dell'organismo, e il potere contrastografico è raddoppiato, poiché ogni particella presenta ben 6 molecole di iodio. Nella Tabella 10 sono descritte le diverse classi di MDC attualmente disponibili, classificate a seconda del potere contrastografico, e dunque del numero di atomi di Iodio per singola molecola presente in soluzione. Si distinguono gli HOCA (monomeri Ionici), i dimeri Ionici, e i contrasti non ionici monomerici, entrambi in classe 3, e infine i LOCA dimerici (Feltrin et al., 2004; Thomsen, 2006).

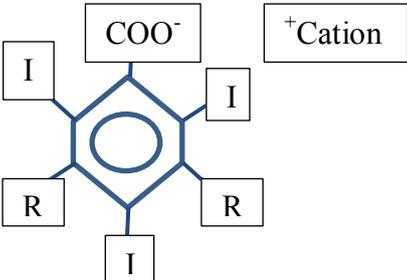
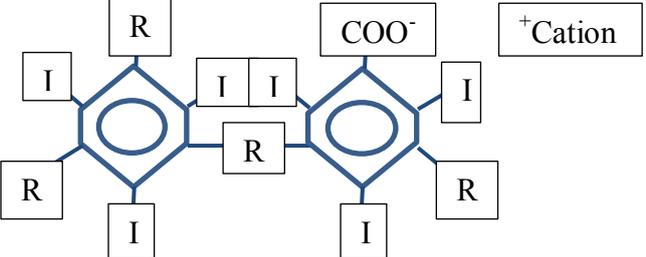
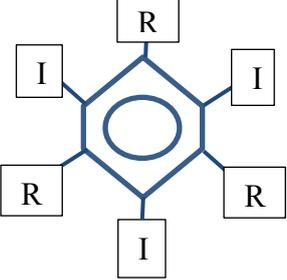
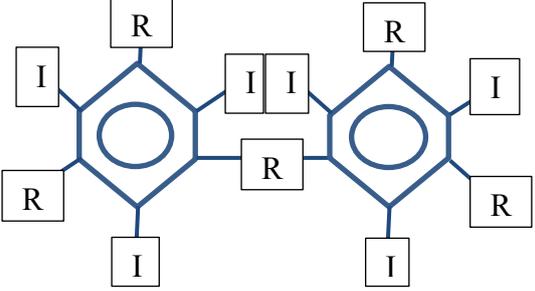
		Formula chimica	Ratio (I:n particelle)	classe
IONICI	HOCA Monomero		3:2	1,5
	Dimero (ioxagato)		6:2	3
NON IONICI	Monomero		3:1	
	Dimero		6:1	6

Tabella 10. Suddivisione in classe dei diversi MDC attualmente disponibili e relative descrizioni. I = atomo di iodio; R = catene laterali.

Oggi, i MDC non ionici sono in genere preferibili, conseguentemente alla minore incidenza di effetti collaterali. Tra questi si elencano le reazioni simil-anafilattiche o anafilattiche e gli effetti chemiotossici.

Le reazioni anafilattiche sono indipendenti dalla dose e totalmente imprevedibili. In genere compaiono entro 20 minuti e sono facilmente gestibili a livello ospedaliero (Thomsen, 2006). Gli altri effetti collaterali risultano invece legati alle caratteristiche fisico chimiche e biologiche del contrasto. Tra queste, quelle maggiormente implicate in effetti collaterali sono l'alta osmolarità, l'alta viscosità, l'alta idrofobicità, da cui dipende l'interazione con le proteine, e la lipofilità, che favorisce il contatto con le membrane: si ricorda che l'anello benzenico è di per sé una struttura lipofila pertanto nei moderni MDC questa viene protetta da catene laterali idrofile proiettate in tutte le direzioni (Feltrin et al., 2004). Queste reazioni sono in realtà ad oggi piuttosto rare, solitamente legate a pazienti debilitati (Thomsen, 2006). Tra queste, la conseguenza più grave alla somministrazione di MDC è data dalla riduzione della funzionalità renale, che corrisponde in realtà ad un aggravamento di una condizione di sofferenza renale preesistente, particolarmente grave in soggetti affetti da diabete mellito (Thomsen, 2006). La determinazione della funzionalità renale risulta pertanto un test preliminare fondamentale in caso di TC con contrasto. I soggetti affetti da diabete mellito non sono invece considerati soggetti a rischio in assenza di sofferenza renale (Thomsen, 2006). Sebbene i MDC non ionici siano caratterizzati da una minore nefrotossicità, non c'è ancora evidenza del fatto che i contrasti isotonici siano più sicuri rispetto a quelli a bassa osmolarità (Fleischmann and Kamaya, 2009).

Indipendentemente dalla classe di appartenenza, nessuno dei MDC utilizzati in radiologia (radiologia tradizionale e TC) è in realtà un vero e proprio marker vascolare, così come avviene invece per i MDC negativi utilizzati nel CEUS, poiché le sostanze iodate sono in grado di diffondere attraverso gli endoteli. Tuttavia, una volta iniettato a livello vascolare, il MDC iodato si accumula nel plasma e determina anch'esso un'opacizzazione dei vasi (vascular enhancement) (Feltrin et al., 2004), prima dell'aorta, e successivamente dei diversi settori arteriosi e venosi, con un lasso di tempo necessario per giungere al territorio di interesse. Questo tempo è definito tempo di transito del mezzo di contrasto (contrast medium transit time- tCMT). I parametri che condizionano maggiormente questo dato sono la dose di contrasto somministrata per unità di tempo e, pertanto, la velocità di somministrazione (ml/s), la concentrazione di iodio all'interno del MDC e la durata dell'iniezione in secondi. L'aumento della concentrazione ematica del MDC è a sua volta dipendente dalla velocità di somministrazione dello stesso e ne determina una diffusione per gradiente a livello del fluido

extracellulare compreso tra lo spazio interstiziale intra ed extravascolare (Feltrin et al., 2004; Thomsen, 2006; Fleischmann and Kamaya, 2009). Il MDC viene eliminato per ultrafiltrazione renale, dove pertanto abbiamo in assoluto il maggior “enhancement”. Mano a mano che la concentrazione plasmatica scende, il MDC inizia a diffondere nuovamente a livello vascolare, dove permane alcune ore fino a che non viene completamente eliminato (Feltrin et al., 2004). Diversi studi cinetici sono stati effettuati in pazienti sani umani e veterinari con lo scopo di ottenere dati sul normale comportamento del contrasto nei diversi organi. In genere sono sempre evidenti tre fasi successive di opacizzazione: la fase vascolare primaria, la fase parenchimatosa, e la fase vascolare secondaria, durante l’eliminazione del MDC. La fase vascolare è determinata dalla quantità di MDC presente a livello di circolo ematico (pool vascolare), la cui visualizzazione permette di ottenere un tracciato delle strutture vascolari maggiori, nonché di valutare la minore o maggiore vascolarizzazione di strutture contigue, sia patologica che fisiologica, ad esempio nel caso di corticale e midollare renali (Feltrin et al., 2004). La fase parenchimatosa deriva da un accumulo del contrasto (pool di diffusione) a livello di parenchimi, conseguentemente ad una componente liquida extracellulare più elevata rispetto, ad esempio, ai tessuti connettivali (Feltrin et al., 2004). L’enhancement d’organo non deriva più dall’opacizzazione dei vasi, bensì dalla distribuzione del MDC a livello di interstizio, direttamente proporzionale alla quantità del contrasto, ed inversamente proporzionale al peso del paziente, poiché correlato alla superficie extravascolare presente (Fleischmann and Kamaya, 2009). Gli studi di tipo non vascolare analizzano il grado e la modalità di opacizzazione degli organi durante questa fase.

La TC con contrasto viene oggi applicata nella pratica veterinaria in numerosi ambiti, tra i quali l’oncologia, la neurologia, l’ortopedia, il sistema vascolare (angio-TC), ecc.. In particolare, l’esame TC è ritenuto il “gold standard” in oncologia, sia per le informazioni che può dare sulla lesione primaria (sede, dimensione, estensione), sia per la ricerca delle lesioni secondarie (metastasi). L’evidenziazione di masse tumorali è infatti possibile sia durante la fase vascolare che parenchimatosa, caratterizzate entrambe da alterazioni nella diffusione del contrasto e dunque dell’enhancement rispetto al tessuto circostante (Feltrin et al., 2004). Questa tecnica risulta particolarmente importante in organi in cui le lesioni tumorali hanno normalmente minima variazione di attenuazione rispetto al parenchima normale. Ciò avviene ad esempio a livello epatico (Baron, 1994), mentre le masse spleniche maligne hanno valori di attenuazione significativamente minori rispetto alle masse spleniche non maligne, sia nelle immagini pre e post contrasto (Ohlerth and Scharf, 2007).

Tuttavia, non tutte le neoplasie si comportano allo stesso modo. Gli studi dinamici in pazienti sani risultano pertanto un prerequisito necessario per stabilire il tipo di perfusione normale di un organo e potere diagnosticare le conseguenti variazioni come patologiche. In questo modo è possibile stabilire protocolli di studio standardizzati che consentono di ottenere una corretta diagnosi ed informazioni cliniche per specifiche patologie.

Il maggior numero di studi dinamici sulla vascolarizzazione visualizzata tramite TC con contrasto sono stati effettuati a livello epatico.

Il fegato presenta una doppia vascolarizzazione, peculiarità anatomica che rende necessario uno studio approfondito dei soggetti normali per ottenere normali parametri fisiologici. Per quanto riguarda il cane uno studio ha determinato le fasi arteriosa e portale, con un tempo di comparsa medio del contrasto a livello di aorta addominale craniale di 8,6 secondi, a livello di arteria epatica 0,4 secondi dopo e a livello di vena porta di 14,6 secondi, 6 secondi dopo l'aorta. Il picco calcolato per l'aorta era a 12 secondi, mentre a 33 secondi nel caso del fegato (Zwingenberger and Schwarz, 2004).

Nessuno studio simile è stato trovato in bibliografia in merito ad altre specie animali.

## **PARTE SPERIMENTALE**



## Capitolo 4.

## PREMESSA

### 4.1 Il fegato: fisiologia e patologia nelle specie di interesse

#### 4.1.1 Furetto

##### *Anatomia*

Il fegato è localizzato a livello di ipocondrio, a diretto contatto con il diaframma. Le sue dimensioni sono piuttosto ampie, costituendo il 4,3% del peso vivo, contro il 3,4% registrato per il cane. La superficie è divisa in 6 lobi: il lobo destro e il lobo sinistro sono suddivisi in lobi mediali e laterali, mentre centralmente sono presenti il lobo quadrato, il quale va a coprire la cistifellea, e il lobo caudato (Quesenberry and Carpenter, 2012).

##### *Fisiologia*

Nel furetto il fegato svolge le stesse funzioni metaboliche, omeostatiche, di produzione delle proteine e di detossificazione che svolge negli altri mammiferi. Rispetto ad altre specie il sistema biliare del furetto è controllato dalla stimolazione vagale. La colecistochinina è un enzima presente a livello di tratto gastroenterico che induce la contrazione della cistifellea, con conseguente inibizione dello svuotamento gastrico e stimolazione alla motilità intestinale per azione diretta sulla muscolatura liscia (Johnson-Delaney, 2005 ).

##### *Cenni di Patologia*

Le patologie epatiche sono piuttosto frequenti in questa specie, anche se spesso rimangono subcliniche: le forme più frequenti comprendono le epatiti, le epatosi e l'associazione delle due (Lewington, 2007).

I patogeni responsabili delle epatiti giungono al fegato per lo più per via ascendente tramite la vena porta e rappresentano pertanto la complicità di forme infettive gastroenteriche come L'Inflammatory Bowel Disease (IBD) o altre forme croniche come l'enterite da Coronavirus (Lewington, 2007). L'infiammazione è di solito di tipo linfocitario ed è accompagnata da patologia anche a livello biliare (Quesenberry and Carpenter, 2012). In letteratura è riportato come anche forme patologiche più gravi quali l'epatite suppurativa, rappresentino nel furetto una complicità di questa malattia piuttosto frequente.

L'epatosi più comune è l'epatopatia vacuolare secondaria a patologie surrenaliche o alla somministrazione di cortisone.

Forme neoplastiche sono segnalate, ma meno comuni rispetto alle forme infiammatorie e degenerative, per lo più di origine metastatica da tumori surrenalici o linfomi. La diffusione è

frequentemente ematogena, ma il lobo caudato del fegato può essere coinvolto per contatto con adenocarcinomi della ghiandola surrenale destra. Neoplasie primarie del fegato sono rare, comprendendo l'epatocarcinoma, il quale può coinvolgere sia il parenchima che le vie biliari, l'emangiosarcoma e l'epatoma. Caratteristica peculiare dell'epatoma nel furetto è l'induzione di uno stato di ipoglicemia fino a 40 mg/dl, che lo pone in diagnosi differenziale con l'insulinoma, patologia in realtà molto più frequente in questa specie. I tumori di tipo metastatico si presentano per lo più come masse multiple di colorazione pallida, a differenza delle neoplasie primarie, le quali assumono di solito una tonalità più scura, meno differenziata rispetto al parenchima normale.

Il riscontro di cisti epatiche singole o multiple è piuttosto frequente in questa specie. Queste strutture si identificano comunemente come cistadenomi benigni e solitamente non causano problemi al paziente; tuttavia, limitazioni alla funzionalità epatica possono comunque derivare dalla sostituzione massiva di parenchima sano qualora il numero e le dimensioni fossero particolarmente elevati.

Rispetto ad altre specie di animali esotici (coniglio, rettili), il furetto è meno propenso allo sviluppo di lipidosi epatica. Tuttavia, è possibile che questa forma degenerativa possa colpire soggetti anziani con patologie gastrointestinali acute che portino a perdita di peso massiva; forme croniche di epatite linfocitaria e obesità sono fattori predisponenti.

La cirrosi rappresenta lo stadio finale delle patologie epatiche, ed è un reperto piuttosto raro in questa specie (Lewington, 2007).

Rari casi di intossicazione da rame sono stati segnalati (Quesenberry & Carpenter, 2012).

### *Diagnostica*

La maggior parte delle patologie epatiche hanno carattere subclinico nel furetto, per cui la diagnosi a volte è di tipo accidentale a seguito del riscontro di alterazioni nell'esame emato-biochimico di routine. Tuttavia, nei casi in cui la patologia sia concomitante a infezioni a livello gastroenterico, alcuni sintomi clinici possono essere evidenti, tra cui letargia, anoressia, perdita di peso, vomito e diarrea; ragionevolmente però, tale riscontro è da associarsi maggiormente alla componente gastrointestinale. Sintomi clinici anche drammatici sono invece associati a forme patologiche più gravi a carattere suppurativo o neoplastico.

L'ittero è un reperto di difficile riscontro nei furetti, poiché un colore giallastro della pelle si può presentare anche in furetti sani conseguentemente alle secrezioni sebacee. Le zone migliori per evidenziare un eventuale ittero sono date da orecchie, naso e bocca ma, soprattutto, dal siero (Lewington, 2007).

➤ Esame Emocromocitometrico

Forme infiammatorie/infettive sono solitamente accompagnate da leucocitosi. Le epatiti sono per lo più a carattere linfocitario, mentre neutrofilia si può presentare in caso di epatite suppurativa.

➤ Esame Emato-biochimico

ALT: Insieme alle GGT rappresenta l'enzima più utile nell'indagine di patologie epato-biliari nel furetto. Innalzamenti leggeri si riscontrano in corso di epatite, più rilevanti in caso di associazione con l'epatopatia vacuolare. Patologie gravi determinano invece un rapido ed elevato aumento dell'attività di questo enzima.

AST: L'innalzamento di questo enzima risulta poco sensibile per la diagnosi di patologia epatica del furetto. Inoltre livelli elevati di AST si ritrovano anche a livello muscolare, rendendolo pertanto poco specifico per il fegato. Innalzamenti elevati si possono infatti verificare anche in caso di danno muscolare legato, ad esempio, a perdite di peso rilevanti. In questo caso, tuttavia, può essere di aiuto indagare un aumento concomitante dell'attività della CK, nonché paragonare l'innalzamento dell'AST con quello dell'ALT, solitamente più rapido e rilevante in caso di patologia epatica.

ALP: Similmente all'AST, questo parametro risulta poco sensibile per la diagnosi di patologia epatica del furetto. Innalzamenti di questo valore si verificano solitamente solo a seguito di patologie gravi a carattere suppurativo o neoplastico.

GGT: innalzamenti di questo valore si verificano frequentemente in corso di stasi biliare o di epatite, maggiormente rilevati se sono coinvolte anche le vie biliari.

Bilirubina: La sensibilità di questo parametro è piuttosto bassa, con innalzamenti rilevabili solamente a seguito di patologie gravi a carattere suppurativo o neoplastico. Ciò è in parte dovuto alla clearance renale rapida ed efficace di questo enzima. Inoltre, è importante considerare come aumenti anche importanti possono essere correlabili a fenomeni di emolisi del campione.

Alti livelli di globuline possono riscontrarsi in corso di patologia infiammatoria, particolarmente se associata a infiammazione concomitante del tratto intestinale.

Uno stato di ipoglicemia fino a 40 mg/dl può riscontrarsi in corso di epatoma.

➤ Esami delle urine

Conseguentemente alla clearance rapida ed efficace della bilirubina, il riscontro di bilirubinuria è più frequente rispetto all'iperbilirubinemia. Già alla valutazione visiva, l'urina si può presentare gialla carica fino a verde (Lewington, 2007).

### ➤ Esame Radiografico

Normalmente l'ombra epatica è localizzata a livello di ipocondrio senza superare l'arco costale. Lo studio radiografico permette di valutare la silhouette epatica, evidenziandone aumenti di volume o un'eventuale presenza di masse. Ciò risulta importante per l'individuazione di forme patologiche quali la lipidosi epatica, caratterizzate da scarsa sintomatologia clinica, lieve o nessuna influenza nei parametri epatici e in cui l'epatomegalia rappresenta pertanto l'unico reperto riscontrabile. Cisti epatiche benigne possono essere messe in evidenza e devono essere poste in diagnosi differenziale con forme neoplastiche o infiammatorie.

### ➤ Esame Ecografico

Grazie alla minima invasività e ai costi contenuti, l'ecografia sta trovando sempre più spazio nella medicina degli animali esotici. Il fegato è un organo facilmente approcciabile nel furetto e può essere indagato per quanto riguarda dimensioni, forma ed ecogenicità che è solitamente minore rispetto a quella della milza. Della colecisti si possono inoltre visualizzare eventuali ispessimenti della parete, oltre che presenza di materiale all'interno del lume.

Epatomegalie, identificabili dall'arrotondamento dei margini, possono essere indicative di lipidosi epatica, neoplasia, ematoma, ascesso, granuloma, e altre patologie da accumulo, mentre la cirrosi è caratterizzata per lo più da un calo delle dimensioni complessive (Lewington, 2007). L'ascite è solitamente riscontrata in corso di epatomegalia e di cirrosi, ed è più facilmente individuabile ai poli renali e tra i lobi epatici (Krautwald et al., 2011).

Una modificazione diffusa nell'ecogenicità può essere causata da congestione epatica o da infiltrato neoplastico (leucemia, linfoma).

Neoformazioni anche di piccole dimensioni possono essere messe in evidenza in corso di esame ecografico, con caratteristiche di ipo o iperecogenicità: cisti, neoplasie, ascessi e granulomi devono essere messi in diagnosi differenziale, a seconda delle caratteristiche ecografiche, cliniche e dei risultati degli altri test diagnostici.

La dilatazione dei vasi è un reperto comune in caso di patologie cardiache, e nei casi estremi il fegato può apparire quasi cistico (Lewington, 2007).

### ➤ TC e RM

Queste tecniche avanzate sono ancora limitate nella pratica clinica, principalmente a causa dei costi più elevati e della scarsa disponibilità. Studi recenti stanno tuttavia mettendo in evidenza le potenzialità di questa diagnostica anche negli animali esotici. Rispetto alla TC, l'utilizzo della RM è ulteriormente limitato dai lunghi tempi anestesiológicos necessari.

#### ➤ Esame Istologico

L'istologia rappresenta il metodo diagnostico più affidabile per la diagnosi di patologia epatica nel furetto. Nel caso di molte patologie, infatti, la diagnosi certa è soltanto di tipo istologico: è il caso dell'epatopatia vacuolare, della lipidosi e della cirrosi epatica (Lewington, 2007). Sebbene valori particolarmente elevati di ALT possano far propendere il sospetto verso un'epatite di tipo suppurativo, mentre uno spostamento lieve è maggiormente indicativo di epatite linfocitaria, la differenziazione tra queste due patologie è, ancora una volta, soltanto di tipo istologico. Inoltre, in caso di sospetto/diagnosi definitiva di una di queste due forme patologiche, un'enterite sottostante deve essere sempre presa in considerazione, per cui campioni biotici dovrebbero essere prelevati anche a questo livello. I campioni biotici possono essere prelevati per via eco-guidata o tramite laparoscopia/laparotomia. Di contro, gli esiti dell'ago aspirato risultano spesso non diagnostici (Lewington, 2007).

#### **4.1.2 Coniglio**

##### *Anatomia*

Il fegato del coniglio ha caratteristiche macro e microscopiche simili agli altri mammiferi, è posto a livello ipocondriale, totalmente inserito all'interno della gabbia toracica ed è suddiviso in sei lobi. La separazione tra lobo destro e sinistro è determinata da una profonda incisura mediana: ognuno dei due lobi principali è poi diviso in un lobo laterale e uno mediale; a destra sono inoltre presenti anche un piccolo lobo quadrato e il lobo caudato, proiettato dorsalmente verso il rene destro (Meredith and Rayment, 2000; Sohn and Couto, 2012). Quest'ultimo presenta un piccolo legamento che lo collega dorsalmente alla regione dell'ilo: torsioni del lobo caudato sono riportate in caso di rottura di questo legamento (Meredith and Rayment, 2000; Quesenberry and Carpenter, 2012; Sohn and Couto, 2012).

La cistifellea è localizzata tra il lobo mediale destro e il lobo quadrato. Il dotto biliare sbocca nella porzione prossimale del duodeno, distalmente al piloro, tramite un'apertura separata rispetto al dotto pancreatico (Meredith and Rayment, 2000; Quesenberry and Carpenter, 2012; Sohn and Couto, 2012). Istologicamente la struttura epatica è quella tipica dei mammiferi, con difficoltà di visualizzazione dello spazio perisinusoidale rispetto, ad esempio, all'uomo (Sohn and Couto, 2012).

### *Fisiologia*

Nel coniglio il fegato svolge le stesse funzioni metaboliche, omeostatiche, di produzione delle proteine e di detossificazione che svolge negli altri mammiferi.

Particolarità di questa specie è la produzione massiva di bile, fino a 7 volte maggiore rispetto ad un cane, intesa come millilitri di bile prodotti per kilogrammo di peso vivo (Sohn and Couto, 2012). Il contenuto di bilirubina nella bile è tuttavia molto ridotto in questa specie la quale, similmente alla maggior parte dei non-mammiferi, secerne per lo più biliverdina (Quesenberry and Carpenter, 2012; Sohn and Couto, 2012). Circa il 25 – 50% dei conigli produce delle atropinasi che vengono liberate con la bile, inibendo l'atropina, che può pertanto risultare poco efficace in alcuni soggetti (Sohn and Couto, 2012).

### *Cenni di Patologia*

A parte la lipidosi epatica, conseguenza comune dell'anoressia prolungata nella stasi gastrointestinale (Harcourt-Brown, 2004; Reusch, 2005), le patologie epatiche del coniglio sono per lo più di ordine infettivo. La malattia emorragica virale (MEV) è una patologia virale ad alta morbilità e mortalità (quasi il 100%) che risparmia solo soggetti di meno di due mesi. E' determinata da un calicivirus che replica attivamente a livello epatico, determinando necrosi severa e morte per CID. La patologia è iperacuta (Meredith and Rayment, 2000; Quesenberry and Carpenter, 2012). Un altro agente infettivo tipico del coniglio è dato dai coccidi, tra cui *Eimeria stiedae* ha tropismo epatico e può essere fatale soprattutto nei giovani (Quesenberry and Carpenter, 2012). Altre forme parassitarie che si possono riscontrare sono le infestazioni da *Taenia cystneros*, *Toxoplasma gondii* e *Fasciola hepatica* (Meredith and Rayment, 2000). Colibacillosi, salmonellosi, listeriosi, tubercolosi, ed epatiti da *Pasteurella multocida* e *Clostridium piliformis*, rappresentano altre forme batteriche di infezione epatica nel coniglio (Meredith and Rayment, 2000). In particolare l'infezione da parte di *Pasteurella multocida* porta allo sviluppo di ascessi epatici. Come nelle altre sedi, queste lesioni rispondono poco al trattamento antibiotico, a causa della natura solida del pus del coniglio, e richiedono pertanto escissione chirurgica (Meredith and Rayment, 2000). Le spore di *Clostridium piliformis* sono invece le responsabili della Tyzzer Disease, malattia a carattere iperacuto, alta morbilità e mortalità caratterizzata da necrosi a livello epatico, miocardico ed enterico (Meredith and Rayment, 2000). Le aflatossicosi sono segnalate in animali nutriti con fieno di scarsa qualità (Meredith and Rayment, 2000; Melillo, 2007).

La lipidosi epatica è descritta come accumulo anormale di grasso a livello di epatociti. Questa forma degenerativa si può presentare in tutte le specie a seguito di anoressia prolungata; tuttavia, essa risulta particolarmente importante negli erbivori, dove il controllo endocrino

dello stoccaggio e mobilitazione dei nutrienti non è così importante come nei carnivori, nei quali, alimentandosi solo periodicamente, il loro livello risulta fluttuante (Harcourt-Brown, 2004). Nei conigli il glucosio è prodotto durante le fermentazioni a livello gastrico, è incluso nel ciecotrofo e viene riassorbito nel piccolo intestino durante la digestione dello stesso. Il 40% della fonte energetica del coniglio è tuttavia rappresentata dagli acidi grassi volatili, i quali vengono sintetizzati a livello ciecale a partire dal glucosio, a seguito delle fermentazioni batteriche. La loro concentrazione a livello arterioso è mantenuta costante dal fegato. L'anoressia è caratterizzata da un calo repentino sia di glucosio che di acidi grassi volatili, con conseguente stimolo alla lipolisi e alla mobilitazione degli acidi grassi stoccati a livello di tessuto adiposo, i quali vengono trasportati a livello epatico per essere metabolizzati come fonte energetica. Ciò porta a lipidosi epatica per un effetto a “collo di bottiglia” e ad una situazione di chetoacidosi per produzione di corpi chetonici (Harcourt-Brown, 2004). Ogni condizione che porta ad anoressia è pertanto implicata nello sviluppo di questa forma degenerativa, comprese causa patologiche, dietetiche, e le varie forme di stress.

Diverse forme tumorali sono descritte a livello epatico. I tumori primari del parenchima sono piuttosto rari, con un solo segnalamento di emartoma e uno di emangiosarcoma (Tinkey et al., 2012); linfoma, adenoma del dotto biliare e carcinoma sono invece i tumori primari maggiormente segnalati a livello epatico (Meredith and Rayment, 2000; Tinkey et al., 2012). L'adenoma del dotto biliare è spesso riferito come cistadenoma, a causa dell'aspetto macroscopico caratterizzato dalla presenza di cisti multiple ripiene di fluido (Tinkey et al., 2012). Alcuni autori segnalano come infezioni da *Eimeria stiedae* possano rappresentare fattori predisponenti allo sviluppo di questo tipo di neoplasie (Quesenberry and Carpenter, 2012; Tinkey et al., 2012). Le forme tumorali metastatiche sono di solito a carattere miliare, soprattutto da adenocarcinomi uterini (Meredith and Rayment, 2000).

La torsione di lobi epatici è una situazione descritta con frequenza, in particolare per quanto riguarda il lobo caudato, ma riferita anche al lobo destro, al lobo quadrato e al lobo caudale sinistro (Quesenberry and Carpenter, 2012). La torsione può avere carattere acuto o cronico, con conseguenze patologiche differenti. Le torsioni acute progrediscono in genere in un periodo compreso tra le 12 e le 72 ore, portando a morte per shock. I sintomi clinici associati a questa patologia sono per lo più conseguenti al dolore addominale e allo shock, con grave depressione, ipotermia, e aumento del tempo di riempimento capillare; la sintomatologia è del tutto aspecifica anche in caso di carattere cronico della torsione (Quesenberry and Carpenter, 2012).

## *Diagnostica*

La diagnostica collaterale risulta spesso un mezzo necessario poiché, in qualità di animale preda, il coniglio tende spesso a mascherare la sintomatologia (Melillo, 2007). La presentazione clinica della patologia epatica è pertanto molto variabile, con sintomi aspecifici che vanno dall'abbattimento, all'anoressia, allo shock. All'esame obiettivo generale risulta particolarmente importante la palpazione, che può permettere l'apprezzamento di ingrossamenti d'organo e di masse, ascrivibili a neoformazioni o alla torsione di un lobo epatico (Quesenberry and Carpenter, 2012).

### ➤ Esame Emocromocitometrico

Il riscontro di uno stato anemico può risultare utile per la diagnosi di torsione di un lobo epatico, che può non portare a modificazioni negli enzimi epatici ed è difficilmente apprezzabile anche da un punto di vista ecografico e radiografico. Segni di CID, linfopenia ed un calo graduale delle piastrine si riscontrano in caso di MEV (Quesenberry and Carpenter, 2012).

### ➤ Esame Emato-biochimico

Anche se in questi ultimi anni si sono fatti molti passi avanti nello studio dei conigli da compagnia, è importante tenere presente come ad oggi la maggior parte dei dati esistenti in letteratura si riferisca ai conigli da laboratorio, appartenenti per lo più alla razza neozelandese e stabulati in ambienti controllati (Melillo, 2007; Marshall, 2008).

Sfortunatamente, nel coniglio non esistono enzimi specifici per il fegato, come nella maggior parte dei mammiferi. Questo è dovuto alla presenza massiva di enzimi epatici in altri distretti e all'emivita molto bassa (5 ore) della maggior parte di essi. Di seguito vengono comunque presi in esame i parametri normalmente valutati per l'indagine del fegato nei mammiferi.

**ALT:** Come per gli altri erbivori, questo enzima non è specifico per il fegato nel caso del coniglio. Alte concentrazioni si ritrovano invece a livello cardiaco. Inoltre, rispetto ai carnivori, l'emivita di questo enzima è di sole 5 ore contro 45 – 60 ore nel cane (Meredith and Rayment, 2000; Melillo, 2007). Questo enzima va tuttavia incontro a notevoli innalzamenti in caso di neoplasia epatica, coccidiosi o MEV (Washington and Hoosier, 2012).

**AST:** Allo stesso modo dell'ALT presenta emivita molto breve e non è considerato specifico per il fegato nel coniglio, in quanto presente in quantità elevate anche in cuore, muscoli, reni e pancreas (Melillo, 2007; Washington and Hoosier, 2012). Innalzamenti lievi possono inoltre conseguire ad anestesie con alotano o isoflorano, a contenimento eccessivo o ad emolisi del campione. Nonostante ciò, innalzamenti di questo valore si riscontrano anche in caso di patologie epatiche caratterizzate da necrosi epatocellulare (Meredith and Rayment, 2000) quali la coccidiosi e la MEV (Washington and Hoosier, 2012).

ALP: un aumento della fosfatasi alcalina è solitamente indicativo di stasi biliare, conseguente a coccidiosi, lipidosi epatica, ascessi epatici, neoplasia o torsione di un lobo epatico. Rispetto alla maggior parte dei mammiferi, il coniglio ha la particolarità di produrre tre diversi isoenzimi a livello epatico, renale e intestinale (Meredith and Rayment, 2000; Washington and Hoosier, 2012). Tuttavia, notevoli quantità di fosfatasi alcalina sono riscontrabili anche livello osseo, per cui un suo aumento può essere conseguente all'attività osteoblastica nei soggetti giovani o a patologie a carico dell'apparato scheletrico (Melillo, 2007).

LDH: la specificità epatica è a sua volta molto bassa. Innalzamenti anche notevoli possono riscontrarsi in caso di emolisi conseguentemente all'alta concentrazione di questo enzima a livello di globuli rossi (Washington and Hoosier, 2012).

GGT: questo parametro è un buon indicatore di patologia epatica cronica con conseguente stasi biliare in molti carnivori ed erbivori. La sua attività è tuttavia piuttosto bassa nel fegato del coniglio, per cui la sensibilità in caso di patologia è piuttosto bassa. Tuttavia, si tratta dell'unico parametro specifico per il fegato, in quanto la quota proveniente dal rene viene immediatamente eliminata con le urine (Melillo, 2007).

Bilirubina: comunemente utilizzata come marker di patologia epatica od emolisi. Nel coniglio la causa principale di iperbilirubinemia è l'ostruzione biliare, la quale può essere legata a coccidiosi, lipidosi epatica, neoplasia, aflatossicosi o torsione di un lobo epatico (Washington and Hoosier, 2012). E' tuttavia importante considerare come la bilirubina sia normalmente riscontrata in quantità molto basse, in quanto il coniglio secerne per la maggior parte biliverdina, la quale non viene calcolata negli esami biochimici standard (Meredith and Rayment, 2000; Quesenberry and Carpenter, 2012; Sohn and Couto, 2012; Washington and Hoosier, 2012). Da ciò deriva anche come l'ittero non rappresenti un parametro clinico di frequente riscontro in questa specie.

Acidi biliari: E' riportato in letteratura come, in corso di patologia epatica, il coniglio possa presentare livelli elevati persistenti di acidi biliari. Tuttavia, questo parametro è normalmente valutato nella sua oscillazione pre e post prandiale, esame non praticabile nel coniglio, dove il digiuno forzato è altamente sconsigliato.

In corso di patologia epatica si possono inoltre riscontrare abbassamenti nella glicemia e nelle proteine totali.

Un innalzamento delle globuline può invece essere indice di infezione da coronavirus (Washington and Hoosier, 2012).

Valori alti di glicemia in corso di anoressia possono invece essere considerati segno di lipidosi epatica, e si accompagnano a prognosi negativa (Melillo, 2007).

➤ Esame delle feci

Tale esame, di facile e veloce attuazione, deve sempre essere effettuato al fine di escludere eventuali parassitosi che possono agire a livello epatico, prima tra tutte la coccidiosi epatica, ma anche infestazioni da Fasciola epatica o tenie (Quesenberry and Carpenter, 2012).

➤ Esame Radiografico

Il fegato del coniglio forma un'ombra omogenea di radiopacità tissutale a livello di ipocondrio: il suo margine caudo-ventrale non dovrebbe in alcun modo fuoriuscire dall'arco costale (Pees et al., 2011). In generale la proiezione dell'ombra epatica al di fuori dell'arco costale può essere considerato diagnostico di epatomegalia, la quale può essere sospettata anche dal riscontro di uno spostamento dorsale dello stomaco e caudale di entrambi i reni (Rubel et al., 1992). Radiograficamente è inoltre possibile diagnosticare la presenza di masse epatiche, nelle proiezioni laterale, ventrodorsale o in entrambe.

Radiograficamente possono infine essere visualizzate ascite ed eventuali calcificazioni (Rubel et al., 1992; Meredith and Rayment, 2000; Capello and Lennox, 2008).

➤ Esame Ecografico

Il fegato risulta ipoecogeno rispetto alla milza, e la tessitura è omogenea. Le vene epatiche sono ben visualizzabili come strutture ipoecogene. La cistifellea può essere visualizzata alla destra della linea mediana. Nel coniglio la forma è frequentemente irregolare con ripiegamenti della parete che possono mimare la presenza di setti o raddoppiare lo spessore della parete. La visualizzazione ecografica del fegato garantisce la diagnosi di masse epatiche e di alterazioni marcate del parenchima (Reese, 2011)

In caso di coccidiosi epatica i dotti biliari risultano ecograficamente allargati e le pareti dei dotti biliari, normalmente non visualizzabili nel coniglio, diventano evidenti a causa di un loro ispessimento. E' poi presente un'alterazione complessiva dell'ecogenicità del parenchima .

La pseudotubercolosi deve essere considerata in diagnosi differenziale a seguito del riscontro ecografico di lesioni circolari iperecogene: ciò è particolarmente importante a causa del rischio zoonosico della suddetta patologia (Reese, 2011).

Un'iperecogenicità diffusa, anche rispetto al parenchima splenico, associata ad epatomegalia può essere indicativa di lipidosi epatica, anche se bisogna tenere sempre in considerazione l'eventuale obesità del paziente, che può rendere la diagnosi più difficoltosa (Reese, 2011). La conferma istopatologica è necessaria.

L'ascite è frequentemente associata all'epatomegalia, e può essere diagnosticata ecograficamente a livello di parete addominale, cranialmente ai reni e tra i lobi epatici (Meredith and Rayment, 2000; Reese, 2011). Presenza di liquido libero in peritoneo associato

a versamento pleurico può essere indicativo di torsione di un lobo epatico (Quesenberry and Carpenter, 2012).

Il riscontro di congestione venosa in corso di epatomegalia, può aiutare nella diagnosi di insufficienza cardiaca congestizia (Reese, 2011).

L'utilizzo della tecnica Doppler è consigliato per evidenziare un eventuale fenomeno di shunt portosistemico (Meredith and Rayment, 2000).

➤ TC e RM

Sebbene nuovi studi stiano aumentando la conoscenza in merito a queste tecniche e alle possibili applicazioni cliniche anche negli animali esotici, il loro uso è ancora limitato, in particolare per quanto riguarda la RM, dove ai costi elevati si aggiungono i lunghi tempi anestesiológicos necessari. Ad oggi, la TC è impiegata per lo più per la diagnosi di patologie dentali ed entrambe per lo studio del cranio in generale e del sistema nervoso centrale in particolare (Reese, 2011).

➤ Esame Endoscopico

Questa tecnica mini-invasiva può rappresentare un'alternativa alla laparoscopia, poiché permette la visualizzazione diretta del fegato in situ (Meredith and Rayment, 2000). Spesso, tuttavia, la presenza di ascite e la presenza massiva di grasso in animali obesi può limitarne l'utilità. Solitamente è utilizzato un approccio ventrale lungo la linea mediana (Meredith and Rayment, 2000).

➤ Esame Istologico e Citologico

Il prelievo di campioni cellulari o di tessuto attraverso l'ausilio della guida ecografica è fondamentale al fine di raggiungere una diagnosi certa (Krautwald et al., 2011). La laparotomia e la laparoscopia sono altre metodiche che consentono di prelevare tessuto per l'esame istopatologico (Meredith and Rayment, 2000), ma risultano più invasive. In caso di sospetto di insufficienza epatica è raccomandabile effettuare un esame completo della coagulazione prima della biopsia (Meredith and Rayment, 2000).

### **4.1.3 Iguana**

Gli studi specifici sul fegato dei rettili non sono molti, e generalmente non sono di carattere generale ma bensì mirati a rispondere ad alcune domande specifiche. In particolare sono stati indagati la funzionalità metabolica e il ruolo del fegato dei rettili nell'ottica dell'evoluzione degli organi nei vertebrati. Per quanto riguarda invece i dati disponibili in merito all'anatomia (in particolare microscopica) e alla fisiologia, essi sono spesso basati su osservazioni effettuate sui mammiferi e pertanto non sempre adeguati (Gans and Gaunt, 1998).

## *Anatomia*

Il fegato dei rettili è un organo molto grande, anche se peso e dimensioni possono variare durante l'anno in risposta ad adattamenti ambientali o a particolari condizioni fisiologiche. Il colore va dal marrone scuro al nero, e spesso sono visibili aree pigmentate corrispondenti a depositi di melanina (Hanley and Hernandez-Divers, 2003). La forma dipende nelle diverse specie dallo spazio disponibile in cavità celomatica, ed è delineata dai rapporti con gli organi circostanti: il fegato è lungo e assottigliato nei serpenti e in alcune lucertole, mentre è disposto trasversalmente nelle tartarughe ed in altre lucertole (Gans and Gaunt, 1998). Nell'iguana verde, esso occupa la metà craniale della cavità celomatica.

Generalmente è diviso in due lobi, la cui separazione può essere più o meno demarcata e tra cui il destro è generalmente più grande (Gans and Gaunt, 1998). Nell'iguana la demarcazione è piuttosto netta: il lobo sinistro, posto ventralmente allo stomaco, è in realtà più spesso e arrotondato, mentre il lobo destro è falciforme, e si estende caudalmente formando una sorta di "coda" che ingloba la vena cava caudale (Gans and Gaunt, 1998).

Nessun rettile è dotato di diaframma, tuttavia i coccodrilli presentano un setto, detto postepatico, che può essere considerato come una struttura omologa, dividendo le cavità pleurica da fegato e intestini e partecipando all'espiazione. Sebbene le lucertole non presentino questa struttura, esse sono dotate di una profonda piega renale che connette il fegato alla parete corporea, separando spazi pleurici e peritoneali (Gans and Gaunt, 1998).

Come in tutti i vertebrati, anche il fegato dei rettili è avvolto dalla glissoniana, una sottile capsula connettivale che si estende dall'ilo su tutta la sua superficie e si approfonda nel parenchima epatico tramite una trama di fibre collagene che circonda vasi e dotti biliari.

Nei rettili il sangue giunge al fegato dalla vena porta e dall'arteria epatica, allo stesso modo degli altri vertebrati. La vena porta è formata dalla congiunzione delle vene gastrica, gastrolienale e intestinali, e dalla vena addominale ventrale in alcune specie. Il lobo sinistro è generalmente vascolarizzato dal ramo principale, mentre una diramazione secondaria si porta al lobo destro. Il sangue proveniente dalla vena porta rappresenta circa i 2/3 dell'afflusso totale, e porta la quasi totalità dei nutrienti assorbiti, mentre dall'arteria epatica giunge quasi tutto l'ossigeno. La vena epatica è invece deputata al drenaggio del sangue dal fegato. Nei rettili il flusso delle vene epatiche più grandi è regolato da sfinteri posti a spirale, simili a quelli esistenti nei cani e nei mammiferi acquatici. Rami terminali tributari alle vene epatica e portale e all'arteria epatica sono sempre separati tra di loro, in modo che il sangue che entra nel fegato passi sempre attraverso il parenchima prima di uscirne, garantendo un'efficiente perfusione e filtrazione (Gans and Gaunt, 1998).

La maggior parte dei rettili presenta una cistifellea, la cui posizione è tuttavia variabile: nelle tartarughe, nei coccodrilli e nella maggior parte delle lucertole, tra cui l'iguana verde, essa è appoggiata sul lobo destro del fegato, mentre in altre lucertole e nella maggior parte dei serpenti è posta distante, collegata a fegato e intestino da un dotto cistico tramite cui è veicolata la bile (Slomka-McFarland, 2012).

Sebbene il parenchima epatico appaia come una massa continua di cellule, questo non risulta funzionalmente omogeneo. Istologicamente è possibile individuare anche in questi animali degli spazi portali costituiti dall'insieme di rami della vena porta e del dotto biliare, ma la loro distribuzione non è regolare e la suddivisione in lobuli ben conosciuta nei mammiferi non è così evidente. Microscopicamente gli epatociti sono organizzati attorno ai sinusoidi, delineati da cellule endoteliali, cellule stellate e melanomacrofagi. Queste cellule, che si pensa siano implicate nell'eliminazione dei radicali liberi, variano in densità a seconda della specie e dipendentemente dal singolo individuo e dallo stato di nutrizione (Gans and Gaunt, 1998).

### *Fisiologia*

Le funzioni del fegato dei rettili sono in realtà molto simili a quelle di mammiferi e uccelli, comprendendo il metabolismo di grassi, proteine e glicogeno, la produzione di bile, acido urico e dei fattori della coagulazione (Girling and Raiti, 2004; Mader, 2006); quest'organo interviene inoltre in molti processi omeostatici, tra cui, ad esempio, l'attivazione della vitamina D. Peculiarità di questi animali è invece l'estrema dipendenza di queste azioni da fattori sia intrinseci (età, sesso, momenti fisiologici particolari come ad esempio il digiuno, la vitellogenesi e, per le specie interessate, il letargo) che estrinseci (temperatura, stagione etc.). Un'altra sostanziale differenza è data dal metabolismo dei grassi: se, infatti, uccelli e mammiferi tendono ad accumulare grasso in sede sottocutanea allo scopo di termoregolazione, questo adattamento non è avvenuto nella storia evolutiva dei rettili, in quanto eterotermi. In questi animali le riserve lipidiche sono poste a livello di organi specifici, definiti corpi grassi, localizzati a livello di cavità celomatica caudo-ventrale, le cui funzioni sono lo stoccaggio di lipidi per la vitellogenesi e la riserva energetica per il letargo o il digiuno (Girling and Raiti, 2004; Mader, 2006).

### *Cenni di Patologia*

Indipendentemente dalla causa sottostante, la sofferenza e l'insufficienza epatica sono condizioni piuttosto subdole, per lo più a carattere cronico, caratterizzate da sintomi del tutto aspecifici come la riduzione progressiva di appetito, attività, fertilità e fecondità, la perdita di peso che porta nel tempo ad uno stato di cachessia, problemi legati al letargo e al risveglio, e cambiamenti nelle caratteristiche delle feci, sebbene la diarrea sia raramente presente a causa

dell'anoressia. Solitamente, inoltre, la patologia rimane silente, rendendosi clinicamente evidente in momenti di aumentata richiesta energetica, quali la vitellogenesi, il digiuno o, tipicamente, in corso di patologie concomitanti.

Le patologie epatiche maggiormente riscontrate nei rettili hanno origine infiammatoria (epatiti) o degenerativa (epatosi). Le epatiti possono essere associate ad agenti infettivi di natura batterica, virale, fungina o protozoaria, mentre le patologie degenerative sono per lo più di natura tossica (comprese tossine ambientali, chimici, alimentari, le aflatossine e l'ipervitaminosi A), o legati a stati di ipovitaminosi A o di accumulo lipidico (Girling and Raiti, 2004; Mader, 2006). Forme neoplastiche sono a loro volta segnalate (Girling and Raiti, 2004).

La lipidosi epatica è una patologia degenerativa a carico del fegato ben documentata in molte specie di rettili, dove viene frequentemente diagnosticata in sede autoptica. Tutt'oggi si hanno in realtà poche informazioni in merito alla sua patogenesi, così che questa malattia rimane una delle più malinterpretate e sottodiagnosticate sia dai clinici che dai patologi (Mader, 2006). La lipidosi epatica è caratterizzata dalla presenza di grasso a livello di epatociti. Il fatto che il deposito di grasso sia considerato normale per un certo grado in diverse specie, ad esempio come sostenimento durante la vitellogenesi o il letargo, rappresenta evidentemente la prima grossa difficoltà diagnostica. Per definire uno stato di lipidosi patologica, la quantità di grasso negli epatociti deve essere infatti considerata maggiore rispetto alle condizioni normali per quanto riguarda la specie, l'età, il sesso e la stagione. Questo aumento patologico sarebbe da relazionarsi a gestione inappropriata e problemi nutrizionali, sebbene non di rado sia associato ad altre condizioni patologiche a carattere cronico. Tra i fattori predisponenti sono inclusi errori gestionali quali una dieta eccessiva in grassi e deficiente in amminoacidi essenziali (carnitina, metionina e colina), un calo dell'attività fisica e la scarsa gestione del letargo, e condizioni patologiche quali obesità, digiuno prolungato, iperparatiroidismo, iperestrogenismo, e ipotiroidismo; è sospettata anche una certa predisposizione genetica (Girling and Raiti, 2004; Mader, 2006).

### *Diagnostica*

Sebbene le patologie epatiche siano abbastanza frequenti nei rettili, la loro diagnosi non è semplice. Ciò è da associarsi in particolare all'estrema dipendenza della funzionalità epatica da fattori intrinseci ed estrinseci, alla sintomatologia aspecifica e alla associazione frequente della patologia clinica a quegli stessi momenti fisiologici che influenzano normalmente la funzionalità epatica, rendendo difficile una differenziazione tra cambiamenti para-fisiologici e patologici.

Poiché la palpazione risulta una pratica piuttosto difficile in questi animali, conseguentemente allo spessore della cute e alle difficoltà nel contenimento, la diagnosi di solito si basa sulla diagnostica collaterale. Al fine di ottenere un quadro il più completo possibile, diverse tecniche possono essere associate tra di loro, tra cui esame ematobiochimico, radiografia, ecografia, tomografia computerizzata, risonanza magnetica ed endoscopia.

Sebbene non invasiva o minimamente invasiva, questo tipo di diagnostica risulta molto utile per indagare le condizioni del fegato, ma raramente è in grado di fornire una diagnosi definitiva (Mader, 2006). La tecnica maggiormente affidabile rimane l'esame istologico. Se ciò in passato voleva dire che la maggior parte delle diagnosi di patologia epatica erano effettuate *post mortem*, ad oggi nuove tecniche biotiche permettono di ottenere campioni istologici sempre con maggior sicurezza. Tale tecnica, ovviamente, necessita però di un'anestesia generale, e risulta notevolmente più invasiva rispetto alla diagnostica per immagini.

#### ➤ Esame Emato-biochimico

Gli stessi enzimi presenti a livello di epatociti di mammiferi ed uccelli, sono presenti nel fegato dei rettili, anche se gli studi sul loro comportamento in corso di patologia epatica sono scarsi, e hanno dato risultati non del tutto soddisfacenti. A causa della varietà di parametri intrinseci ed estrinseci che condizionano i valori emato-biochimici nei rettili, la definizione di range entro cui un animale possa essere considerato sano è particolarmente problematica, così che essi differiscono anche notevolmente nelle diverse fonti bibliografiche. Solitamente, pertanto, si tende a considerare patologiche soltanto variazioni molto accentuate dei parametri rispetto ai valori riportati in bibliografia. Conseguentemente all'estrema variabilità intraspecifica, è sempre bene utilizzare range specifici per la specie indagata. Qualora fosse possibile, il parametro di riferimento migliore è dato sicuramente da valori precedentemente rilevati nello stesso soggetto.

In generale, i parametri presi in considerazione nei rettili durante l'indagine delle condizioni del fegato sono:

AST: questo enzima non risulta essere particolarmente specifico per il fegato, in quanto, sebbene sia presente in quantità significative a questo livello, si ritrova anche in reni, cuore e muscolo. Il suo innalzamento può pertanto essere sì legato a patologie epatiche, ma anche a patologie muscolari e molte altre patologie che, portando a danni di questi apparati (tossiemia, setticemia..), portano ad un incremento di questo valore (Mader, 2006). Quando l'innalzamento di questo enzima è accompagnato da un innalzamento della CPK, Ramsay and Dotson suggeriscono che ciò possa essere riconducibile a patologie cardiache, mentre innalzamenti di origine epatica o renale non siano di solito caratterizzati dall'aumento

concomitante di questi due parametri (McArthur et al., 2004); questa affermazione deriva tuttavia da osservazioni sui cheloni.

ALT: Parametro molto usato nei piccoli animali, l'attività di questo enzima viene raramente indagata nei rettili. Ciò è dovuto alle sue alte concentrazioni renali che ne abbassano fortemente la specificità per il fegato e alla rarità del suo innalzamento anche in corso di patologie renali (McArthur et al., 2004).

Albumine e glucosio possono risultare più bassi in corso di patologie epatiche; tuttavia, si tratta di riscontri frequenti in corso di anoressia e malnutrizione. Abbassamenti del fosforo e del calcio si accompagnano frequentemente a riduzioni nei valori del glucosio durante un periodo di anoressia. Per quanto riguarda l'ipoalbuminemia, questa può essere determinata anche da enteropatie, parassitosi intestinale, linfodiluizione, patologie renali, ed emorragie. Per quanto riguarda invece il glucosio, si tratta di uno dei parametri più variabili, molto dipendente da temperatura, grado di attività, nutrizione e condizioni fisiologiche dei soggetti. Di solito si assiste ad un picco nel periodo del risveglio dal letargo. Abbassamenti patologici si possono riscontrare anche in corso di setticemia.

Altri parametri più o meno utilizzati per valutare le condizioni del fegato nei piccoli animali, come acidi biliari e ALP, non vengono solitamente indagati nei rettili, a causa di una scarsa conoscenza riguardo al significato delle rispettive variazioni

#### ➤ Esame Radiografico

La radiografia rappresenta la diagnostica per immagini non invasiva maggiormente utilizzata negli animali esotici in generale e nei rettili in particolare. Infatti, grazie alle moderne macchine radiografiche, ad oggi è possibile ottenere buone immagini anche di specie di piccole dimensioni, soprattutto in caso di utilizzo di pellicole mammografiche. Poiché l'ombra epatica è ben visualizzabile nella proiezione latero laterale con la base appoggiata a livello di pavimento della cavità celomatica (Girling and Raiti, 2004), variazioni nelle dimensioni normali sono apprezzabili piuttosto facilmente (Mader, 2006), così come la presenza di masse.

#### ➤ Esame Ecografico

Grazie alla sua non invasività e alla relativa economicità, l'ecografia è sempre più diffusa nella medicina dei rettili. Tuttavia questa tecnica presenta in questo gruppo limitazioni determinate dalla presenza di squame, che portano alla formazione di artefatti e possono rendere lo studio non diagnostico. Oltre che allo spessore e all'eventuale calcificazione delle squame stesse, artefatti conseguono anche alla presenza di bolle d'aria intrappolata tra di esse. Un bagno caldo 20-30 minuti prima dell'ecografia determina un gonfiore a livello cutaneo, con conseguente chiusura degli spazi tra le squame e miglioramento netto dell'immagine

ecografica (Krautwald et al., 2011). L'utilizzo di grandi quantità di gel può a sua volta risultare utile a contenere gli artefatti, andandosi ad infilare negli spazi d'aria (Mader, 2006); questo processo risulta più evidente dopo 5 minuti dall'applicazione. Un importante accorgimento nel caso di utilizzo di gel è la sua accurata rimozione al termine dell'esame, in modo da evitare irritazioni cutanee o possibile ingestione. Alcuni autori citano la possibilità di effettuare l'intero studio ecografico in immersione parziale su animali molto tranquilli o sedati (Mader, 2006).

Il decubito dorsale garantisce la miglior visualizzazione della maggior parte degli organi addominali, compreso il fegato, il quale è collocato nella porzione craniale della cavità celomatica. Generalmente vengono utilizzate sonde da 7,5 MHz con una finestra acustica di piccole dimensioni, ma sonde a 5 MHz possono essere necessarie nel caso di individui di grosse dimensioni (Jacobson, 2003).

L'ecografia rappresenta un buon strumento diagnostico per l'indagine del fegato nei rettili. Nell'iguana è utilizzata una finestra acustica ventrale al di sotto dell'arco costale. Il fegato è facilmente individuabile tra il cuore e i corpi grassi, rispetto ai quali si presenta ipoecogeno. E' caratterizzato da un'ecostruttura finemente granulare all'interno della quale è possibile individuare i vasi come regioni ipoecogene e il loro corso può essere seguito lungo tutto il parenchima; le pareti vascolari sono evidenti solo nei vasi portali (Jacobson, 2003). Spesso è possibile individuare la vena cava, la quale può essere seguita fino al suo ingresso a livello cardiaco (Jacobson, 2003). La visualizzazione della cistifellea a livello del margine caudale del lobo destro non è sempre possibile.

Lo studio ecografico del fegato permette una buona valutazione di dimensioni e caratteristiche del parenchima, risulta efficace nell'individuazione di masse epatiche e garantisce la possibilità di ottenere campioni biotici e aspirati per la citologia per via ecoguidata. L'aspetto ecografico del parenchima epatico normale è assimilabile a quello dei mammiferi. Per quanto riguarda eventuali alterazioni, in letteratura è descritto l'aspetto ecografico di alcune condizioni patologiche: una generale iperecogenicità con calo di visualizzazione della trama portale si riscontra in caso di grave lipidosi (Jacobson, 2003), aree dove l'ecogenicità appare invece irregolare sono piuttosto indicative di patologia infiammatoria (Mader, 2006), mentre ascessi epatici sono stati descritti come masse focali iperecogene (Jacobson, 2003). L'accumulo di sali biliari che appaiono come punti iperecogeni in movimento rappresenta un reperto occasionale.

#### ➤ TC e RM

L'applicazione clinica di queste tecniche nella medicina dei rettili è ancora piuttosto limitata a causa degli alti costi. Molti studi stanno tuttavia mettendo in evidenza i vantaggi offerti.

### ➤ Esame Endoscopico

Questa tecnica diagnostica ha trovato larghissimo impiego nella medicina degli animali esotici. Nei rettili, in particolare, le maggiori applicazioni sono l'esplorazione della cavità celomatica a scopo diagnostico o per la determinazione del sesso tramite visualizzazione diretta degli organi genitali. Endoscopi rigidi di 2.7 mm sono i maggiormente utilizzati. Rispetto alle diagnostiche tradizionali, l'effettuazione dell'esame endoscopico è considerato una tecnica mini-invasiva, poiché richiede quasi sempre un'anestesia generale e l'incisione della parete celomatica. In questi ultimi anni di stanno sviluppando nuove tecniche di tipo cistoscopico che, sfruttando la trasparenza della vescica, permettono la visualizzazione diretta di molti organi senza entrare direttamente in cavità celomatica. In questo caso, ovviamente, non è tuttavia possibile il prelievo bioptico di campioni di tessuti. La possibilità di prelevare campioni per l'esame istologico è spesso il principale vantaggio di questa tecnica, poiché esso rappresenta ad oggi l'indagine diagnostica più affidabile in corso di patologia epatica. Infatti, i cambiamenti macroscopici, ad esempio in dimensioni e colorazione, visualizzabili durante l'endoscopia, sono, così come i parametri biochimici, marcatamente condizionati nei rettili da condizioni ambientali e dall'effetto di particolari momenti fisiologici, come il letargo, la vitellogenesi e il digiuno, rendendo molto difficile l'attribuzione di variazioni a fenomeni patologici.

Conseguentemente alla forma cilindrica del suo corpo, l'endoscopia nell'iguana verde può essere effettuata sia in decubito laterale che dorsale; generalmente il fegato si approccia tramite accesso laterale, senza grosse differenze documentate tra l'approccio destro e sinistro, ad eccezione della cistifellea, la quale è ovviamente visualizzabile a destra (Girling and Raiti, 2004).

### ➤ Esame Istologico:

Sebbene siano tutt'oggi presenti nei rettili alcune difficoltà nella valutazione microscopica di campioni di fegato, la diagnosi istologica è attualmente la più affidabile, se non l'unica, per quanto riguarda le patologie epatiche dei rettili. Diverse tecniche bioptiche sono descritte in medicina veterinaria. Nei rettili, a causa delle piccole dimensioni, l'utilizzo di aghi da biopsia manuali è considerato generalmente più sicuro, e la scelta propende di solito verso aghi di dimensioni ridotte. I campioni sono più facilmente prelevabili a livello marginale e, a volte, un prelievo migliore e più sicuro può essere favorito dall'incisione della glissoniana (Mader, 2006).

## **4.2 La milza: fisiologia e patologia nelle specie di interesse**

### **4.2.1 Furetto**

#### *Anatomia*

La milza è un organo di colore marrone grigiastro posta nella regione ipogastrica sinistra adesa alla grande curvatura dello stomaco. I furetti sono gli animali esotici con la milza più grande: le sue dimensioni normali sono di circa 5,1 cm di lunghezza per 1,8 cm di larghezza e 0,8 cm di spessore (Quensenberry and Carpenter, 2012). Tuttavia, a causa della notevole frequenza di condizioni di ematopoiesi extramidollare nei furetti adulti, la milza è molto spesso soggetta ad una condizione di iperplasia (Lewington, 2007; Quesenberry and Carpenter, 2012).

#### *Fisiologia*

Le funzioni della milza includono la produzione di linfociti e plasmacellule, la filtrazione e fagocitosi di particelle antigeniche, la rimozione di globuli rossi vecchi o danneggiati e la riserva di globuli rossi e piastrine giovani, nonché l'ematopoiesi, qualora risultasse necessario (Oglesbee, 2006).

#### *Cenni di Patologia*

La splenomegalia è un riscontro particolarmente frequente nei furetti, soprattutto nei soggetti adulti di età superiore all'anno, dove a livelli lievi può essere considerata addirittura para-fisiologica (Oglesbee, 2006). L'aumento di volume della milza può essere sia diffuso che nodulare, a seconda della causa sottostante.

Raramente questa condizione è conseguente ad una patologia splenica primaria e, addirittura, molte volte non è possibile evidenziarne la causa. La splenomegalia può essere banalmente riconducibile ad una condizione di congestione venosa, associata pertanto a patologie cardiache (destra) o epatiche. Frequentemente, invece, l'aumento di volume della milza risponde ad un'esigenza di aumento della sua attività funzionale. Ciò avviene ad esempio nell'ematopoiesi extramidollare e nell'iperplasia linforeticolare, caratterizzata da un aumento degli elementi linfoidi e dei fagociti mononucleari in risposta ad una stimolazione antigenica cronica, nonché da un'accelerazione nella distruzione dei globuli rossi (Oglesbee, 2006). Nella maggior parte dei casi, la splenomegalia è dunque associata a patologie in altri organi e apparati. Molte volte, tuttavia, la causa dell'ematopoiesi extramidollare non viene determinata, e non vi sono alterazioni ematologiche e del midollo osseo tali da giustificarla.

Tra le patologie che possono causare splenomegalia vi sono la sepsi, le patologie surrenaliche, l'insulinoma, l'iperestrogenismo, il diabete mellito e la malattia aleutina, (Lloyd, 1999;

Oglesbee, 2006; Quesenberry and Carpenter, 2012). La malattia aleutina è una patologia rara causata da un Parvovirus tipico del visone (*Mustela vison*). Nel furetto causa un deperimento generale, sintomi cardiaci e respiratori e paresi/paralisi dei posteriori, mentre forme gastroenteriche con melena sono più caratteristiche dell'ospite selvatico (Lewington, 2007).

Tra le cause primarie di splenomegalia sono documentate forme neoplastiche, mentre i fenomeni infiammatori sono piuttosto rari, di solito associati a gastroenteriti. Tra le neoplasie spleniche il linfoma è la forma più frequente, ma sono segnalati anche il linfosarcoma, l'emangiosarcoma, il fibrosarcoma, il leiomiomasarcoma, nonché insulinooma e carcinoma di tipo metastatico. Queste lesioni possono avere carattere diffuso, ma sono più frequentemente di tipo nodulare. Altre cause primarie di splenomegalia nodulare sono date dalla presenza di lesioni tra cui ematomi, ascessi o granulomi tubercolari (Oglesbee, 2006).

L'ipersplenismo è una sindrome molto rara caratterizzata da un rapido sequestro di leucociti o globuli rossi da parte della milza, risultante in condizioni di anemia o leucopenia (Lloyd, 1999; Oglesbee, 2006; Quesenberry and Carpenter, 2012).

### *Diagnostica*

La milza del furetto può essere facilmente palpabile durante l'esame obiettivo generale. In questa sede è possibile apprezzare forma e dimensioni dell'organo: in corso di iperplasia la milza può estendersi dall'addome craniale sinistro caudalmente e oltre la linea mediana verso destra (Wolf, 2009) e possono essere apprezzati ingrossamenti localizzati caratteristici delle iperplasie di tipo nodulare, suggestivi di neoplasia o patologia infiltrativa (Oglesbee, 2006). Poiché spesso la splenomegalia rappresenta una conseguenza di altre forme patologiche, la palpazione addominale deve essere accurata anche per quanto riguarda gli altri organi, e si deve procedere ad una valutazione attenta dei linfonodi. E' molto importante tenere sempre presente come un ingrossamento relativo dell'organo consegua sempre ad ogni tipo di sedazione, per cui la palpazione addominale e la diagnostica per immagini dovrebbero sempre essere eseguiti con l'animale sveglio (Lloyd, 1999). Generalmente, lievi aumenti di volume possono risultare ben tollerati nei furetti, mentre ingrossamenti più marcati generano fastidio o dolore.

#### ➤ Esame emocromocitometrico

Qualora la splenomegalia fosse legata a fenomeni emorragici, è possibile evidenziare un'anemia di tipo rigenerativo.

Una leucocitosi può essere invece messa in evidenza in corso di patologia infiammatoria. La conta differenziale e la valutazione dello striscio ematico risultano particolarmente importanti per individuare un "left shift", con aumento delle forme immature di globuli bianchi, ed

eventuale tossicità cellulare. In caso di linfocitosi marcata l'evidenziazione di forme immature o tossiche può essere fortemente indicativa di linfoma. L'ipersplenismo è invece caratterizzato da leucopenia e/o anemia e/o trombocitopenia.

Fenomeni di trombocitopenia possono essere associati anche a emangiosarcoma, dove si assiste ad un aumento del consumo di piastrine, o all'iperestrogenismo, dove ne cala invece la produzione.

#### ➤ Esame biochimico

Non esistono parametri biochimici indicativi di patologia splenica, tuttavia questo esame è essenziale per l'indagine degli altri organi. Per quanto riguarda condizioni primarie spleniche, la presenza di un insulinooma metastatico si accompagna a ipoglicemia marcata, mentre una condizione infiammatoria si accompagna a iperglobulinemia.

#### ➤ Esame Radiografico

Radiograficamente la milza è ben visualizzabile in tutte le proiezioni: in proiezione laterale si presenta come una struttura omogenea ovale-triangolare a radiopacità dei tessuti molli, posta caudalmente al fegato a contatto con la parete addominale ventrale, mentre in ventrodorsale l'ombra splenica si trova caudalmente allo stomaco lungo la parete addominale sinistra (Reese, 2011). In caso di sospetta splenomegalia in corso di palpazione addominale, è possibile confermare radiograficamente la splenomegalia. Inoltre, radiograficamente è possibile discriminare aumenti di volume diffusi o focali e si può mettere in evidenza irregolarità nei margini dell'organo (Capello and Lennox, 2008).

#### ➤ Esame Ecografico

All'ecografia la milza si localizza molto bene, anche grazie alle dimensioni rilevanti. Essa è posta caudalmente allo stomaco a contatto con la parete addominale sinistra, ha forma di lingua come nella altre specie, e appare triangolare nelle sezioni trasversali (Reese, 2011). L'ecogenicità di questo organo è regolare, iperecogena rispetto al fegato, e la tramatura è fine; in certi casi, quando gli ultrasuoni la colpiscono in modo perfettamente perpendicolare, la capsula splenica può essere visualizzata come una linea iperecoica. Le vene spleniche possono essere seguite nel furetto all'interno del parenchima solamente per un breve tratto. In caso di presenza massiva di ingesta a livello gastrico è possibile che la visualizzazione del tratto mediale della milza risulti difficoltoso.

Sebbene il rilievo di margini arrotondati sia considerato parafisiologico in soggetti adulti (Reese, 2011), l'esame ecografico permette di valutare entità e carattere della splenomegalia. Ad esempio, una ridotta ecogenicità può essere evidenziata in corso di linfoma, mentre un'alterazione irregolare è più indicativa di emangiosarcoma (Oglesbee, 2006).

➤ **Esame Citologico e Istologico**

Entrambe le tecniche sono molto utili per raggiungere una diagnosi certa in caso di patologia primaria della milza (tumorale o infiammatoria). L'esame citologico viene effettuato a partire da campioni prelevati tramite la tecnica dell'ago aspirato. Questa tecnica è assolutamente sconsigliata in caso di sospetto di emangiosarcoma (Oglesbee, 2006). Il prelievo di campioni bioptici dovrebbe essere prelevato per via laparotomica o laparoscopica; le tecniche percutanee possono risultare pericolose in questa specie a causa delle dimensioni inadatte dell'attrezzatura comunemente utilizzata (Quesenberry and Carpenter, 2012).

➤ **Esame citologico del midollo osseo**

Può essere indicato per raggiungere una diagnosi a seguito di riscontro di panleucopenia associata a splenomegalia (Oglesbee, 2006). In corso di ipersplenismo la cellularità del midollo osseo risulta normale o aumentata (Quesenberry and Carpenter, 2012).

#### **4.2.2 Coniglio**

##### *Anatomia*

La milza del coniglio è relativamente piccola a confronto con quella delle altre specie di animali esotici. L'organo è posto tra il digiuno, il cieco e la grande curvatura dello stomaco, cui è connesso tramite il legamento gastrolienale. Il suo margine dorsale è posto a contatto con l'ultima costa, è inclusa nell'omento e ha forma ovale – allungata (Dimitrov et al., 2012). Nel coniglio è segnalata una certa frequenza (9%) di milze accessorie (Quesenberry and Carpenter, 2012).

##### *Fisiologia*

Nel coniglio la milza svolge le stesse funzioni che nelle altre specie, inclusa la produzione di linfociti e plasmacellule, la filtrazione e fagocitosi di particelle antigeniche, la rimozione di globuli rossi vecchi o danneggiati e la riserva di globuli rossi e piastrine giovani. Le piccole dimensioni dell'organo in questa specie sono state attribuite ad una minore attività dovuta alla presenza di tessuto linfoide a livello dei tessuti associati all'apparato gastrointestinale (Sohn and Couto, 2012). Alla nascita, la milza del coniglio non presenta né follicoli né centri germinali, i quali si sviluppano soltanto a partire dalle due settimane di età (Sohn and Couto, 2012).

### *Cenni di Patologia*

La splenomegalia non è particolarmente frequente in questa specie. Un ingrossamento può essere conseguente alla stasi in caso di patologia cardiaca destra (Oglesbee, 2006) o può essere associato a fenomeni patologici in altri distretti. Ad esempio, la splenomegalia è citata tra i reperti anatomopatologici della MEV (Quesenberry and Carpenter, 2012). Nessun tumore primario della milza è stato documentato (Tinkey et al., 2012); è tuttavia segnalata l'occorrenza del linfoma multicentrico, il quale spesso colpisce anche reni, polmoni, cieco, intestino, linfonodi e ghiandole surrenali (Quesenberry and Carpenter, 2012).

### *Diagnostica*

La milza è una struttura troppo piccola nel coniglio per essere palpata, e per essere visualizzata con facilità tramite la diagnostica per immagini. In particolare, le dimensioni ridotte ne rendono difficile l'evidenziazione da un punto di vista radiografico (Reese, 2011), mentre ecograficamente è visualizzabile caudalmente allo stomaco lungo la parete addominale sinistra, allungata o triangolare a seconda della proiezione. La parziale copertura da parte del digiuno può renderne difficile l'individuazione.

Come nelle altre specie non esistono inoltre esami emato-biochimici specifici per l'indagine della milza. La scarsa bibliografia in merito alle patologie spleniche in questa specie potrebbero dunque essere riconducibili anche a queste evidenti difficoltà diagnostiche. Seguendo la pratica comune negli altri mammiferi, le diagnostiche più significative sono date dall'esame emocromocitometrico e, da citologia e biopsia, soprattutto in caso di sospetta malattia neoplastica. La diagnostica per immagini può aiutare a mettere in evidenza alterazioni nella normale forma, dimensione e tramatura dell'organo e risultare importante per l'indagine di fenomeni patologici in altri distretti che possano determinare un aumento di volume della milza a seguito di necessità di un aumento della sua funzionalità. Tuttavia, in letteratura sono presenti informazioni discordanti in merito alle caratteristiche ecografiche della milza del coniglio: secondo Reese la milza risulta iperecogena rispetto al fegato e la vascolarizzazione non risulta visualizzabile in B-mode, mentre secondo Dimitrov et al la milza è ipoecoica rispetto al fegato e i vasi sono visualizzabili come aree ipoecogene. Secondo questi ultimi anche la capsula sarebbe evidenziabile come una linea marcatamente iperecogena.

## Capitolo 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Campione diagnostico

Nello studio sono stati inclusi in totale 11 furetti, 10 conigli e 10 iguane.

#### *Furetti*

Il campione *furetti* era costituito da 11 esemplari, tra cui 6 maschi e 5 femmine, di età compresa tra i 4 mesi e i 3 anni, con un'età media di 20 mesi. Il peso medio dei soggetti era di 1,2 kg, con valori compresi tra 750 g e 1,6 kg. Le femmine erano tutte intere; tra i maschi, invece, due erano interi, due erano stati in precedenza sottoposti dai proprietari a castrazione chimica mediante applicazione sottocutanea di impianto di deslorelina (Suprelorin®), e altri due ad intervento di orchietomia.

Tutti gli animali sono stati forniti dalla Clinica Veterinaria Modena Sud, precedentemente non avevano mai presentato alcuna manifestazione clinica patologica. Dal momento che l'intera procedura non prevedeva alcuna sedazione o anestesia, sono stati scelti soggetti di buona indole.

#### *Conigli*

Il campione *conigli* era costituito da 10 esemplari, tra cui 7 maschi e 3 femmine, di età compresa tra 5 mesi e 3 anni, per una media di 14,5 mesi di età. E' da sottolineare come per due soggetti l'età fosse stimata, a causa della loro origine incerta. Il peso dei conigli andava da 1,4 a 2,5 kg, per una media di 1,6 kg; la media tra i soggetti maschi era di 1,7 kg, mentre la media tra le femmine era di 1,4 kg. Tutti i maschi erano castrati, mentre le femmine erano tutte intere.

Gli animali sono stati forniti dalla Clinica Veterinaria Modena Sud, tutti regolarmente e correttamente vaccinati e sotto periodico controllo veterinario. Erano stabulati all'aperto e l'alimentazione era costituita prevalentemente da erba e fieno, integrato con verdure fresche. Nessuno dei soggetti aveva mai presentato sintomi di patologia o aveva mai subito interventi chirurgici, ad eccezione dell'orchietomia per quanto riguarda i maschi.

#### *Iguane*

Il campione *iguana* era costituito da 10 esemplari, tra cui 9 maschi e una femmina, di età compresa tra i 2 e i 18 anni, per una media di 9 anni. Il peso medio degli animali era di 1,9 kg, con valori compresi tra 1,1 e 2,8 kg.

Sei soggetti sono stati forniti dalla Clinica Veterinaria Modena Sud e 4 dal Parco Le Navi di Cattolica.

## 5.2 Valutazione dello stato di salute

Poiché la finalità dello studio era quella di valutare la normale perfusione di fegato e milza in conigli e furetti utilizzando l'ecografia con contrasto (CEUS), e del fegato dell'iguana utilizzando la CEUS e la TC con contrasto, sono stati inclusi nel campione soltanto animali sani. Lo stato di salute degli animali è stato accertato a diversi livelli.

### ➤ Scelta degli animali

Nel caso dei conigli e dei furetti sono stati selezionati animali di giovane età che non presentassero e non avessero mai presentato sintomi clinici evidenti, né cui fossero state diagnosticate in precedenza patologie degenerative, infettive o neoplastiche a carattere cronico-degenerativo o patologie di qualunque tipo relative agli organi di interesse (fegato e milza). Visita clinica: un esame obiettivo generale è stato effettuato in tutti i soggetti.

### ➤ Esame emato-biochimico

Un campione di sangue è stato prelevato da tutti gli animali e posto in provette da 0,3 ml con kEDTA e da 0,5 ml con litio eparina (LiHe). Sebbene nei rettili venga comunemente utilizzata la LiHe come anticoagulante anche per l'effettuazione dell'esame emocromocitometrico, alcuni autori riportano che in questa specie il kEDTA sia in effetti l'anticoagulante di prima scelta anche per questo genere di esame (Campbell & Ellis, 2007; Nardini et al., 2013). Per ogni animale sono stati eseguiti due strisci di sangue a partire dal sangue intero privo di anticoagulante, utilizzando vetrini sabbati. I prelievi sono stati eseguiti dalla vena cava craniale per il furetto, utilizzando una siringa da 1 ml o da 2,5 ml a seconda delle dimensioni, dalla vena safena per il coniglio, utilizzando una butterfly e una siringa da 2,5 ml e dalla vena coccigea ventrale, utilizzando una siringa da 2,5 ml introdotta con approccio laterale. Tutti i prelievi sono stati eseguiti senza sedazione.

L'esame biochimico è stato effettuato presso il laboratorio interno della Clinica Veterinaria Modena Sud utilizzando l'apparecchiatura VetScan2 (Abaxis). Nel caso dei mammiferi sono stati indagati i seguenti parametri impiegando il rotore Comprehensive diagnostic profile: ALB, ALP, ALT, AMY, BUN, CA, CRE, GLOB, GLU, K+, NA+, PHOS, TBIL e TP. Per le iguane è stato impiegato il rotore Avian/Reptilian profile plus con i seguenti parametri: ALB, AST, BA, CA, CK, GLU, Phos, K+, Na+, PT, UA.

L'esame emocromocitometrico è stato effettuato presso i laboratori IDEXX, Germania. Un campione di sangue in EDTA e due strisci di sangue non colorati sono stati inviati secondo le procedure standard indicate dallo stesso laboratorio. Campioni in LiHe e kEDTA sono stati inviati nel caso dell'iguana. I risultati di questo esame sono generalmente disponibili dopo 1 giorno.

Per la valutazione degli esiti degli esami biochimici nel caso dei mammiferi sono stati utilizzati come riferimento i range riportati nel testo *The 5-Minute Veterinary Consult Ferret and Rabbit* (Oglesbee, 2006) (parametri fitch per il furetto), mentre il testo *Reptile Medicine and Surgery* (Mader, 2006) è stato utilizzato come fonte per i parametri di riferimento nell'iguana. Nel coniglio i riferimenti relativi a Ca, P, Na, K e Amilasi sono tratti altra fonte bibliografica (Melillo, 2007), poiché non riportati nel testo precedentemente citato. Nel caso invece degli esami emocromocitometrici sono stati tenuti in considerazione per tutte le specie i range di riferimento riportati dal laboratorio in cui sono stati effettuati gli stessi (IDEXX, Germania).

➤ **Esame Ecografico addominale standard B-Mode**

L'esame è stato effettuato prima di ogni studio contrastografico, presso la Clinica Veterinaria dell'Orologio di Sasso Marconi. Tutti i principali organi sono stati indagati, con particolare attenzione agli organi di interesse.

➤ **Esame Istologico**

Poiché nei rettili l'esame istologico è considerato il metodo più significativo per la diagnosi di patologia epatica, nel caso delle iguane al termine dello studio sono stati raccolti per via ecoguidata due o tre campioni biotici, utilizzando un ago da biopsia manuale "Spirotome". Questi sono stati inviati presso il Center for Fish and Wildlife Health Institute of Animal Pathology (Institut für Tierpathologie), alla Facoltà di Medicina Veterinaria di Berna, Svizzera.

### **5.3 Preparazione del paziente**

#### *Mammiferi*

Conigli e furetti sono stati incannulati utilizzando un catetere endovenoso viola da 26G, posizionato a livello di vena cefalica, dopo appropriata tosatura e disinfezione con alcool della zona. In tutti i casi, la zampa è stata bendata con Vetrap® al fine di limitare la possibilità per gli animali di rimuoversi il catetere. Successivamente, gli animali sono stati tosati a livello di addome craniale e pesati. Nel caso di furetti appartenenti allo stesso proprietario e pertanto mantenuti in gruppo, il numero di microchip è stato registrato al fine di evitare ogni tipo di errore di identificazione. I conigli sono invece stati identificati tramite la colorazione del mantello. Gli animali sono stati preparati presso la Clinica Veterinaria Modena Sud, sempre almeno un'ora prima del trasporto alla Clinica Veterinaria dell'Orologio a Sasso Marconi, dove sono stati effettuati gli studi ecografici. Durante l'attesa si è prestato attenzione nel garantire che i conigli venissero tenuti lontani dalla presenza o dall'odore di un qualunque

predatore, assicurando loro una stanza riservata. Il viaggio, della durata di circa mezz'ora, è avvenuto in idonei trasportini, singolarmente.

### *Iguane*

Tutti gli animali sono stati incannulati utilizzando un ago cannula giallo da 22 G posizionato a livello di vena coccigea, a circa 2/3 della lunghezza totale della coda, dopo appropriato lavaggio e disinfezione con clorexidina 4% della zona. Questa sede di incannulazione è possibile senza effettuare il cutting delle squame. Il catetere endovenoso viene introdotto a livello di linea mediana passando tra squama e squama.

## **5.4 Contenimento**

Solamente nel caso delle iguane, a causa dell'inclusione dello studio tomografico nel progetto, l'intera procedura è stata eseguita in anestesia generale (Figure 2 e 3). Tutti gli animali sono stati pesati e indotti con Propofol® 10 mg/kg, dopodiché l'anestesia è stata mantenuta con miscela di ossigeno e Isoflurano al 2% dopo intubazione tracheale con tubi non cuffiati di 2,5 mm. Nessuna sedazione è stata invece prevista né per i conigli né per i furetti, dove invece si è proceduto al contenimento manuale del paziente. Sia nei conigli che nei furetti la restrizione si è limitata al minimo possibile. Il contenimento ideale è stato quello di una posizione "seduta" tenendo l'animale a livello ascellare e sostenendo i posteriori con la mano aperta.

Nel caso dei furetti è stata utilizzata la pasta Multivitamin della GIMPET come fattore di distrazione durante l'intera procedura (Figura 4).



**Figura 2. Esecuzione della tecnica CEUS nell'iguana (foto originale).**



Figura 3. Esecuzione delle TC dinamica nell'iguana (foto originale).



Figura 4. Esecuzione della tecnica CEUS nel coniglio (sinistra) e nel furetto (destra).

## 5.5 CEUS

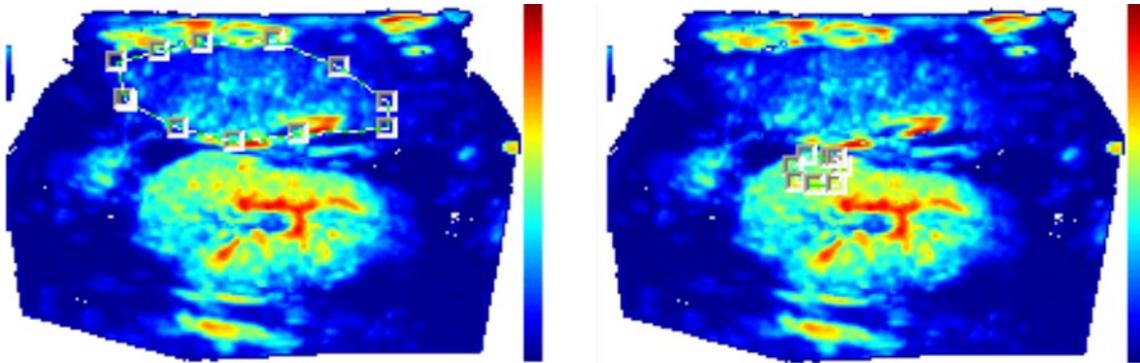
L'intera procedura è stata eseguita presso la Clinica Veterinaria dell'Orologio a Sasso Marconi (BO) da un unico operatore, in modo da ridurre la variabilità legata all'esecuzione tecnica dell'ecografia. Dopo un esame ecografico in B-mode dell'addome, si è proceduto allo studio ecocontrastografico. Al fine di massimizzare la persistenza del MDC in circolo è necessario eseguire un settaggio della macchina a basso impatto acustico. Infatti l'intensità degli ultrasuoni applicata sulla microbolla (potenza acustica) è un parametro molto importante in quanto influenza la risposta della microbolla, che può variare dalla oscillazione alla rottura della bolla stessa. Questo parametro può essere regolato nell'ecografo variando il valore delle unità kPascal oppure modificando il settaggio del cosiddetto Indice Meccanico (MI), che è una misura indiretta della pressione acustica esercitata dall'ultrasuono sulla microbolla. Se questo valore viene regolato a valori bassi ( $MI < 0,1$ ) l'oscillazione della microbolla è lineare, la bolla entra in risonanza ma le fasi di compressione ed espansione sono identiche. Il risultato è un aumento della intensità dell'eco di ritorno che può essere sfruttato per incrementare la visualizzazione del segnale Doppler. Un MI più elevato risulterebbe nella rottura delle bolle di MDC con conseguente eliminazione del gas e perdita della visualizzazione del MDC.

Per ognuno dei due organi indagati è stato scelto un punto su cui mantenere fissa la sonda ecografica. Il mezzo di contrasto Sonovue® è stato iniettato utilizzando il catetere endovenoso precedentemente posizionato a livello di vena cefalica, collegando la siringa direttamente al catetere, in modo da evitare eventuali spazi morti determinati ad esempio dalla presenza di un tappino perforabile.

In tutte le specie è stata utilizzata la preparazione Sonovue® (5mg/ml) al dosaggio di 0,04 ml/kg, corrispondente a 0,2 mg/kg nei mammiferi, mentre nelle iguane è stato utilizzato un dosaggio di 0,03 ml/kg, corrispondente a 0,15 mg/kg. Nelle iguane lo studio CEUS è stato ripetuto dopo aver tenuto la sonda ecografica in B-mode sugli organi parenchimatosi al fine di rompere le bolle ancora presenti in circolo; per ogni animale sono stati considerati i valori di picco, TTP, MTT, RBV e RBF calcolando la media tra i due studi.

In tutti i casi, l'iniezione è stata immediatamente seguita da una iniezione di circa 1,5 ml di soluzione fisiologica, in modo da assicurare l'ingresso a livello di circolo di tutta la dose di mezzo di contrasto. Al momento dell'iniezione (T:0) è stato attivato il timer, necessario per la costruzione delle curve di distribuzione delle microbolle. L'intero processo di wash in e wash out del contrasto è stato visualizzato real-time e filmato. La registrazione è stata per entrambi gli organi di circa 1 minuto e 45 secondi nei furetti, di 2 minuti nel coniglio, mentre nelle iguane è stato di 10 minuti.

Nei furetti, In 5 casi su 10 l'immagine ecografica del rene sinistro era inclusa nel campo di studio della milza, così che è stato possibile valutare le modalità di distribuzione del mezzo di contrasto anche a questo livello (Figura 5).



**Figura 5. Proiezione durante lo studio CEUS della Milza di Furo 10, con aree di calcolo per Milza (sinistra) e Rene Sinistro (destra) a confronto.**

Uno specifico software è stato successivamente utilizzato per la costruzione di curve intensità-tempo. Picco, tempo di raggiungimento del picco (time to peak, TTP), tempo medio di transito (mean transit time, MTT), volume sanguigno regionale (regional blood volume, RBV) e flusso sanguigno regionale (regional blood flow, RBF) sono stati i parametri estrapolati da queste curve.

Per ogni parametro sono state calcolate media, deviazione standard e mediana. Visto il numero esiguo di casi in cui è stato indagato il rene, per quest'organo è stata presa in considerazione soltanto la mediana dei valori. Le medie calcolate per i valori ottenuti dallo studio delle iguane sono state calcolate a partire dalla media ottenuta per singolo soggetto, in modo da avere un dato più realistico in animali soggetti ad un numero così elevato di variabili.

## 5.6 TC

Lo studio tomografico è stato effettuato solamente nel campione iguane, immediatamente dopo lo studio ecografico, in modo che la permanenza maggiore del contrasto iodato a livello di organismo non incidesse nei risultati dell'esame ecografico.

L'animale è stato posizionato in decubito sternale e lo studio è stato ripreso in direzione cranio-caudale. Per tutti i soggetti è stata eseguita una scansione total body diretta (pre contrasto) che ha consentito di scegliere la fetta a livello del fegato dove eseguire lo studio dinamico. Si è quindi proceduto all'iniezione di MDC iodato non ionico, attraverso un

iniettore di potenza a 2,5 ml/sec e ad una dose di 800 mg/kg, nella vena coccigea ventrale. Lo studio dinamico consiste nella ripresa della stessa immagine nel tempo; in questo studio si è ripresa un'immagine ogni secondo per 10 minuti per un totale di 600 immagini.

Il software della TC ha consentito di determinare i valori di densità (HU) del parenchima epatico. La variazione di questi valori nel tempo è stata registrata in tutte le sezioni all'interno di una ROI (Region Of Interest) delle dimensioni di circa 25 mm. In questo modo la media delle HU registrate per ogni punto della ROI è stata calcolata, e le curve di perfusione nel fegato sono state costruite. Allo stesso modo, in ogni sezione sono stati calcolati i valori HU in un punto a livello aortico.

Per ogni animale sono stati determinati il tempo e i valori di arrivo del MDC a livello di vasi epatici, di diffusione all'interno del parenchima, del picco, dell'arrivo del MDC a livello di aorta e del picco a livello di aorta. L'arrivo del MDC a livello di vasi epatici e di aorta è stato determinato visivamente, mentre come inizio di diffusione del mezzo di contrasto a livello di parenchima si è sempre preso in considerazione il primo valore maggiormente elevato di HU dopo la visualizzazione del contrasto a livello epatico. Il picco è stato considerato come il punto di registrazione del valore maggiore HU, e il tempo per il suo raggiungimento è stato così determinato in tutti i soggetti. Sono poi state calcolate la media e la deviazione standard dei valori derivanti da tutti i soggetti.

## **5.7 Strumentazione utilizzata**

### **5.7.1 CEUS**

#### *Caratteristiche Ecografo*

Sono stati utilizzati un Esaote Mylab 30 per lo studio del fegato dell'iguana e un Esaote Mylab 70 per lo studio di furetti e conigli.

Il Mylab 70 è un sistema ecografico dalle prestazioni elevatissime in grado di acquisire immagini in tutte le modalità, dalla fondamentale all'armonica e dotata tecnologie mirate alla riduzione dei rumori e degli artefatti e al raggiunto di livelli di risoluzione elevati.

L'ecografo Mylab 30 è un invece un modello portatile (hand-held echocardiography HHE), dotato tuttavia di tecnologie innovative e strumenti applicativi tali da ottenere potenzialità diagnostiche del tutto paragonabili agli ecografi convenzionali più avanzati (Mondillo and Galderisi, 2005). Essendo a sua volta dotato di imaging M-mode, bidimensionale, armonica tissutale, "color flow mapping", Doppler, ecocontrastografia miocardica, Doppler tissutale e di trasduttori molteplici, questo apparecchio può essere considerato un vero e proprio ecocardiografo miniaturizzato (Mondillo and Galderisi, 2005).

Entrambi i modelli sono dotati di un software (Contrast Tuned Imaging – CnTITM-Contrast Tuned Imaging Technology, Esaote, Genova, Italy) che consente lo studio contrasto grafico con soppressione del segnale fondamentale. Il software utilizzato per la produzione ed analisi delle curve intensità-tempo durante gli studi con mezzo di contrasto è il Qontrast™ (QONTRAST, Milan, Italy) . Attraverso un calcolo a posteriori, permette la valutazione oggettiva di parametri quantitativi e fornisce una serie completa di grafici.

#### *Caratteristiche Sonovue®*

Sonovue® (Bracco Spa, Milan, Italy) è un mezzo di contrasto di seconda generazione che viene commercializzato in Italia dal 2001 ed è correntemente il più utilizzato in Europa. E' composto da un guscio fosfolipidico riempito da esafluoruro di zolfo (SF<sub>6</sub>), un gas inerte e poco solubile. Sia l'essere incapsulato sia il basso coefficiente di diffusione contribuiscono ad aumentare la persistenza e la stabilità di SF<sub>6</sub> rispetto agli agenti di prima generazione sia dopo ricostituzione (fino a 6 ore) che a livello vascolare, incrementando la finestra diagnostica. Alcuni autori riportano una maggiore fragilità delle microbolle di Sonovue rispetto a Definity® (Bristol Myers Squibb), il mezzo di contrasto maggiormente utilizzato in ecografia negli Stati Uniti e in Canada, con vantaggi riscontrabili in studi sulla normale perfusione degli organi, dove iniezioni frequenti e distruzione rapida delle microbolle risultano a volte necessari (O'Brien and Holmes, 2007). La maggior parte delle bolle risuona alla frequenza di 4-4,5 MHz (Bokor, 2000) generando un segnale di tipo armonico. Le frequenze armoniche sono multipli o sottomultipli della frequenza originaria, detta anche fondamentale. Queste frequenze possono essere captate in modo selettivo per ottimizzare la ricezione del segnale proveniente dal MDC, in quanto vengono prodotte quasi esclusivamente dalle micro bolle e non dal tessuto circostante (Rossi 2007). Il gas contenuto nelle bolle, dopo la rottura delle stesse, viene totalmente eliminato con l'aria espirata, mentre le componenti del guscio vengono filtrate a livello renale ed eliminate a livello epatico. Similmente a Levovist®, gli studi sulla cinetica del Sonovue® hanno messo in evidenza l'esistenza nell'uomo di una fase tardiva a livello epatico circa una ventina di minuti dopo l'iniezione (Ohlerth and O'Brien, 2007), nonché un'ulteriore fase splenica, finora mai documentata per altri mezzi di contrasto equivalenti, che perdurerebbe oltre le fasi vascolari ed epatica (Lim et al., 2004). Il meccanismo sottostante a questi eventi non è stato ancora del tutto chiarito: mentre nel caso del fegato si pensa possa essere correlata ad un accumulo a livello epatico dovuto al rallentamento o al blocco a livello di sinusoidi epatici (Leen and Horgan, 2003; Ohlerth and O'Brien, 2007); la fase splenica sarebbe invece da relazionarsi ad un tropismo selettivo per il parenchima della milza (Lim et al., 2004).

Come nel caso degli altri agenti di contrasto per i quali è documentata una fase tardiva a livello epatico, spesso definita fase sinusoidale, la valutazione del comportamento del fegato a questo secondo enhancement risulta essenziale al fine di caratterizzare lesioni focali: è stato infatti documentato come lesioni metastatiche maligne non siano contrastate in questa fase, probabilmente come conseguenza dell'assenza di sinusoidi in queste neoformazioni (Leen and Horgan, 2003; Nicolau et al., 2006).

Nella medicina umana l'ecografia con mezzo di contrasto Sonovue® è classificata come procedura a basso rischio: sono riportati in letteratura solamente effetti collaterali di lieve entità e autolimitanti, tra cui prurito, capogiri, ipotensione moderata, nausea e vomito (Piscaglia and Bolondi, 2006; Ohlerth and O'Brien, 2007). Nefrotossicità e cardiotossicità sono state escluse per questa sostanza il cui utilizzo non prevede l'obbligo di alcun test preliminare sulla funzionalità renale del paziente (Piscaglia and Bolondi, 2006). Poiché il guscio dei mezzi di contrasto di seconda generazione come il Sonovue® è composto da lipoproteine immunologicamente inerti, il loro utilizzo è sicuro anche in pazienti veterinari: la tecnica è infatti risultata ben tollerata in cani e gatti, dove non sono fin ora stati riportati effetti collaterali (Ohlerth and O'Brien, 2007). Uno studio sugli effetti renali del CEUS nel gatto ha inoltre escluso un'eventuale nefrotossicità in questa specie (Leinonen et al., 2011).

## **5.7.2 TC**

### *Caratteristiche TC*

Gli studi TC sull'iguana sono stati effettuati con una macchina multistrato, GE BrightSpeed 16 strati (Milwaukee, USA).

### *Caratteristiche MDC*

Per lo studio è stato utilizzato lo ioversolo (Optiray®), un mezzo di contrasto iodato di tipo monomero non ionico (Feltrin et al., 2004). Le caratteristiche di questa categoria di mezzi di contrasto sono indicate nel capitolo 3.1.2.

## Capitolo 6.

## RISULTATI E DISCUSSIONI

### 6.1 Furetto

#### 6.1.1 Stato di salute

Nelle Tabelle 11-13 sono riportati gli esiti delle indagini diagnostiche effettuate al fine di confermare lo stato di salute dei diversi soggetti.

Variazioni minime dai parametri di riferimento e livelli glicemici leggermente rialzati sono stati considerati non rilevanti. Cisti renali evidenziate in sede ecografica ma non associate a sintomatologia clinica o ad alterazioni emato-biochimiche sono state considerate reperti casuali.

Il furetto 7 è stato incluso nello studio nonostante il riscontro di un lieve innalzamento dei parametri renali (Tabella 12), a seguito dell'assenza di sintomatologia clinica di origine renale, del mancato riscontro di alterazioni renali a livello ecografico, e del rientro dei parametri all'interno dei range di riferimento a distanza di una settimana.

Un solo soggetto di furetto femmina di due anni è stato considerato non sano a seguito delle indagini diagnostiche (esame emato-biochimico ed ecografia standard B-mode- vedi Tabelle 11 e 12). Questo animale, denominato Furo P, è stato comunque indagato con la stessa procedura degli altri, ma non è stato incluso nell'indagine statistica dei dati.

La Tabella 14 schematizza il segnalamento di ognuno dei furetti associato all'esito globale delle indagini diagnostiche (sano o patologico).

Nome	Risultato Ecografia B-Mode
Furo 1	nessuna alterazione
Furo 2	nessuna alterazione
Furo 3	nessuna alterazione
Furo 4	linfonodi leggermente ingrossati
Furo 5	nessuna alterazione
Furo 6	nessuna alterazione
Furo 7	nessuna alterazione
Furo 8	cisti renali a dx
Furo 9	materiale iperecogeno nella cistifellea
Furo 10	piccola cisti al rene sinistro
Furo P	Milza, Reni e Linfonodi alterati; sospetto Linfoma

Tabella 11. Riscontri anomali durante l'esame ecografico B-Mode nei furetti. Negli altri soggetti non si era messa in evidenza alcuna alterazione.

Nome	BUN	Bil Tot	Crea	Glu	TP	Alb	Glob	ALT	ALP	ca	Ca corr	P	Na	K
Range	dic-43	<1	0,2 - 0,6	62,5 - 134	5,3 - 7,2	3,3 - 4,1	±2	82 - 289	30 - 120	8,6 - 10,5	5,6 - 8,7	146 - 160	4,3 - 5,3	
Furo 1	35	0,3	0,6	113	5,4	4	1,4	59	51	8,9	8,4	5,4	138	5,5
Furo 2	39	0,3	0,5	95	6,3	4,6	1,7	55	20	9,3	8,2	6,3	146	5,2
Furo 3	35	0,8	0,6	210	6	3,2	2,8	112	69	10	10,3	6	140	5
Furo 4	21	0,2	0,2	118	5,8	3,4	2,4	103	15	9,8	9,9	5,9	144	4,4
Furo 5	19	0,2	0,3	105	5,1	3,8	1,3	132	41	11	10,7	7,2	148	4,8
Furo 6	29	0,2	0,4	110	5	3,2	1,9	261	69	10,3	10,6	8,9	145	4,8
Furo 7	49	0,3	1,2	157	6	3,5	2,5	93	21	10	10	7,8	147	5
Furo 8	22	0,2	0,4	97	6,8	3,3	3,5	103	37	9,6	9,8	6,4	146	4,7
Furo 9	25	0,3	0,4	107	6,1	3,9	2,2	135	29	9,6	9,2	6,4	147	5,2
Furo 10	25	0,4	0,6	97	5,6	3,5		66	35	9,8	9,8	5,9	149	5,2
Furo P	114	0,2	0,8	125	6,1	3,2	2,9	294	41	9,1	9,4	9,6	150	4,7

Tabella 12. Esiti dell'esame biochimico nei furetti.

Nome	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	WBC	neu %	linfo %	mono %	PLT	lettura striscio
Range	6,8 - 12,1	15 - 18	42 - 61	-	-	-	apr-19	nov-84	dic-54	0 - 9	297 - 910	
Furo 1	7,84	13,8	47,9	64	18,4	28,9	5,1	59	33	8	538	
Furo 2	9,18	16,1	55,6	61	17,6	29	9,3	54	39	7	660	
Furo 3	8,9	14,7	52	58	17	28	4,7	41	58	1	211	
Furo 4	9,5	14,5	54	57	15	27	8,3	42	50	0	521	anisocitosi, policromasia
Furo 5	9,7	14,7	57	58	15	26	8,3	19	69	3	926	
Furo 6	8,1	13	32	40	16	41	10,4	54	22	9	868	eosinofili
Furo 7	9,9	15,7	52	53	16	30	8,5	19	68	4	492	eosinofili, linfo attivati
Furo 8	8,9	14,5	45	50	16	32	11,9	55	36	5	446	
Furo 9	7,7	12,7	43	56	17	30	5,8	39	54	3	550	
Furo 10	6,9	13	43	50	15	31	6,9	39	57	2	451	linfociti attivati
Furo P	5,4	8,6	30	55	16	29	9,5	19	78	1	296	anisocitosi; linfo attivati

Tabella 13. Esiti dell'emocromo nei furetti.

Nome	Sesso	Età (mesi)	Peso (Kg)	sano/patologico
Furo 1	F	18	0,9	S
Furo 2	MC chir	18	1,5	S
Furo 3	MC chir	36	1,2	S
Furo 4	F	24	0,93	S
Furo 5	F	4	1,07	S
Furo 6	M	4	1,48	S
Furo 7	M	7	1,6	S
Furo 8	F	34	0,77	S
Furo 9	MC des	26	1,6	S
Furo 10	MC des	22	1,44	S
Furo P	F	24	0,75	P

Tabella 14. Segnalamento ed esito delle indagini diagnostiche negli 11 furetti investigati.

### 6.1.2 CEUS

In generale, l'applicazione della metodica CEUS nella specie furetto non ha presentato particolari difficoltà in merito sia all'esecuzione che all'interpretazione dei dati. L'approccio è risultato semplice per entrambi gli organi indagati e la metodica si è rivelata facilmente eseguibile senza bisogno di alcuna sedazione. In particolare, l'utilizzo di paste multivitaminiche ha permesso un facile contenimento dell'animale nella maggior parte dei casi.

I risultati ottenuti dall'elaborazione statistica dei soggetti sani sono schematizzati nella Tabella 15. Per quanto riguarda il fegato, il picco calcolato è stato di  $37,13\% \pm 7,6$ , raggiunto in una media di  $23,39 \pm 4,59$  secondi, con un tempo di transito medio (MTT) di  $39,66 \pm 6,31$  secondi. Il volume sanguigno regionale (RBV) era  $1828,25 \pm 594,47$  e il flusso (RBF) era  $43,34 \pm 11,48$ .

Nel caso invece della milza, il picco era del  $33,12\% \pm 12,3$ , con un tempo di raggiungimento (TTP, time to peak) di  $24,25 \pm 5,5$  secondi e un MTT di  $36,71 \pm 7,19$  secondi; RBV era  $1458,86 \pm 701,77$  mentre RBF era di  $39 \pm 14,37$ .

Per quanto riguarda invece i valori di mediana calcolati a partire dai parametri renali, il picco è risultato essere  $41,2\%$ , con un TTP di  $14,07$  secondi, un MTT di  $26,95$  secondi, un RBV di  $667,40$  e un RBF di  $52,68$ .

Questi risultati sono in linea con i precedenti studi effettuati sul cane sia per quanto riguarda il fegato (Ziegler et al., 2003; Nyman et al., 2005), che la milza (Ohlerth et al., 2007).

		N	Media	Deviazione Standard	Mediana
Fegato	peak [%]	10	37,13	7,60	39,40
	TTP [sec]	10	23,39	4,59	21,40
	MTT [sec]	10	39,66	6,31	39,60
	RBV	10	1.828,25	594,47	1.739,60
	RBF	10	43,34	11,48	48,00
Milza	peak [%]	10	33,12	12,30	35,10
	TTP [sec]	10	24,25	5,50	26,10
	MTT [sec]	10	36,71	7,19	38,10
	RBV	10	1.458,86	701,77	1.288,40
	RBF	10	39,00	14,37	42,80
Rene sinistro	peak [%]	5	43,70	13,20	41,20
	TTP [sec]	5	14,81	6,67	14,10
	MTT [sec]	5	27,20	11,58	27,00
	RBV	5	1.233,43	992,91	667,40
	RBF	5	55,27	18,70	52,70

**Tabella 15. Elaborazione statistica dei risultati dell'analisi CEUS dei furetti sani.**

In tutti i casi l'andamento della curva (Figure 6-42) ha messo in evidenza una fase di wash in, con progressivo e rapido aumento della concentrazione di mezzo di contrasto a livello di organo fino al raggiungimento di un picco, seguita da una fase di wash out, generalmente più lenta. Tuttavia, si può notare come la curva risulti più regolare tra i diversi soggetti nel caso del fegato, mentre maggiore variabilità caratterizza le curve relative alla milza. Sebbene le curve renali presentino a loro volta una certa variabilità tra i furetti indagati, queste appaiono generalmente più alte e strette, con wash in molto rapidi e wash out variabili (Figure 36-42). Queste affermazioni dedotte dall'analisi visiva dei grafici sono confermate dalla registrazione di valori di deviazione standard inferiori nei parametri relativi allo studio CEUS a livello epatico rispetto a milza e rene, e da un valore medio di picco maggiore associato ad un TTP inferiore registrato a livello renale rispetto agli altri organi investigati (Tabella 15).

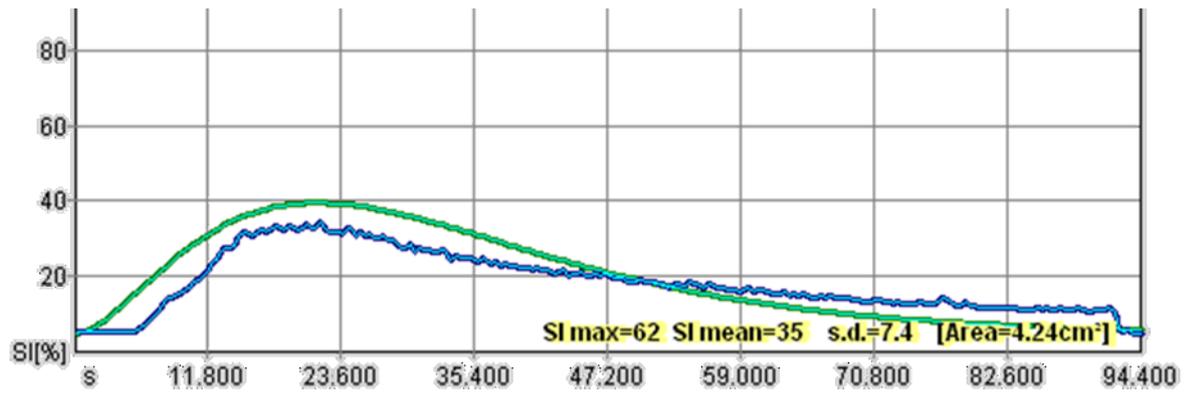


Figura 6. CEUS del Fegato di Furo 1.

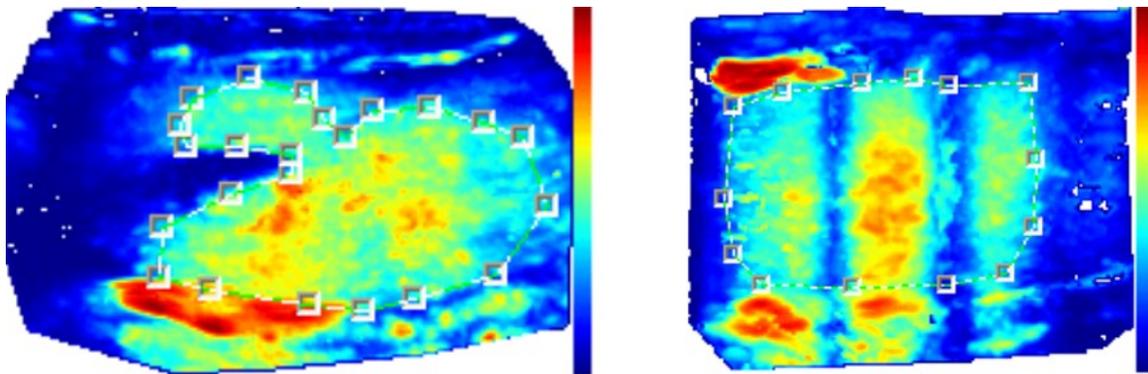


Figura 7. Aree di calcolo del CEUS nel Fegato di Furo 1 (sinistra) e Furo 2 (destra).

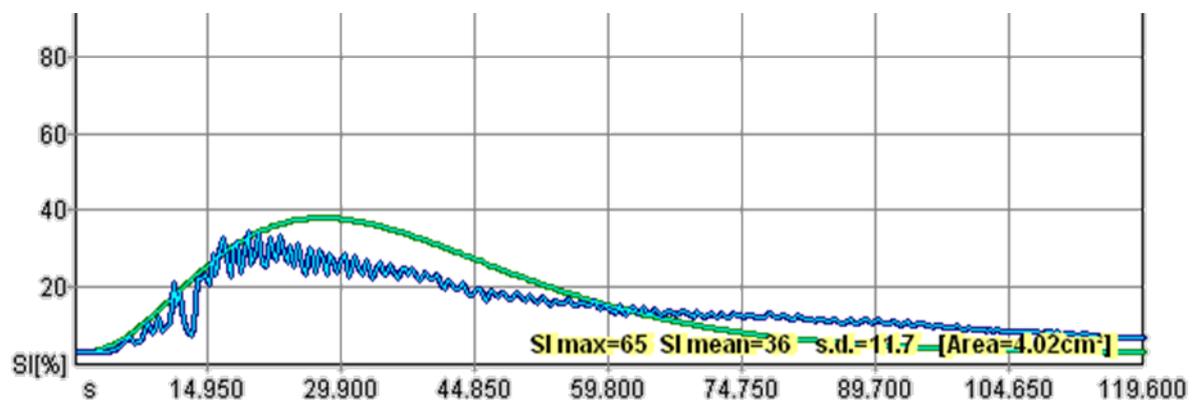


Figura 8. CEUS del Fegato di Furo 2.

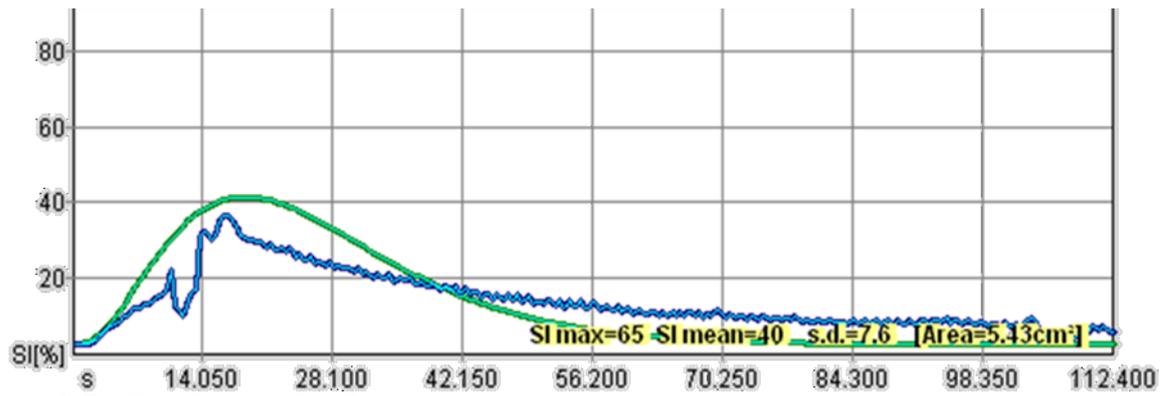


Figura 9. CEUS del Fegato di Furo 3.

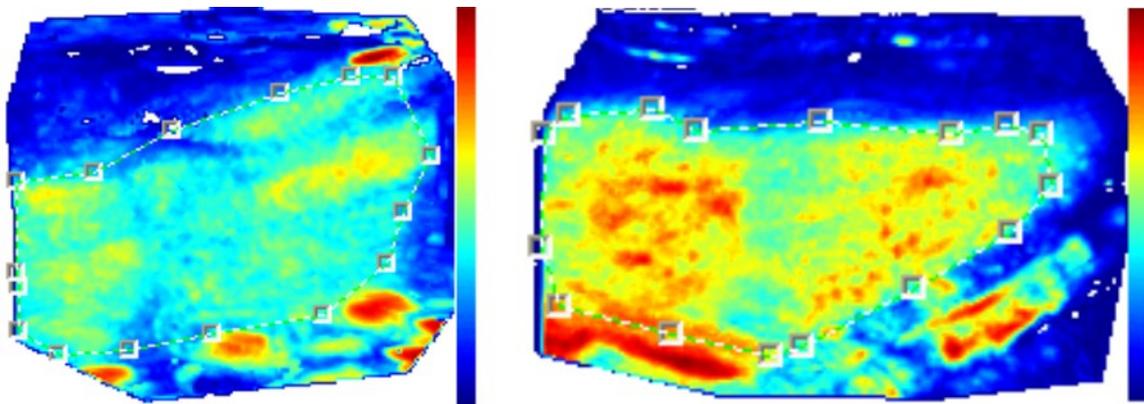


Figura 10. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Furo 3 (sinistra) e Furo 4 (destra).

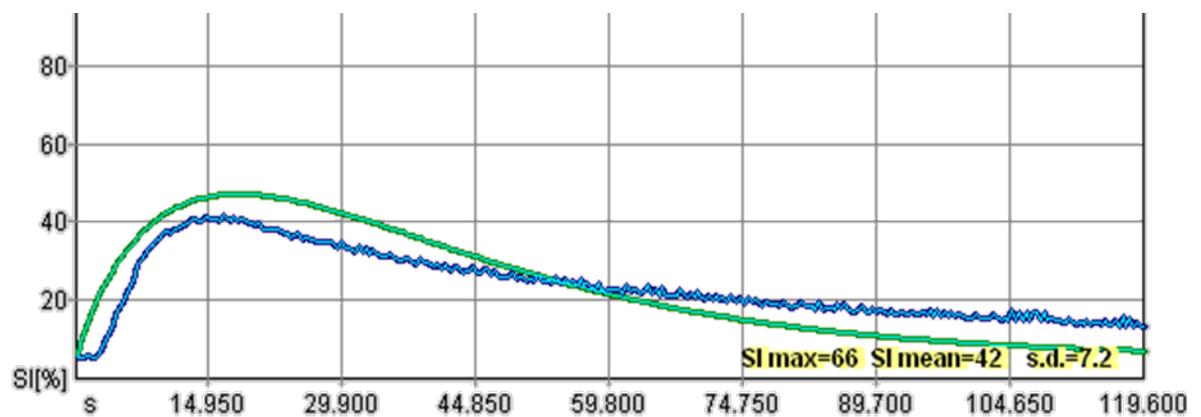


Figura 11. CEUS del Fegato di Furo 4

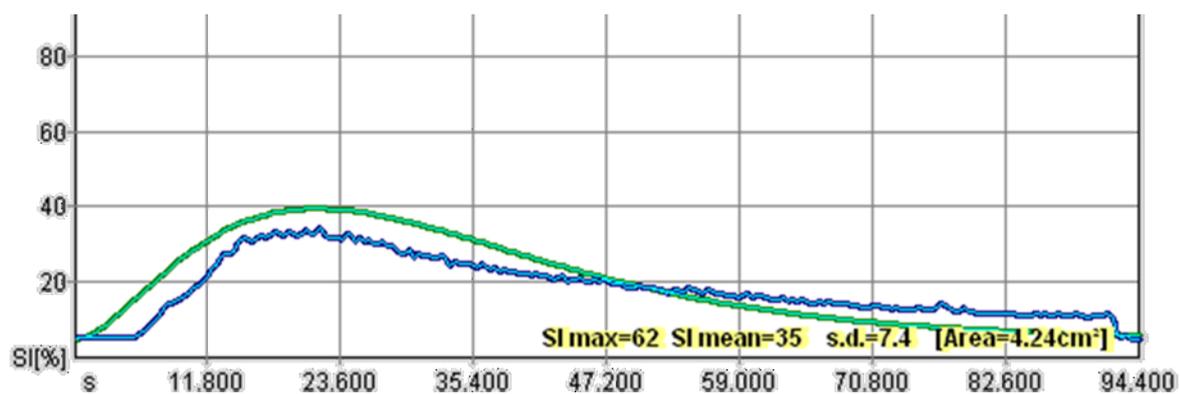


Figura 12. CEUS del Fegato di Furo 5.

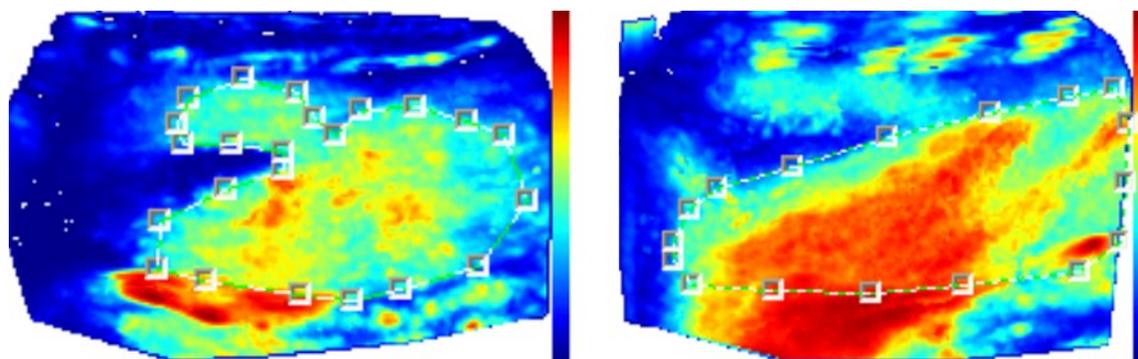


Figura 13. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Furo 5 (sinistra) e Furo 6 (destra).

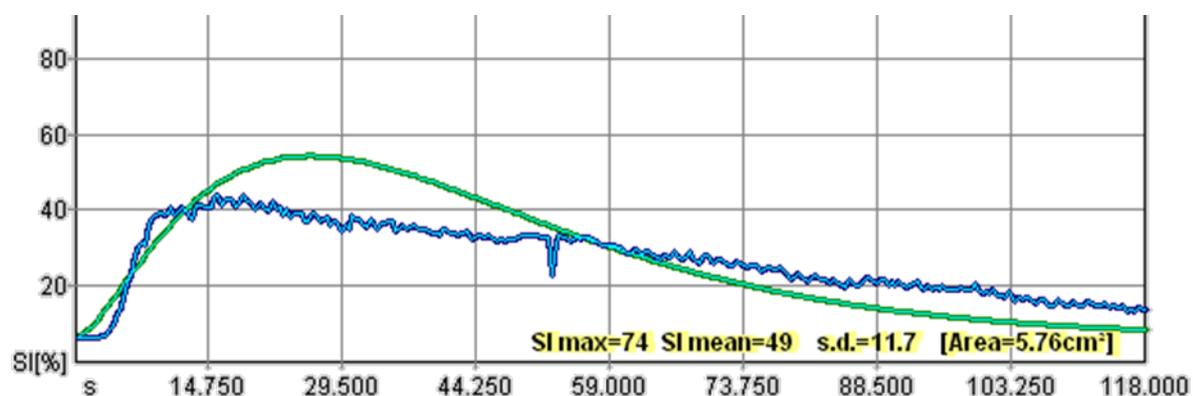


Figura 14. CEUS del Fegato di Furo 6.

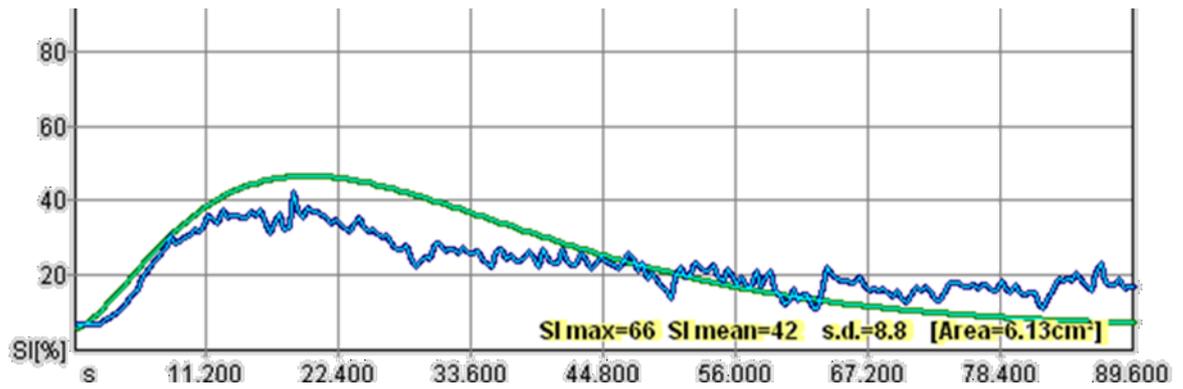


Figura 15. CEUS del Fegato di Furo 7.

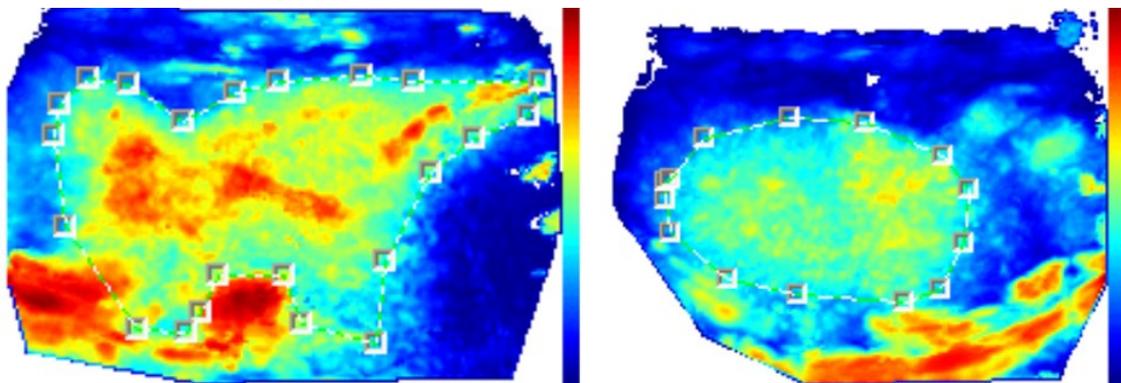


Figura 16. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Furo 7 (sinistra) e Furo 8 (destra).

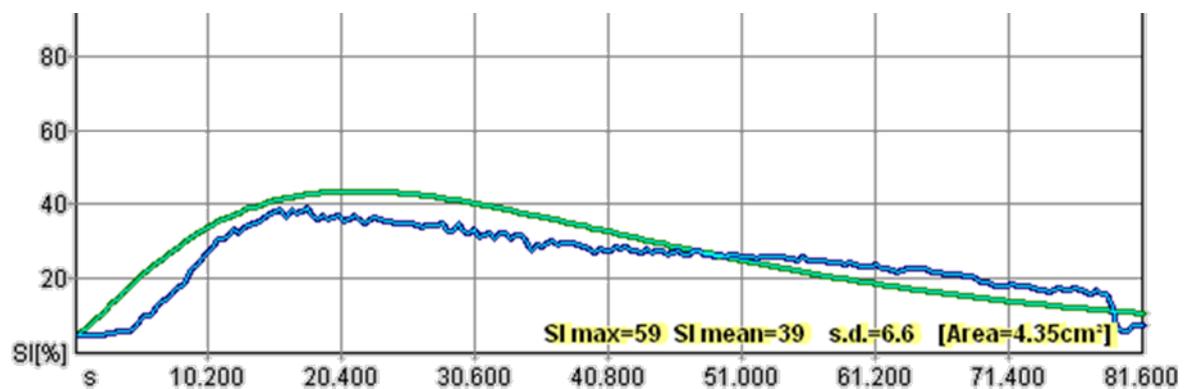


Figura 17. CEUS del Fegato di Furo 8.

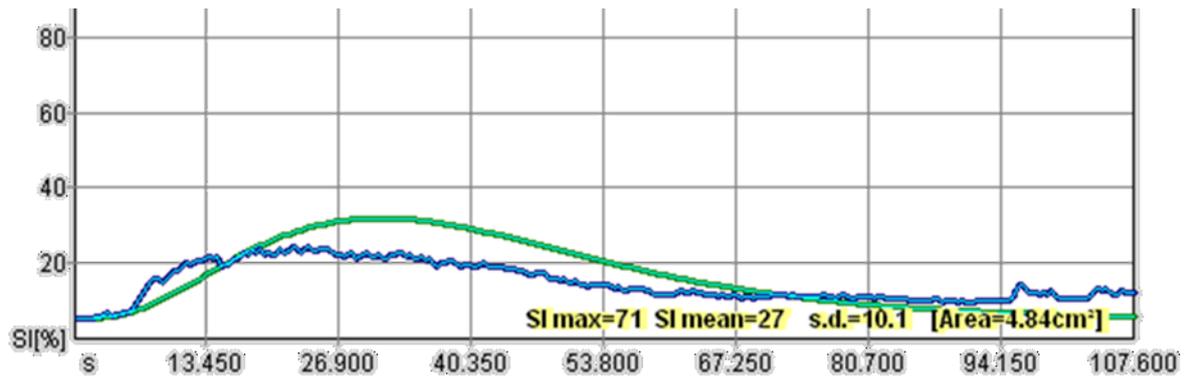


Figura 18. CEUS del Fegato di Furo 9.

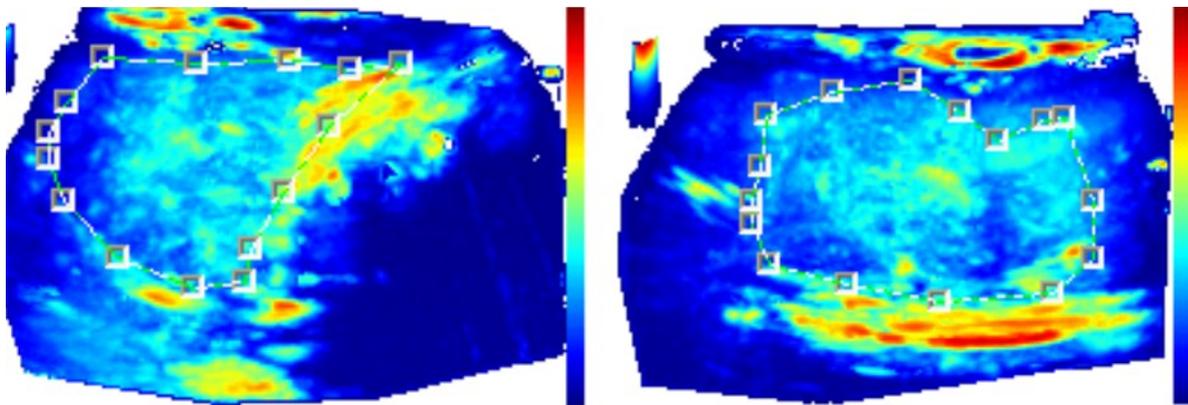


Figura 19. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Furo 9 (sinistra) e Furo 10 (destra).

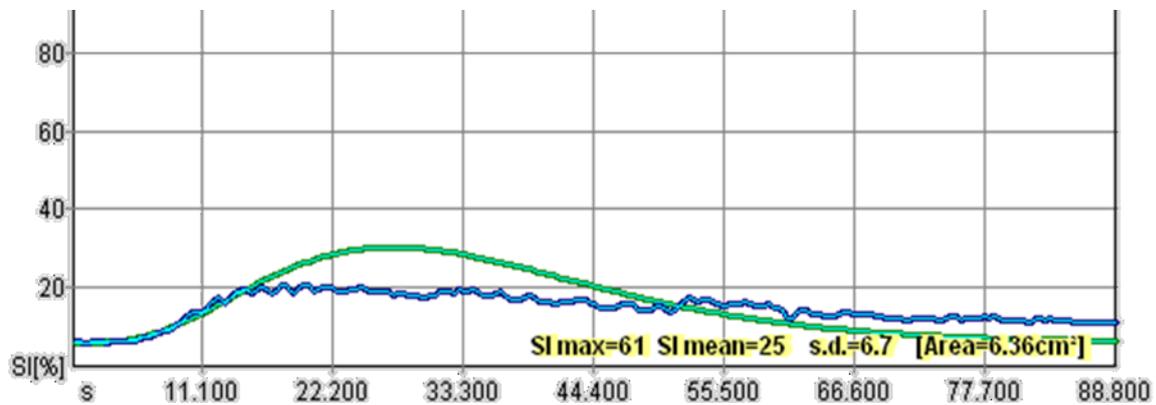


Figura 20. CEUS del Fegato di Furo 10.

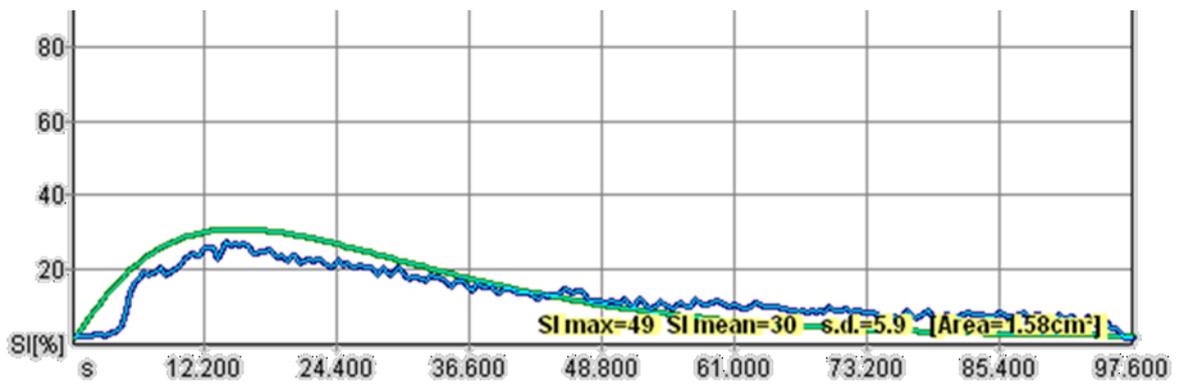


Figura 21. CEUS della Milza di Furo 1.

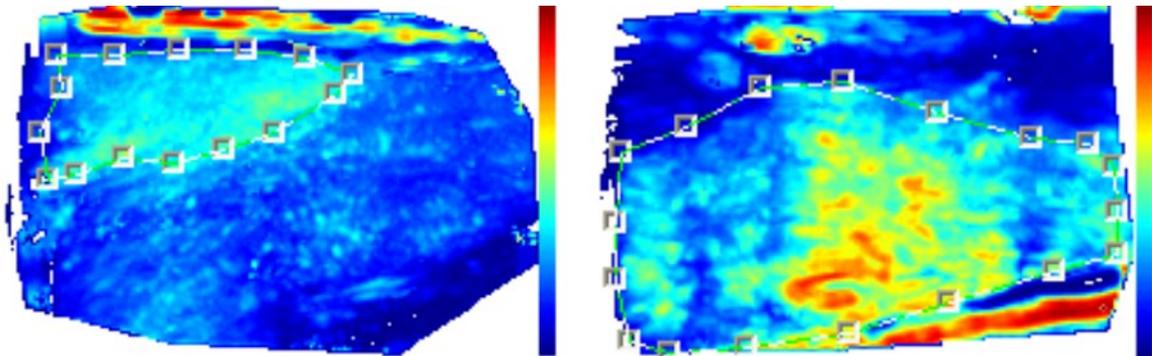


Figura 22. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Furo 1 (sinistra) e Furo 2 (destra).

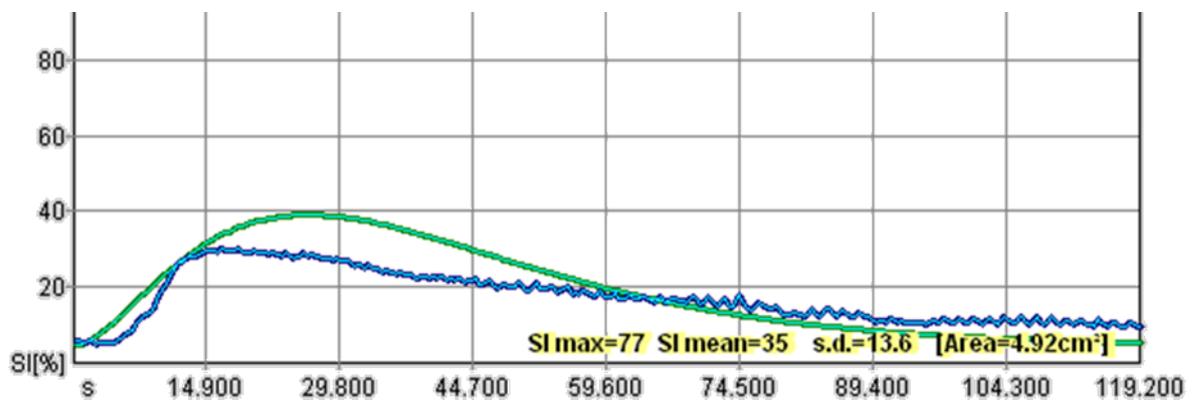


Figura 23. CEUS della Milza di Furo 2.

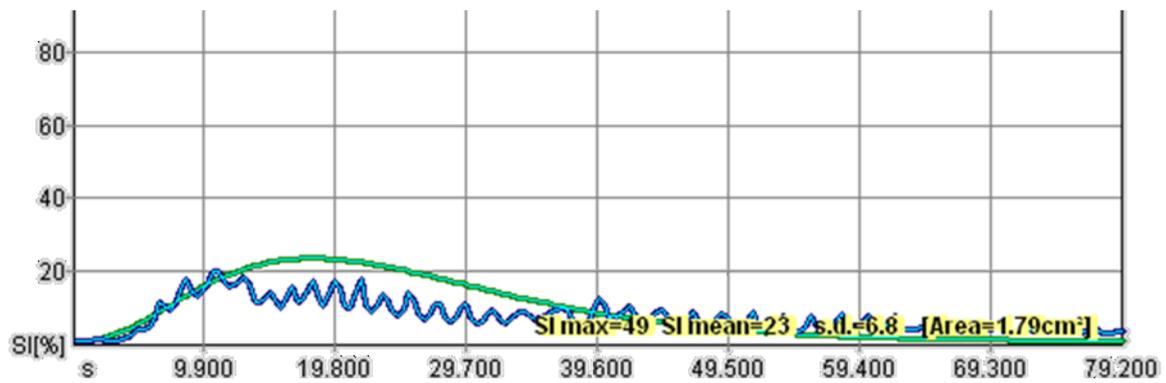


Figura 24. CEUS della Milza di Furo 3.

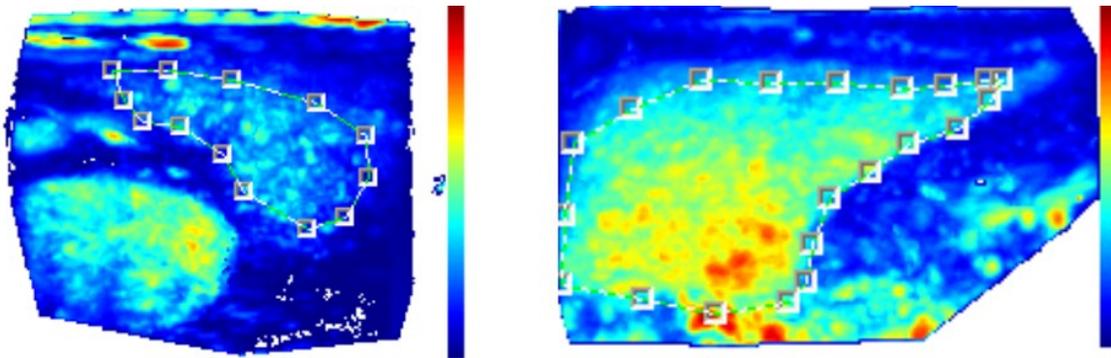


Figura 25. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Furo 3 (sinistra) e Furo 4 (destra).

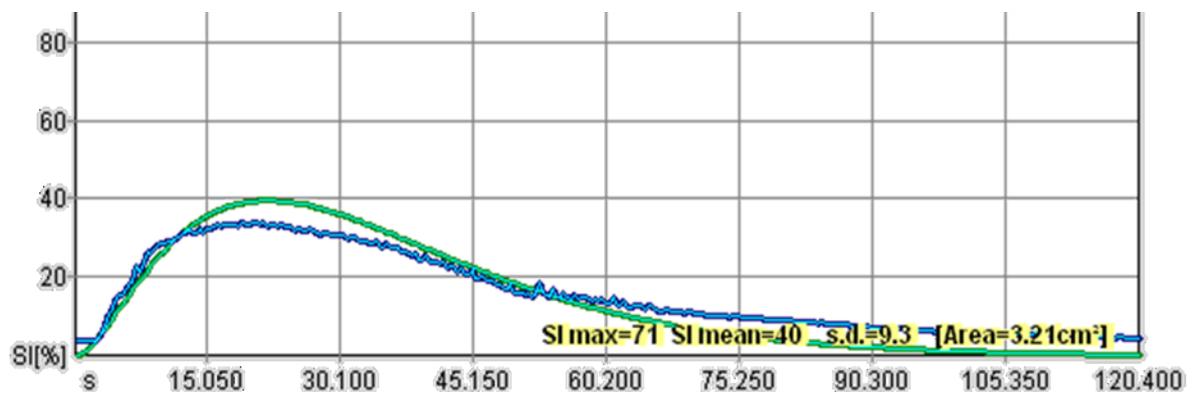


Figura 26. CEUS della Milza di Furo 4.

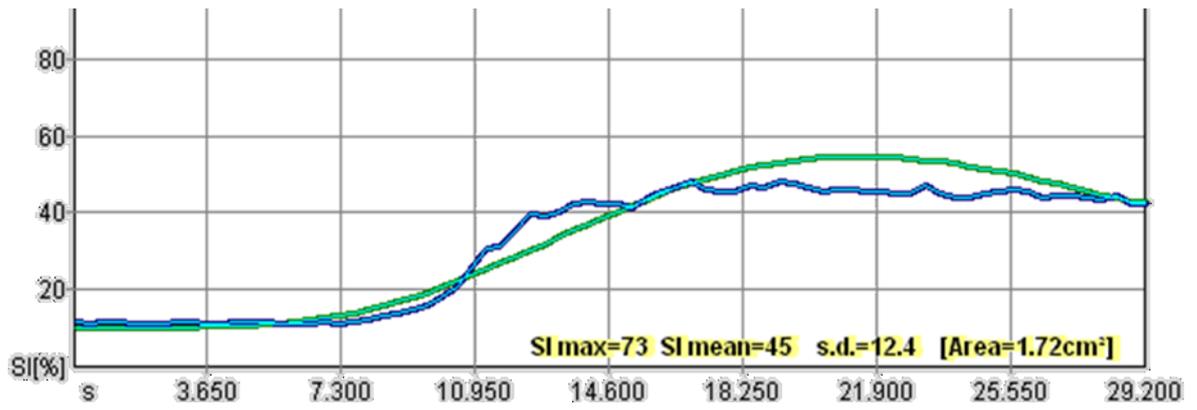


Figura 27. CEUS della Milza di Furo 5.

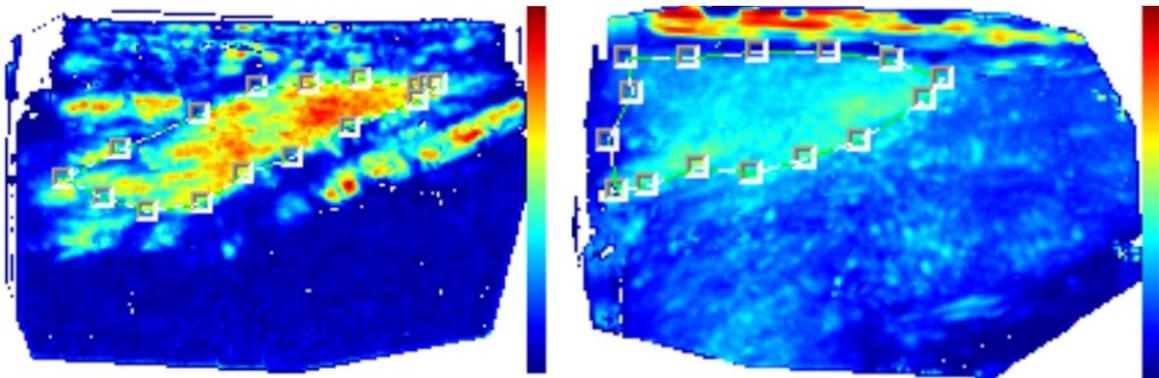


Figura 28. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Furo 5 (sinistra) e Furo 6 (destra).

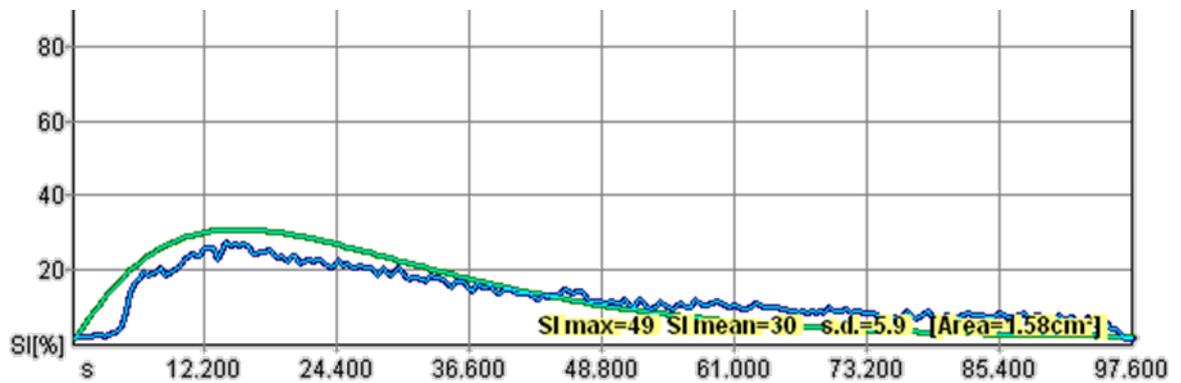


Figura 29. CEUS della Milza di Furo 6.

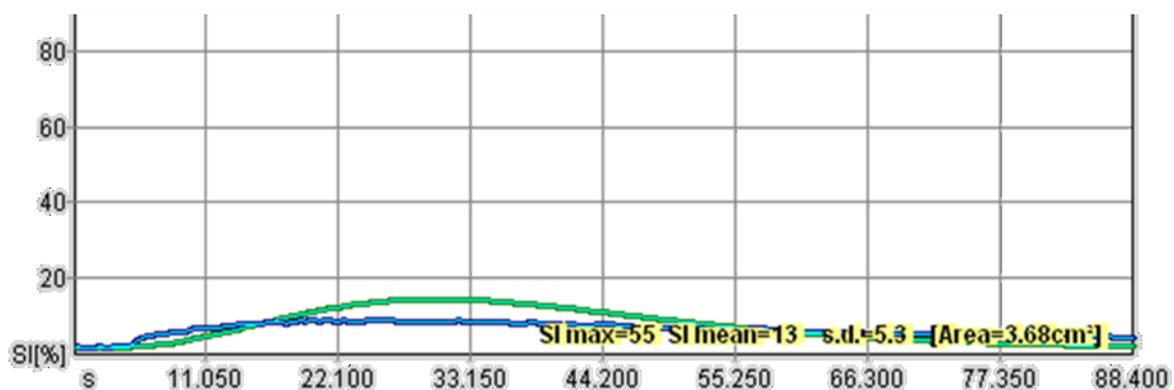


Figura 30. CEUS della Milza di Furo 7.

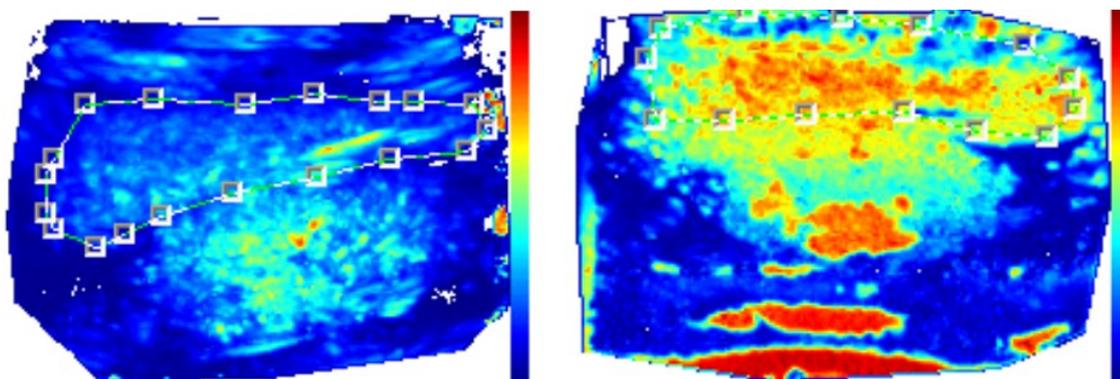


Figura 31. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Furo 7 (sinistra) e Furo 8 (destra).

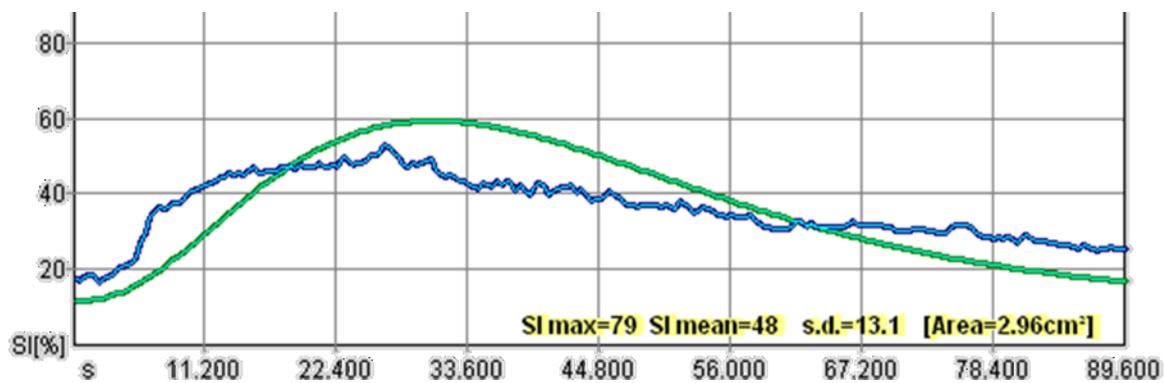


Figura 32. CEUS della Milza di Furo 8.

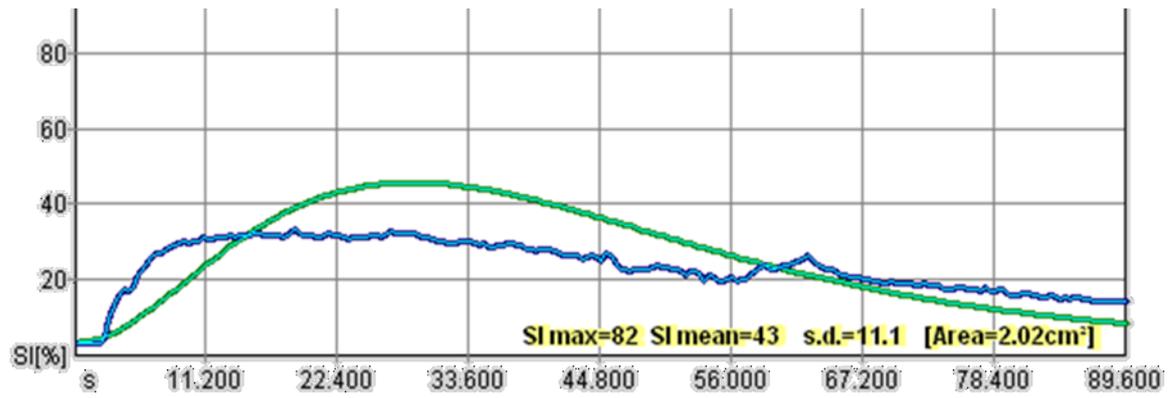


Figura 33. CEUS della Milza di Furo 9.

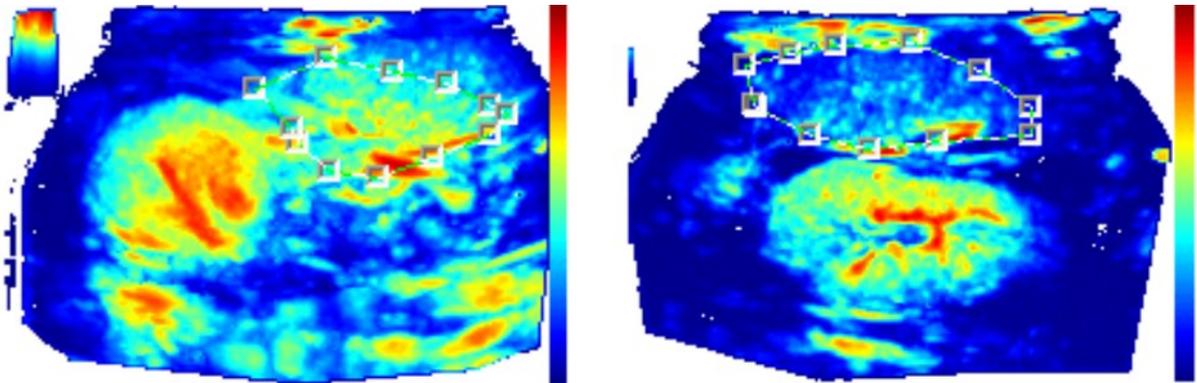


Figura 34. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Furo 9 (sinistra) e Furo 10 (destra).

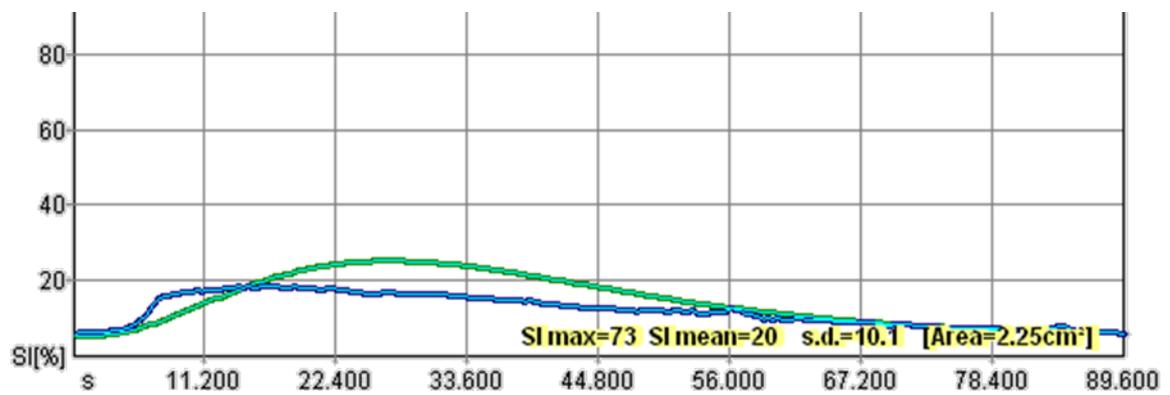


Figura 35. CEUS della Milza di Furo 10.

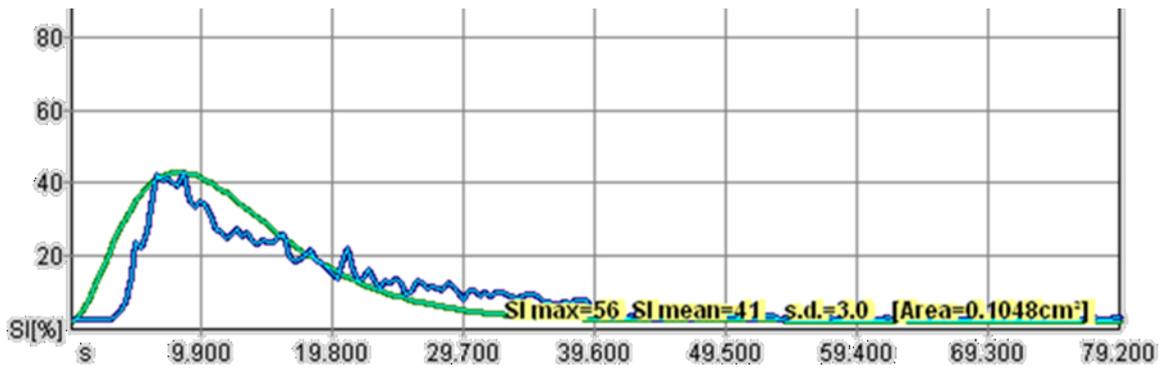


Figura 36. CEUS del Rene Sinistro di Furo 3.

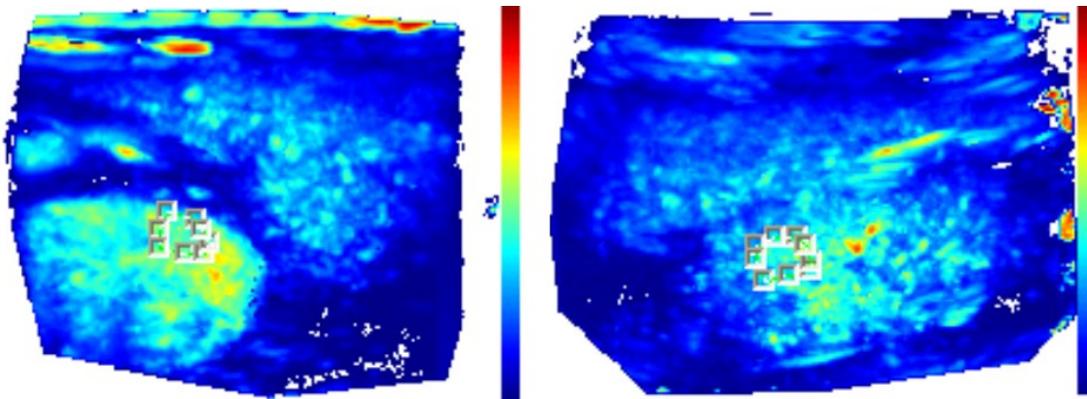


Figura 37. Area di calcolo del CEUS nel Rene Sinistro di Furo 3 (sinistra) e 7 (destra).

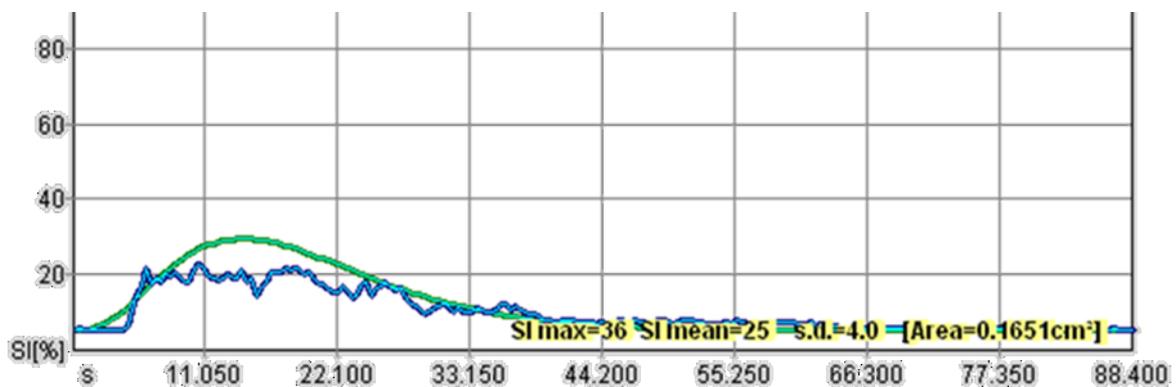


Figura 38. CEUS del Rene Sinistro di Furo 7.

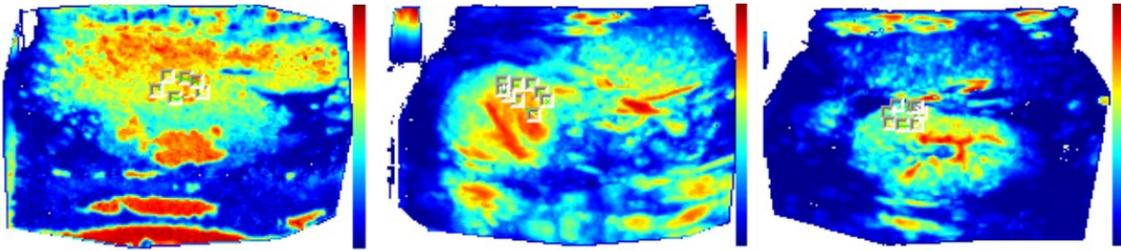


Figura 39. Area di calcolo del CEUS nel Rene Sinistro di Furo 8 (sinistra) e Furo 9 (destra).

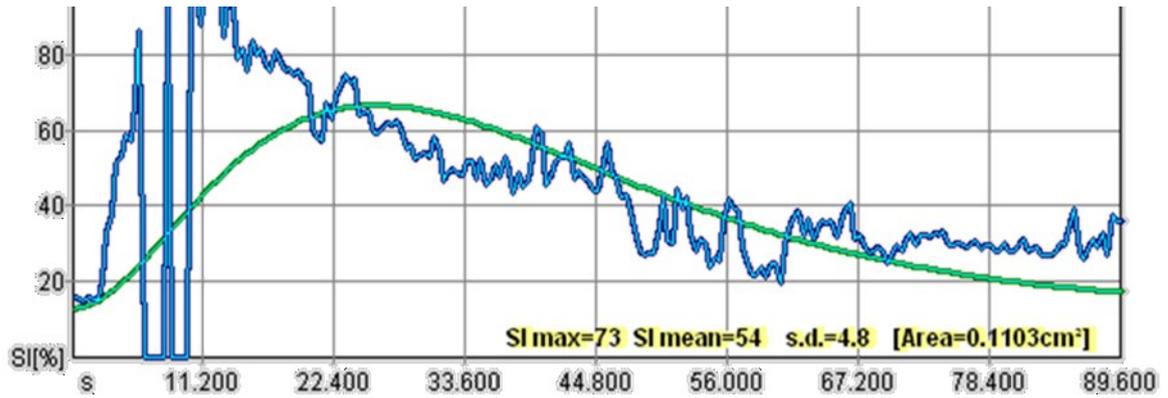


Figura 40. CEUS del Rene Sinistro di Furo 8.

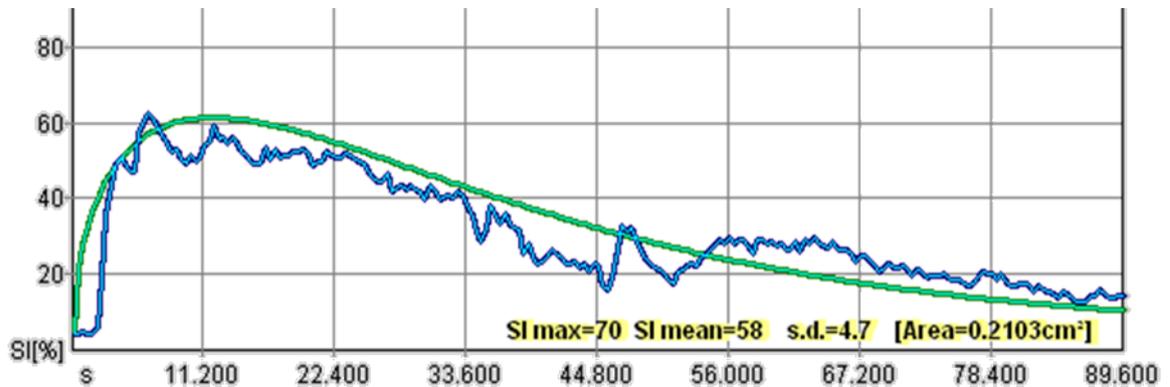


Figura 41. CEUS del Rene Sinistro di Furo 9.

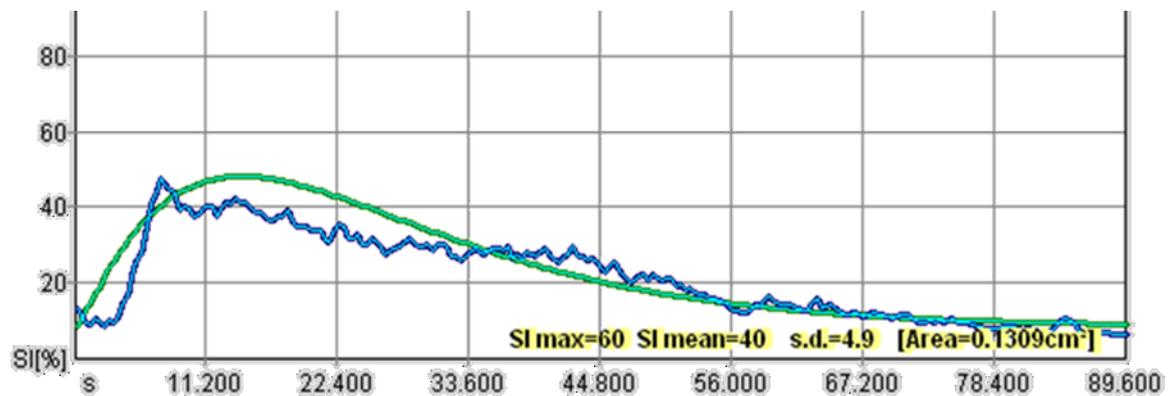


Figura 42. CEUS del Rene Sinistro di Furo 10.

### 6.1.3 Applicazione della tecnica CEUS al caso patologico Furo P

Il furetto Furo P è stato escluso a seguito del riscontro di parametri renali molto alterati all'esame biochimico e di alterazioni renale e linfonodale durante l'esame ecografico B mode. Sebbene non vi fosse sospetto di patologia a livello epatico o splenico, si è ritenuto che la condizione renale non permettesse una valutazione oggettiva di perfusione anche degli altri organi.

Nella Tabella 16 sono messi a confronto i valori riscontrati nel furetto P con la media  $\pm$  deviazione standard dei soggetti sani.

	FEGATO		MILZA	
	Media e Deviazione Standard sani	Furo P	Media e Deviazione Standard sani	Furo P
Peak (%)	37,13% $\pm$ 7,6	53,2	33,12 % $\pm$ 12,3	58,5
TTP (sec)	23,39 $\pm$ 4,59	18,84	24,25 $\pm$ 5,5	16,59
MTT (sec)	39,66 $\pm$ 6,31	47,43	36,71 $\pm$ 7,19	51,29
RBV	1828,25 $\pm$ 594,47	3378,36	1458,86 $\pm$ 701,77	3885,14
RBF	43,34 $\pm$ 11,48	71,23	39 $\pm$ 14,37	75,75

Tabella 16. Confronto tra i valori medi ottenuti dallo studio CEUS nei soggetti sani e nel furetto patologico Furo P.

A seguito della mancata visualizzazione del contrasto dopo la dose di Sonovue® utilizzata da protocollo, la dose utilizzata nel Furetto P è stata nettamente superiore rispetto agli altri animali, pari a 0,045 mg/kg contro 0,02 mg/kg.

Per quanto riguarda il fegato il furetto P ha raggiunto un picco più elevato in tempi più rapidi comparati con la media dei soggetti sani, mentre il MMT è stato maggiore, così come i valori relativi a RBF e RBV. Queste stesse alterazioni si riscontrano anche a livello splenico, dove sono ulteriormente esacerbate. Per quanto concerne il pattern generale della curva non si sono invece evidenziate particolari differenze (Figure 43-45).

Questa situazione, indipendentemente dal dosaggio impiegato, può essere associata a variazioni emodinamiche conseguenti alla patologia renale, più che a una condizione patologica intrinseca degli organi investigati.

Purtroppo, in questo caso il rene non era incluso nella finestra di studio, pertanto non è stato possibile ottenere il confronto con gli altri soggetti sani rispetto ai valori ottenuti dal CEUS per questo organo.

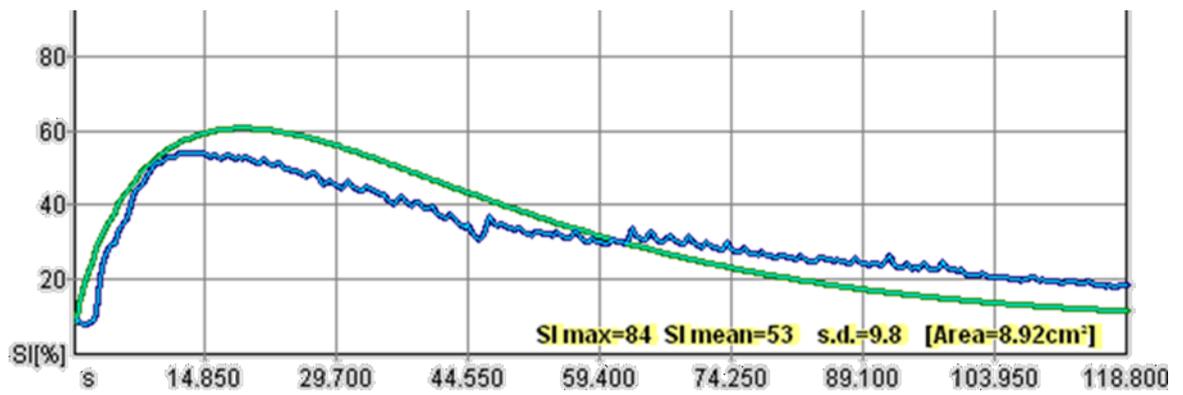


Figura 43. CEUS del Fegato di Furo P.

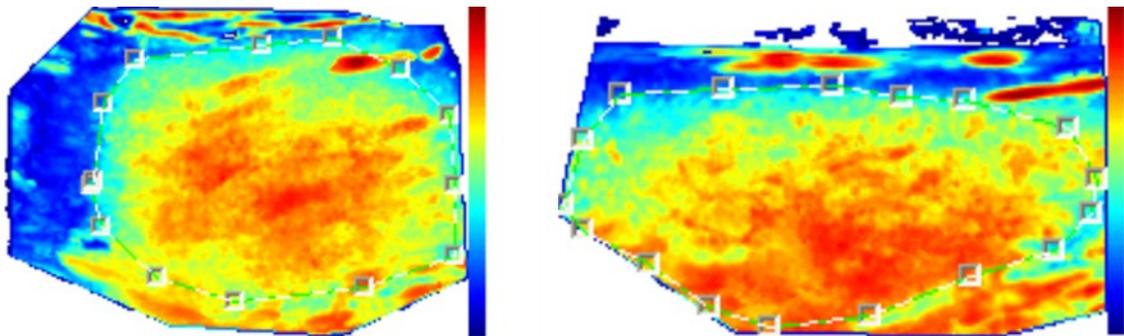


Figura 44. Area di calcolo del CEUS nel Fegato (sinistra) e nella Milza (destra) di Furo P.

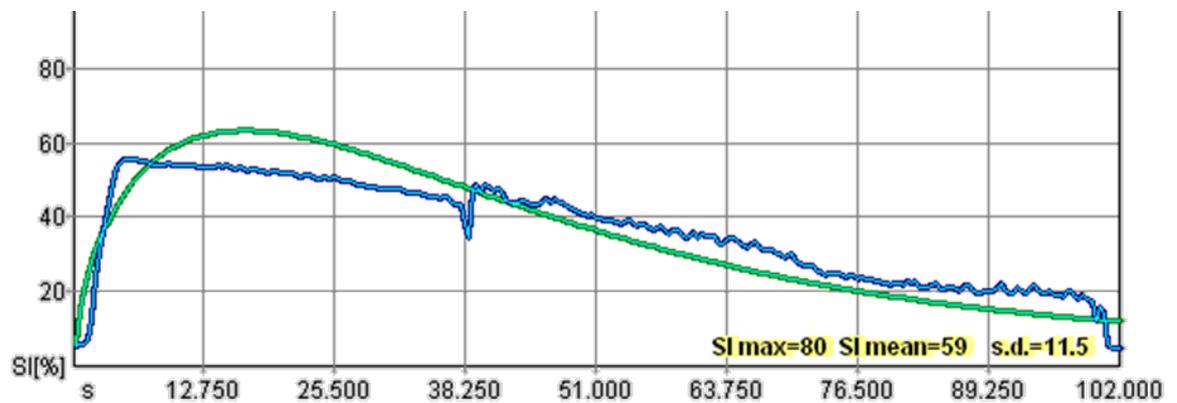


Figura 45. CEUS della Milza di Furo P.

## 6.2 Coniglio

### 6.2.1 Stato di salute

A seguito delle indagini diagnostiche effettuate, i cui esiti sono riportati nelle tabelle 18 e 19, tutti i soggetti sono risultati sani e sono pertanto stati inclusi nello studio (Tabella 17).

Lievi spostamenti rispetto ai parametri di riferimento sono state considerate non rilevanti, ed associate ad una variabilità individuale.

L'ipoalbuminemia associata ad iperglobulinemia messa in evidenza nella maggior parte dei soggetti è stata considerata come parafisiologica, associata eventualmente a un calo dell'alimentazione in ambiente non conosciuto o allo stress; all'ipercalcemia riscontrata in diversi soggetti è invece stata attribuita una causa dietetica. I valori particolarmente elevati di glicemia sono stati associati allo stress da prelievo.

Sebbene sia riportato come aumenti della fosfatasi alcalina possano essere legati all'attività osteoblastica normale in soggetti giovani, i range di riferimento di ALP e amilasi disponibili in letteratura non sono stati considerati in nessun caso idonei ad una corretta valutazione degli esami. Le difficoltà interpretative per quanto riguarda gli esiti degli esami emato-biochimici del coniglio si sono fatte risalire al fatto che la maggior parte dei dati esistenti in letteratura si riferisce ai conigli da laboratorio, appartenenti per lo più alla razza neozelandese e stabulati in ambienti controllati (Melillo, 2007; Marshall, 2008; Washington and Hoosier, 2012). Alterazioni nella normale conta differenziale dei globuli bianchi sono state associate, secondo letteratura, allo stress. Allo stesso modo, la presenza di aggregati piastrinici e livelli moderati di policromasia e anisocitosi sono stati considerati normali (Melillo, 2007).

Nessuna alterazione è stata individuata in corso di esame ecografico standard B-Mode.

nome	sexo	età (mesi)	peso (Kg)	sano/patologico
Cuni 1	MC	12	1,4	S
Cuni 2	MC	18	1,6	S
Cuni 3	F	24	1,18	S
Cuni 4	MC	10	1,58	S
Cuni 5	MC	36	2,5	S
Cuni 6	MC	5	1,5	S
Cuni 7	MC	5	2	S
Cuni 8	F	6	1,3	S
Cuni 9	MC	5	1,3	S
Cuni 10	F	24	1,7	S

Tabella 17. Segnalamento ed esiti delle indagini diagnostiche nei 10 conigli.

Nome	BUN	Bil Tot	Crea	Glu	PT	Alb	Glob	ALT	ALP	Amilasi	ca	Ca corr	P	Na	K
range	15 - 23,5	0,25 - 0,74	0,5 - 2,5	75 - 150	2,8 - 10	2,7 - 4,6	1,5 - 2,8	48 - 80	apr-16	200 - 400	nov-14	4 - 6,5	4 - 6,5	138 - 150	3,5 - 6,9
Cuni 1	12	0,2	0,8	276	6,4	2,5	3,9	48	45	152	13,7	14,7	1,3	139	3,6
Cuni 2	18	0,2	0,7	164	6	2,5	4								
Cuni 3	12	0,2	0,7	209	6,7	2,3	4,5	49	48	205	14,1	15,3	2,2	142	3,9
Cuni 4	18	0,2	1,1	169	6,9	2,5	4,4	58	40	211	15,1	16,1	4,1	152	5
Cuni 5	14	0,1	1,2	131	6,7	2,2	4,5	67	46	195	14	15,3	4,1	141	4,2
Cuni 6	16	0,1	0,9	138	7,3	2,5	4,8	71	101	282	15	16	4,6	138	0,3
Cuni 7	18	0,2	0,9	118	6,8	2,5	4,3	63	142	158	15,1	16,1	5	141	4,6
Cuni 8	20	0,1	0,8	187	6,8	2,4	4,4	61	61	251	15,3	16,4	5,1	148	4,1
Cuni 9	19	0,1	0,6	167	6,7	2,3	4,4	56	77	190	14,7	15,9	4,5	145	4
Cuni 10	13	0,2	0,7	144	7	2,4	4,6	62	40	155	14,2	15,3	2,5	144	4,4

Tabella 18. Esito del biochimico nei conigli.

Nome	RBC	Hb	Hct	MCV	MCH	MCHC	WBC	% eter	%linfo	%mono	PLT	lettura striscio
Range	4 - 7,2	10 - 15,5	36 - 48	-	-	-	7,5 - 13,5	20 - 35	55 - 80	01-apr	200 - 100	
Cuni 1	6,5	13,7	47	72	21	29,1	8,9	53,9	42	0,3	483	
Cuni 2	5,5	13,9	36	67	20,4	30,9						
Cuni 3	4,2	8,6	28	67	20,3	30,3	4,4	80	20			aggregati piastrinici
Cuni 4	7,2	14,2	46	64	19,7	30,6	5,2	71	24	5	317	aggregati piastrinici
Cuni 5	5,5	11,3	36	66	20,6	31,2	11,5	5	95		323	policromasia e anisocitosi ++
Cuni 6	7,6	15,1	46	60	19,9	32,9	11,6	6	94		386	policromasia++
Cuni 7	7	14,1	44	63	20,1	32,1	8,1	14	83	2	315	
Cuni 8	6,9	14,1	49	71	20,6	29,1	7,2	19	81		391	
Cuni 9	7	12,7	41	59	18,3	31,1	9,3	89	9	2	489	aggregati piastrinici
Cuni 10	6,6	13,7	44	66	20,7	31,3	7,4	72	27	1	473	

Tabella 19. Esito dell'emocromo nei conigli.

## 6.2.2 CEUS

Nel coniglio, la tecnica CEUS è risultata di facile applicazione nel caso del fegato, mentre le piccole dimensioni della milza in questa specie la rendono a volte difficile da esaminare anche con la sonda lineare. In generale, tuttavia, il facile contenimento di questi animali, che spesso entrano in una sorta di trance durante tutto il periodo di indagine, rende possibile una ricerca minuziosa dell'organo ed un corretto posizionamento della sonda per l'esecuzione del CEUS.

I risultati ottenuti dall'elaborazione statistica dei dati sono schematizzati nella Tabella 20. Per quanto riguarda il fegato il picco medio calcolato è stato di  $36,66 \% \pm 15,25$ , con TTP di  $25,92 \pm 5,13$  sec., MTT di  $52,23 \pm 12,87$  sec., RBV  $2680,36 \pm 1450,93$  e RBF  $47,50 \pm 19,70$ . A livello splenico, invece, il picco è stato di  $45,62 \pm 16,12$  %, raggiunto in  $27,01 \pm 7,55$  sec. L'MTT era di  $52,67 \pm 14,23$  sec., il RBV  $3244,86 \pm 1720,35$  e il RBF  $57,68 \pm 21,05$ .

Questi risultati sono in linea sia con precedenti studi effettuati nel cane, sia con i valori ottenuti nei furetti, per quanto riguarda sia il fegato (Ziegler et al., 2003; Nyman et al., 2005), che la milza (Ohlerth et al., 2007).

		N	Media	Deviazione Standard	Mediana
Fegato	peak [%]	10	36,66	15,25	37,13
	TTP [sec]	10	25,92	5,13	25,52
	MTT [sec]	10	52,23	12,87	55,13
	RBV	10	2.680,36	1.450,93	2.803,66
	RBF	10	47,50	19,70	48,03
Milza	peak [%]	10	45,62	16,12	50,29
	TTP [sec]	10	27,01	7,55	27,50
	MTT [sec]	10	52,67	14,23	50,13
	RBV	10	3.244,86	1.720,35	3.190,74
	RBF	10	57,68	21,05	63,74

Tabella 20. Elaborazione statistica dei risultati dell'analisi CEUS dei conigli.

Le curve ottenute per i conigli (Figure 46-75) risultano simili a quelle già riportate per i furetti, caratterizzate per entrambi gli organi da una fase di wash in, un picco e un wash out, e vedono una pendenza maggiore nella prima fase mentre il ritorno verso i valori iniziali risulta generalmente più lento. Sempre in linea con i risultati messi in evidenza per i furetti, anche in questa specie le curve della milza risultano particolarmente variabili a confronto con quelle relative al fegato, sia da un punto di vista grafico che analizzando i valori di deviazione standard misurati per i diversi parametri (Tabella 20). Tuttavia, nel caso dei conigli, anche le misurazioni epatiche risultano differire in modo più evidente da soggetto a soggetto. In quest'ultimo caso, le differenze maggiormente evidenti da un punto di vista grafico sono relative all'area sotto la curva, e in particolare dall'altezza del picco, con valori che variano da

9,97% in Cuni 1 a 63,38% in Cuni 5. Relativamente invece ai grafici ottenuti a partire dalle misurazioni a livello splenico, oltre alle visibili differenze a livello di picco, con valori compresi tra 14,92% di Cuni 7 e 76,54% di Cuni 6, le curve appaiono diverse per forma e posizione, con variazioni notevoli anche nella pendenza della curva nella fase di wash in e nel tempo di raggiungimento del picco.

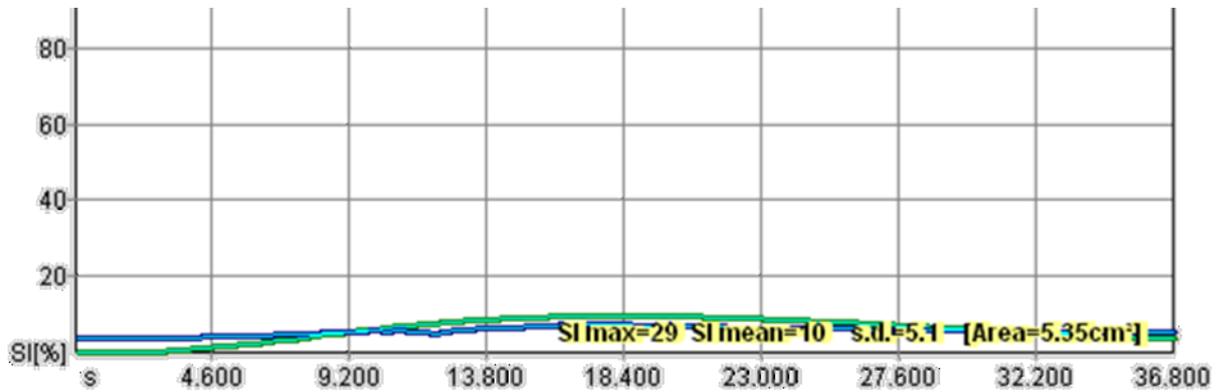


Figura 46. CEUS del Fegato di Cuni 1.

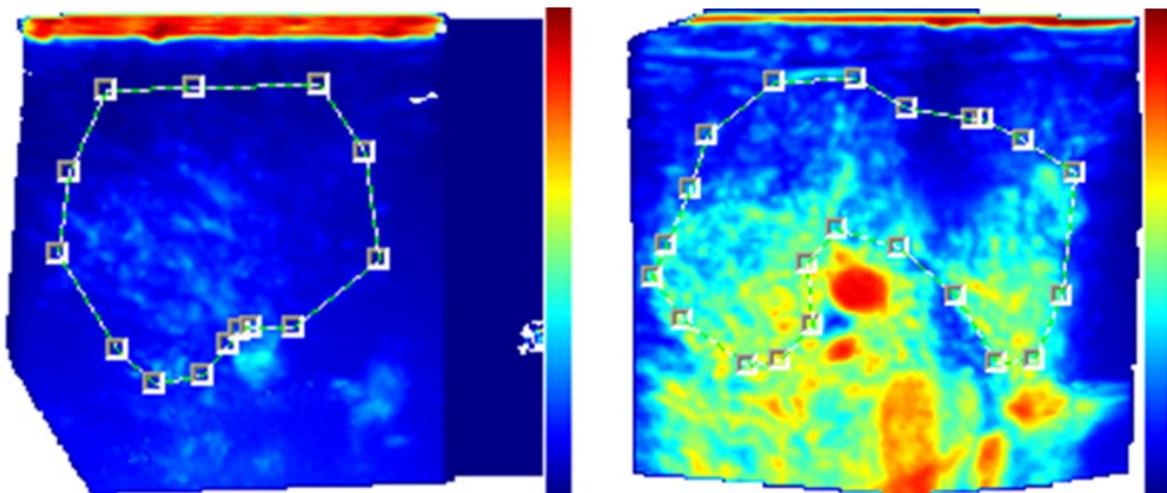


Figura 47. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Cuni 1 (sinistra) e Cuni 2 (destra).

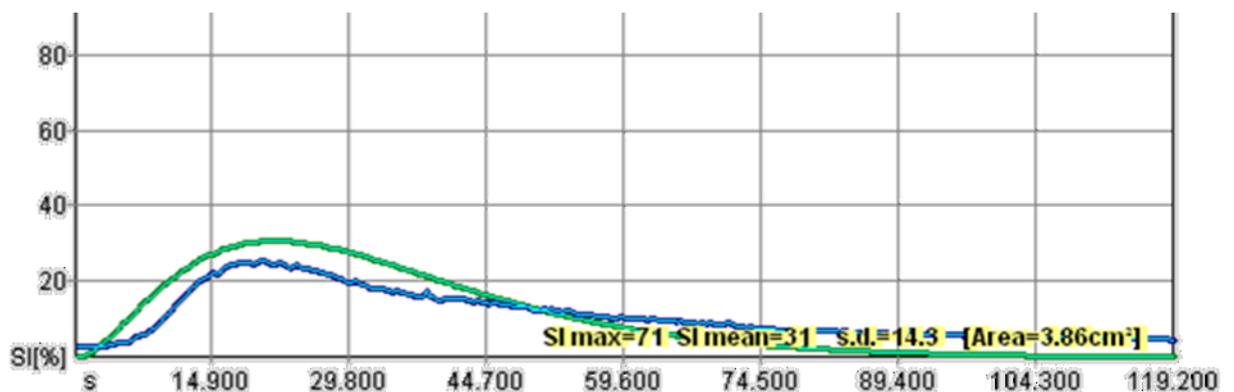


Figura 48. CEUS del Fegato di Cuni 2.

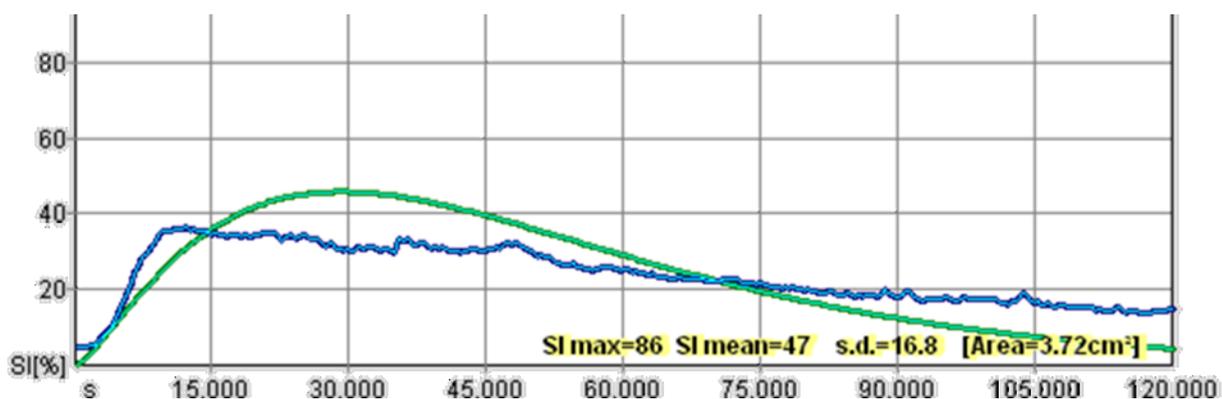


Figura 49. CEUS del Fegato di Cuni 3.

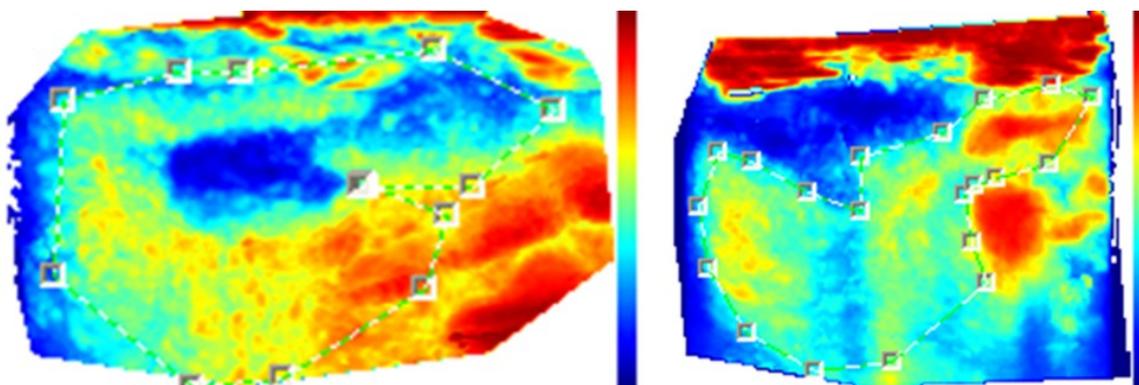


Figura 50. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Cuni 3 (sinistra) e Cuni 4 (destra).

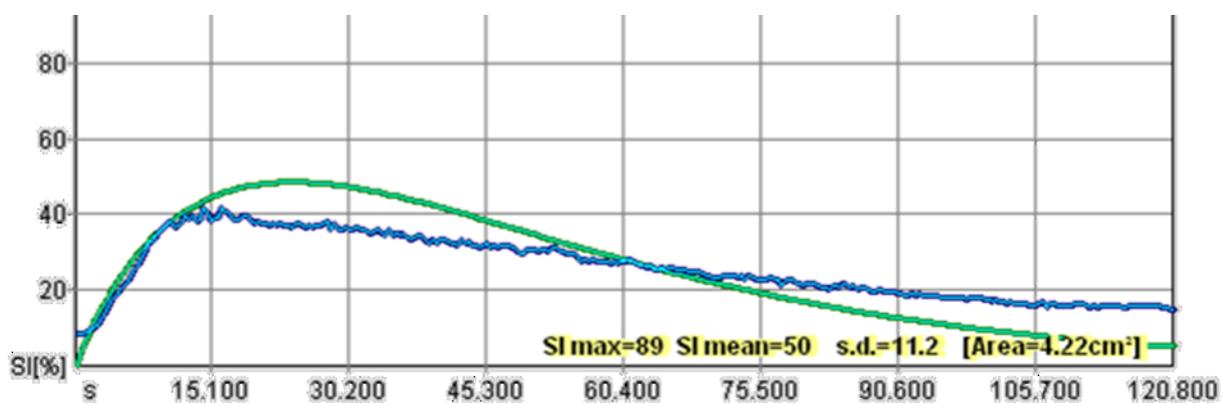


Figura 51. CEUS del Fegato di Cuni 4.

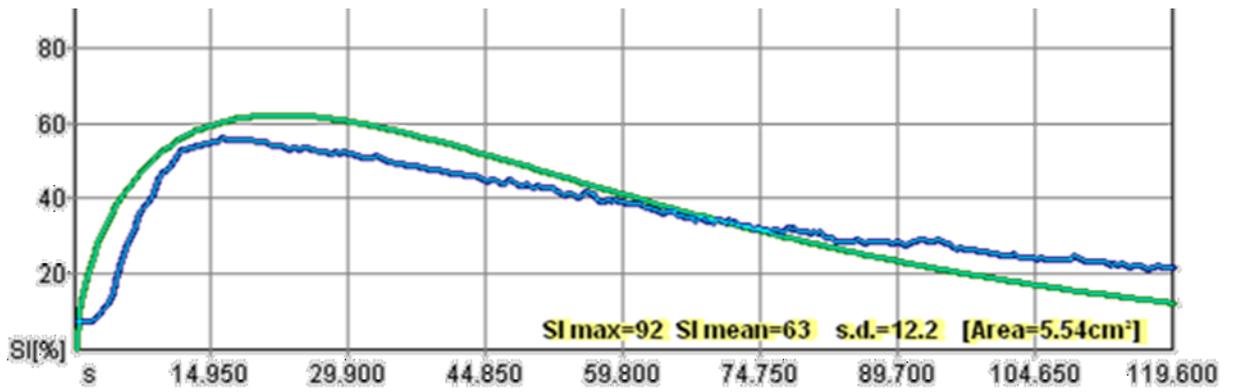


Figura 52. CEUS del Fegato di Cuni 5.

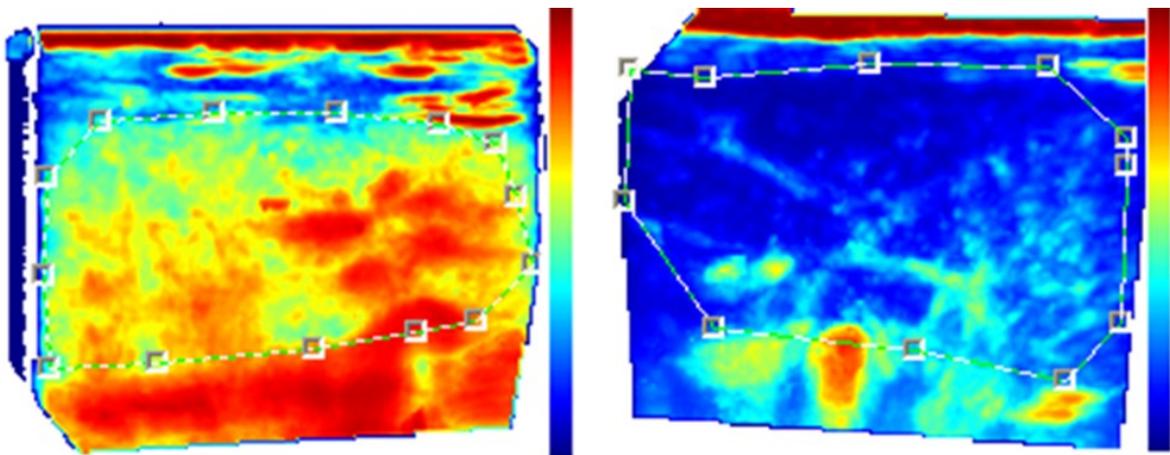


Figura 53. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Cuni 5 (sinistra) e Cuni 6 (destra).

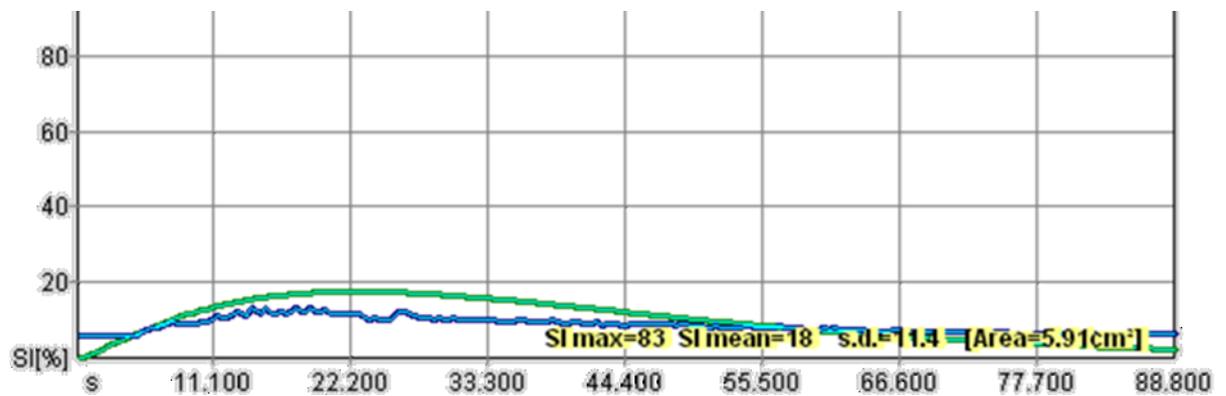


Figura 54. CEUS del Fegato di Cuni 6.

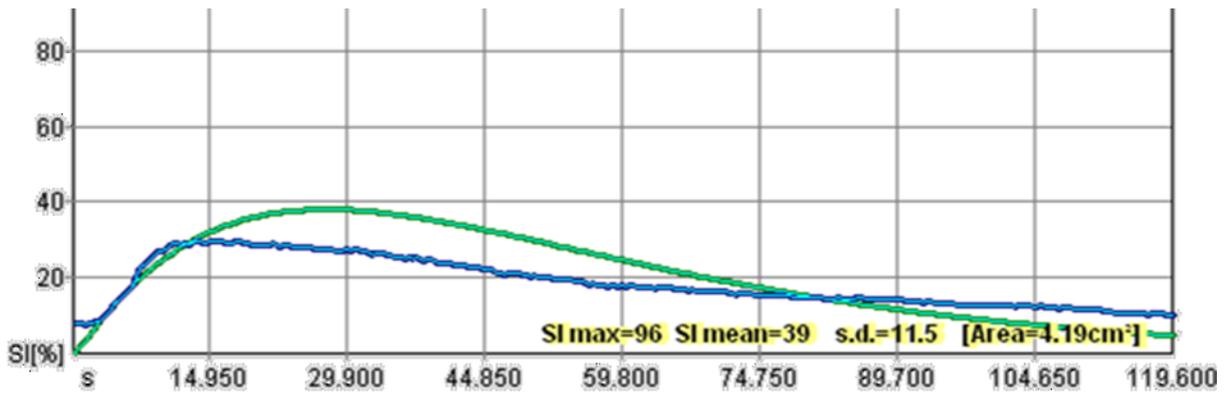


Figura 55. CEUS del Fegato di Cuni 7.

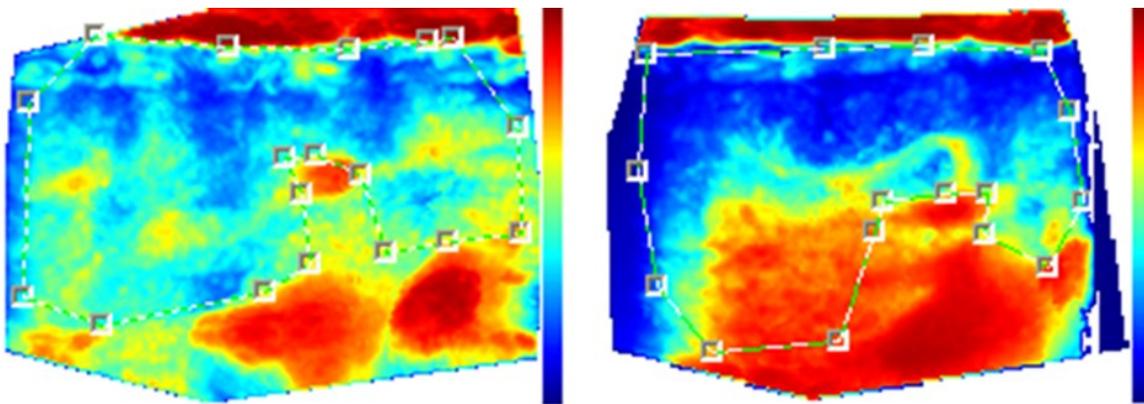


Figura 56. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Cuni 7 (sinistra) e Cuni 8 (destra)

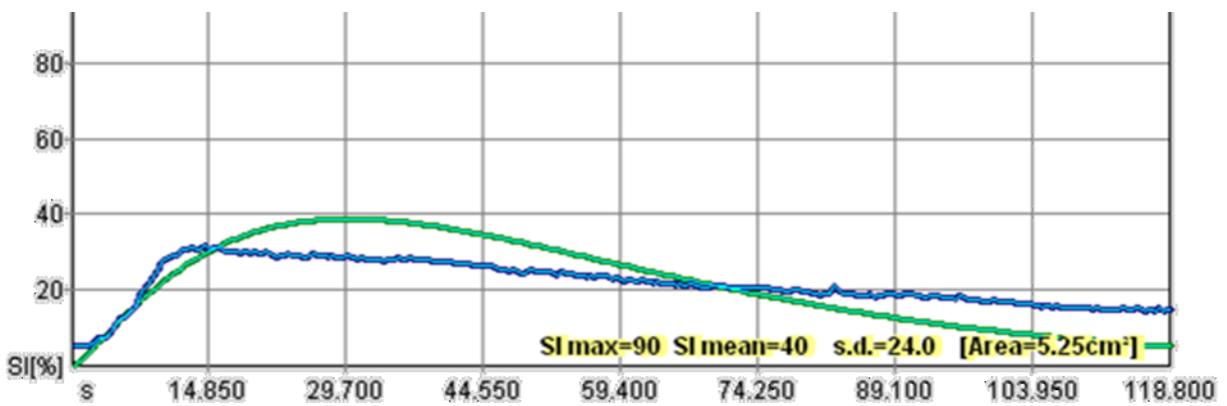


Figura 57. CEUS del Fegato di Cuni 8.

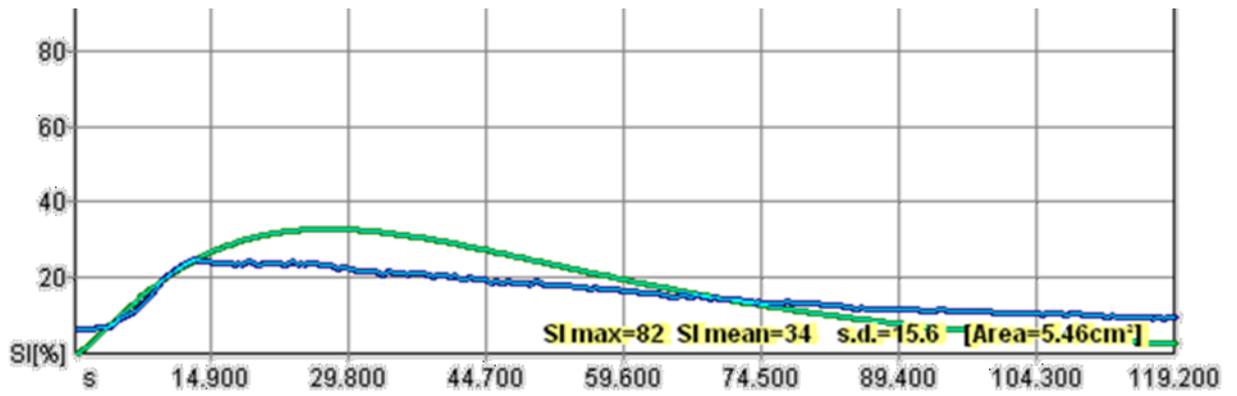


Figura 58. CEUS del Fegato di Cuni 9.

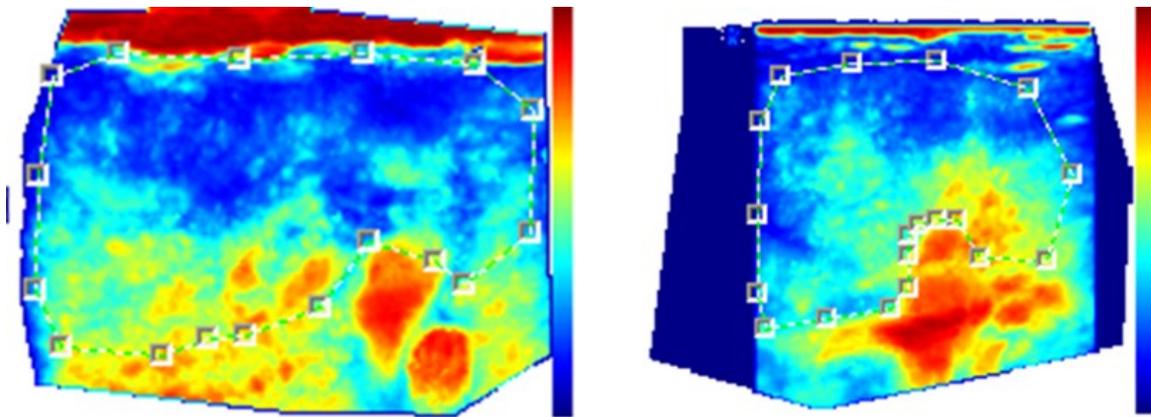


Figura 59. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Cuni 9 (sinistra) e Cuni 10 (destra).

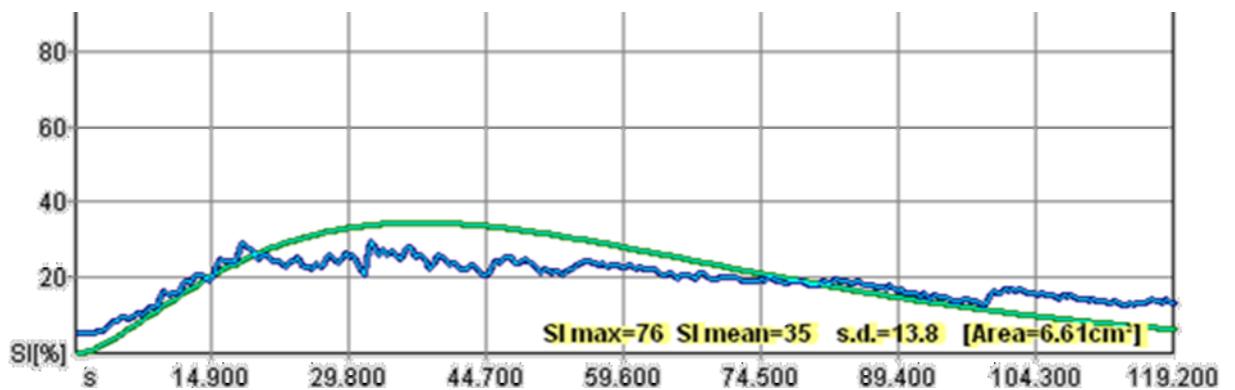


Figura 60. CEUS del Fegato di Cuni 10.

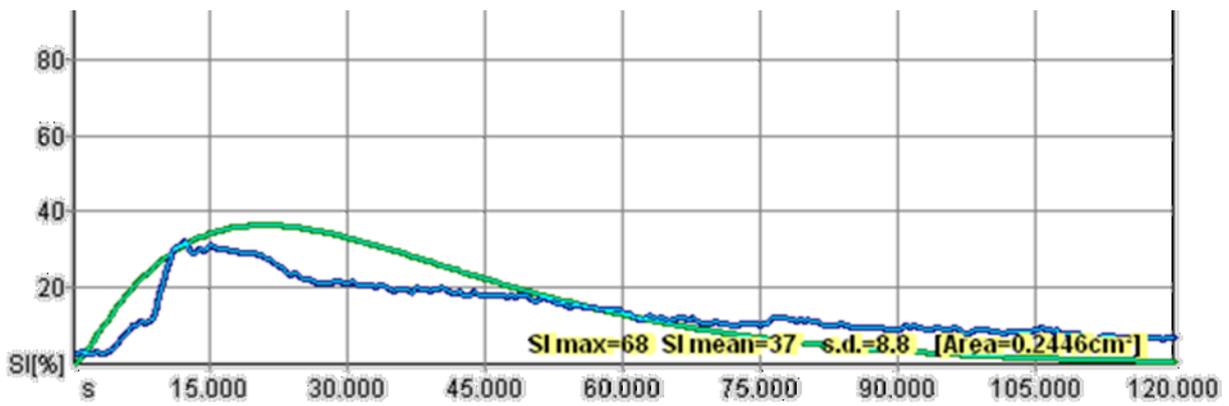


Figura 61. CEUS della Milza di Cuni 1.

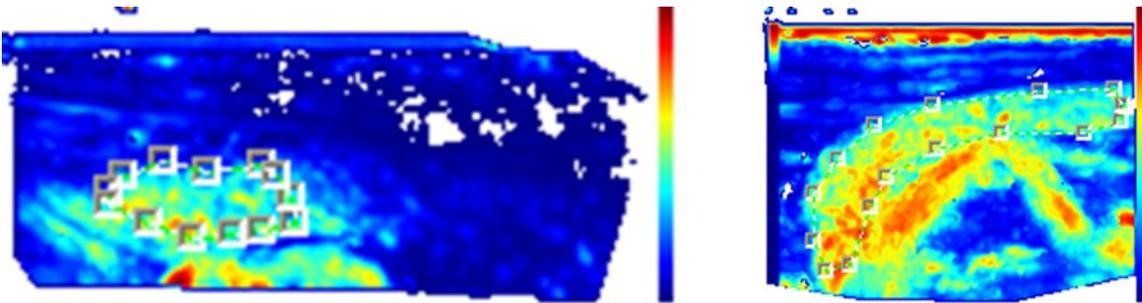


Figura 62. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Cuni 1 (sinistra) e Cuni 2 (destra).

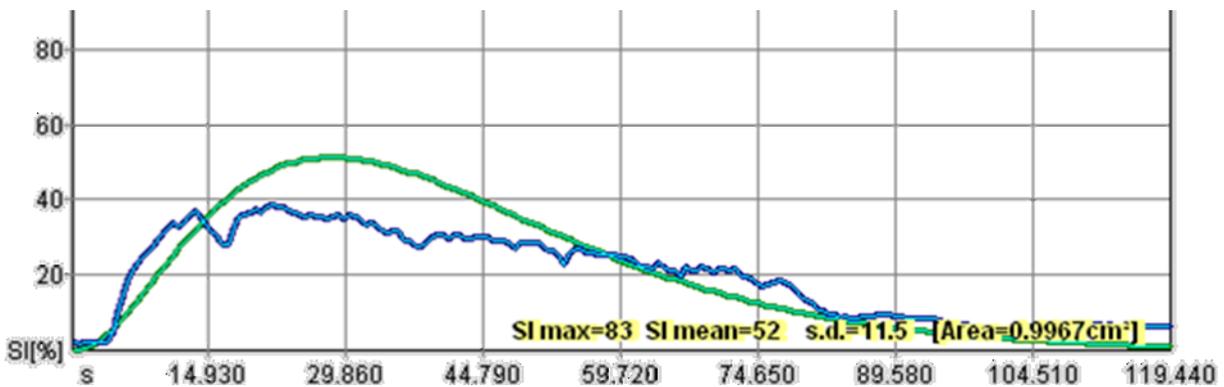


Figura 63. CEUS della Milza di Cuni2.

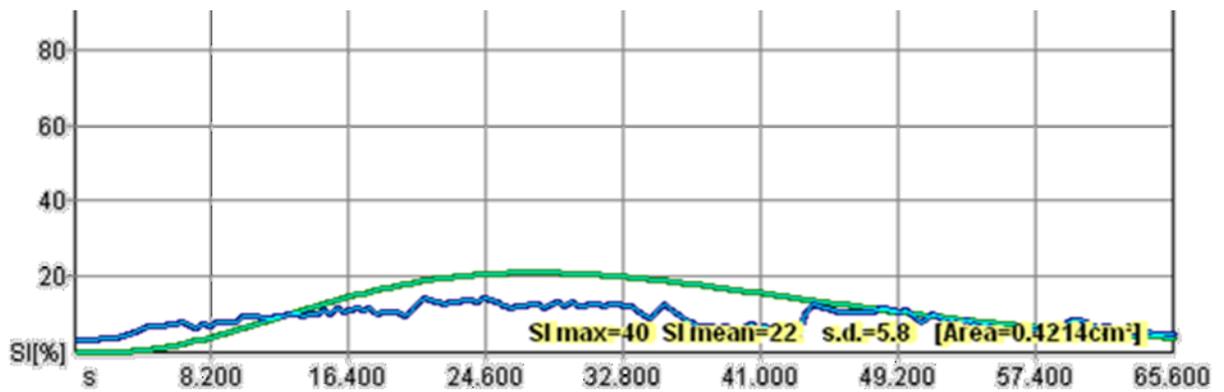


Figura 64. CEUS della Milza di Cuni 3.

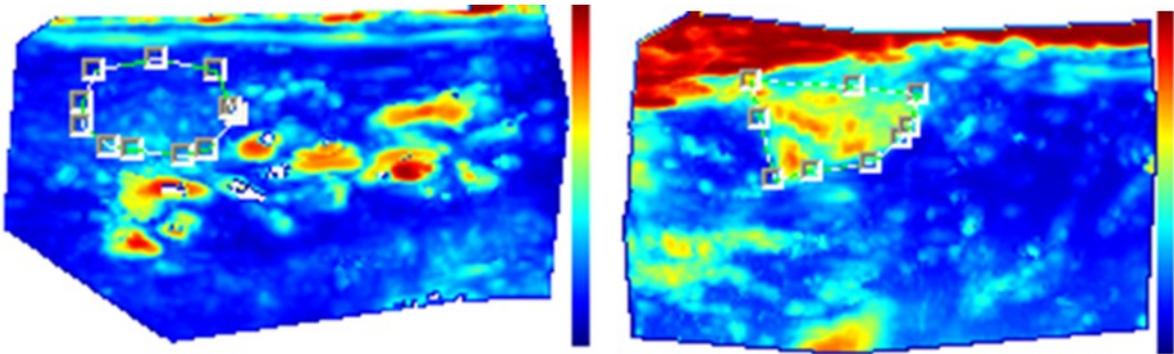


Figura 65. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Cuni 3 (sinistra) e Cuni 4 (destra).

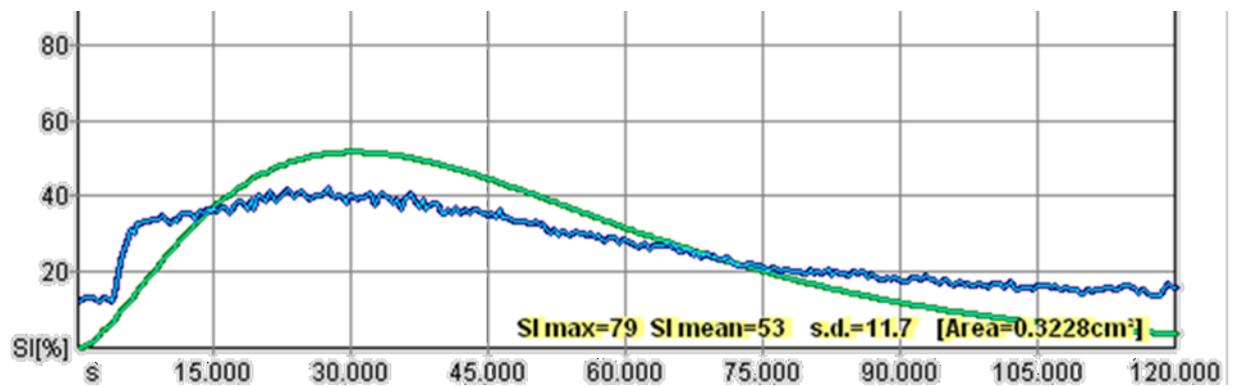


Figura 66. CEUS della Milza di Cuni 4.

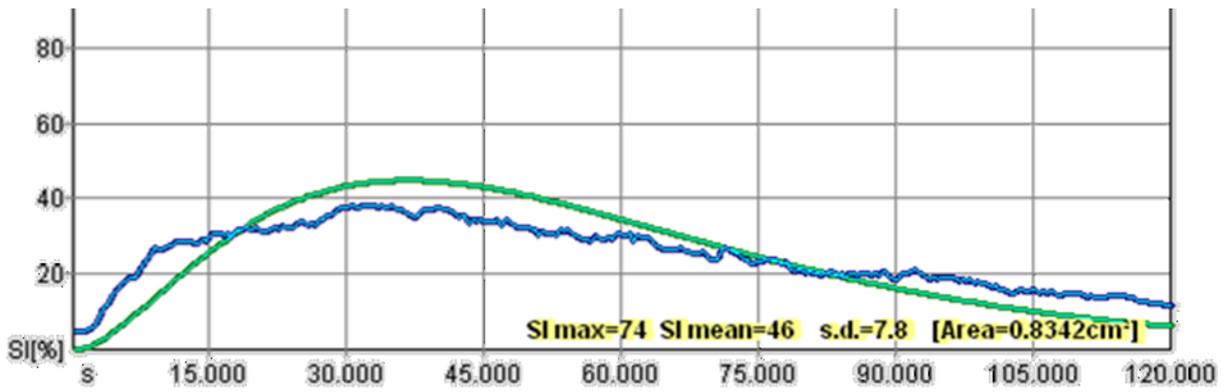


Figura 67. CEUS della Milza di Cuni 5.

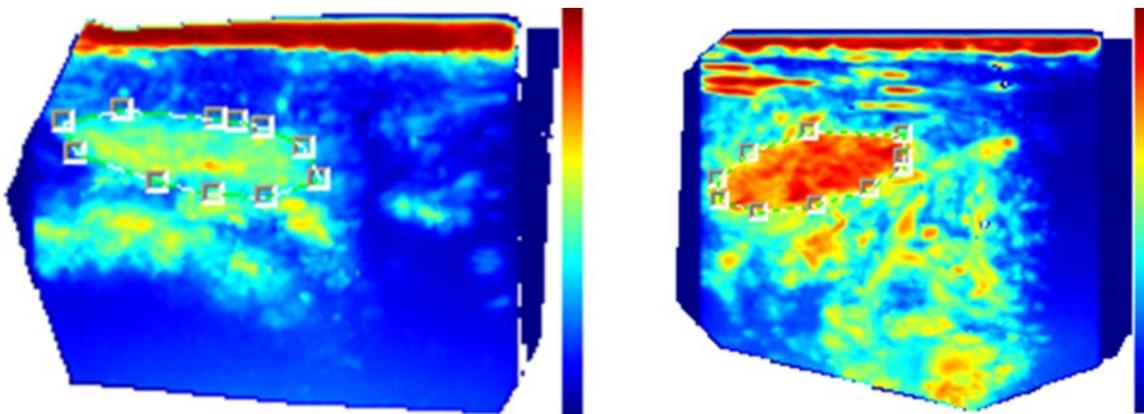


Figura 68. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Cuni 5 (sinistra) e Cuni 6 (destra).

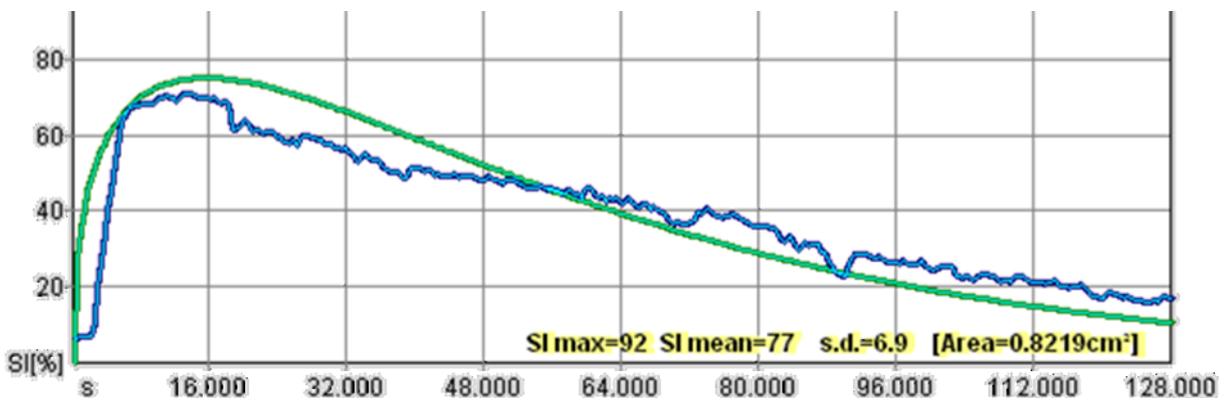


Figura 69. CEUS della Milza di Cuni 6

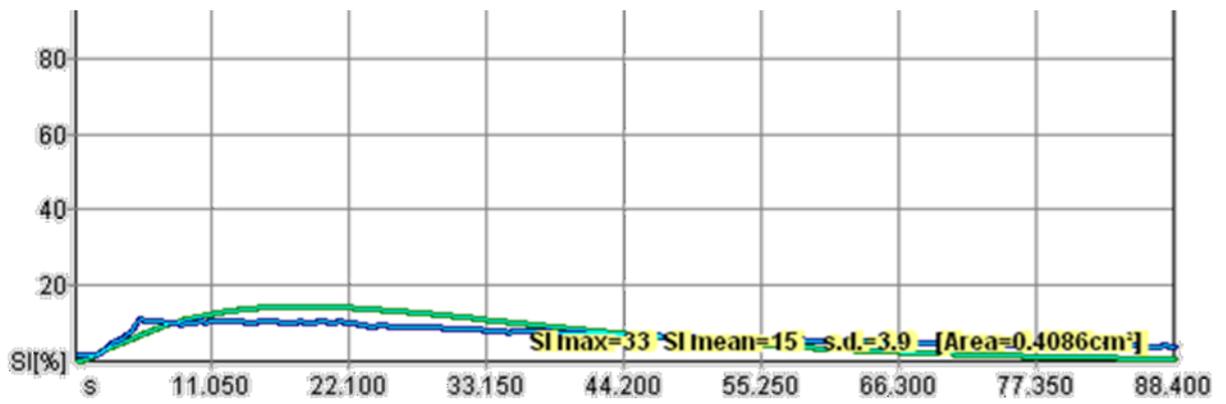


Figura 70. CEUS della Milza di Cuni 7.

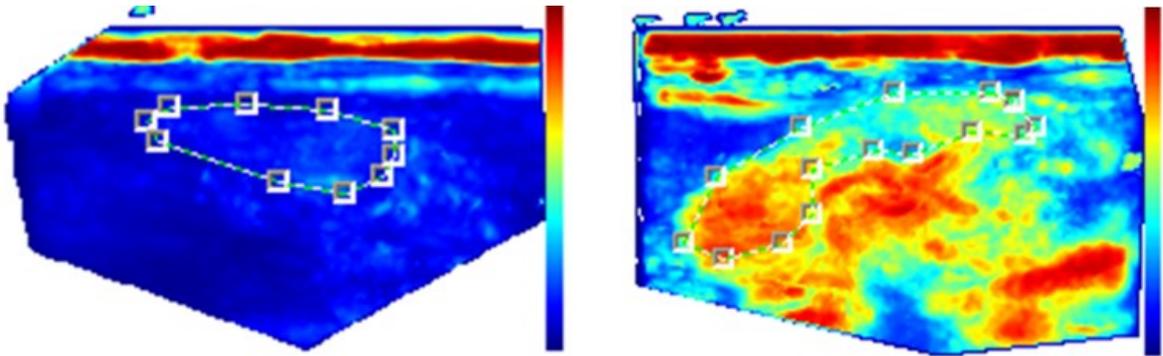


Figura 71. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Cuni 7 (sinistra) e Cuni 8 (destra).

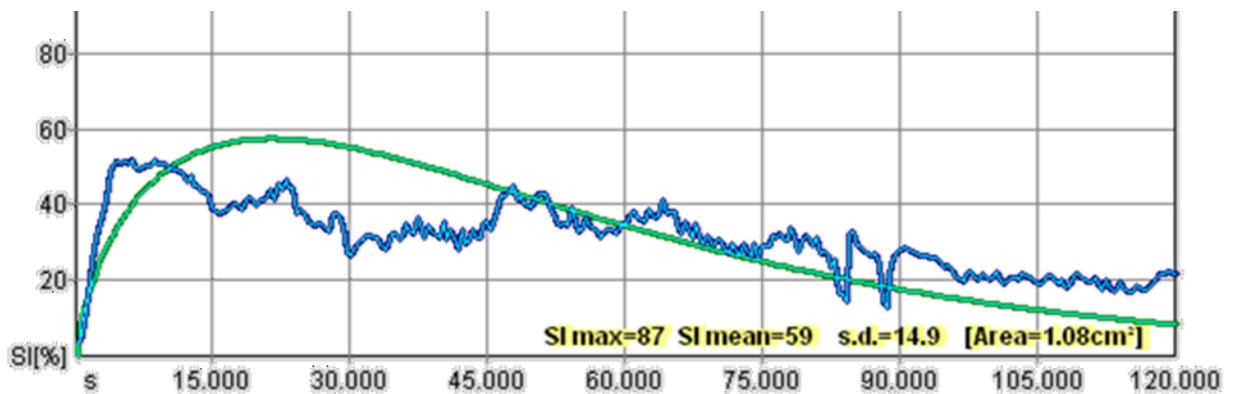


Figura 72. CEUS della Milza di Cuni 8.

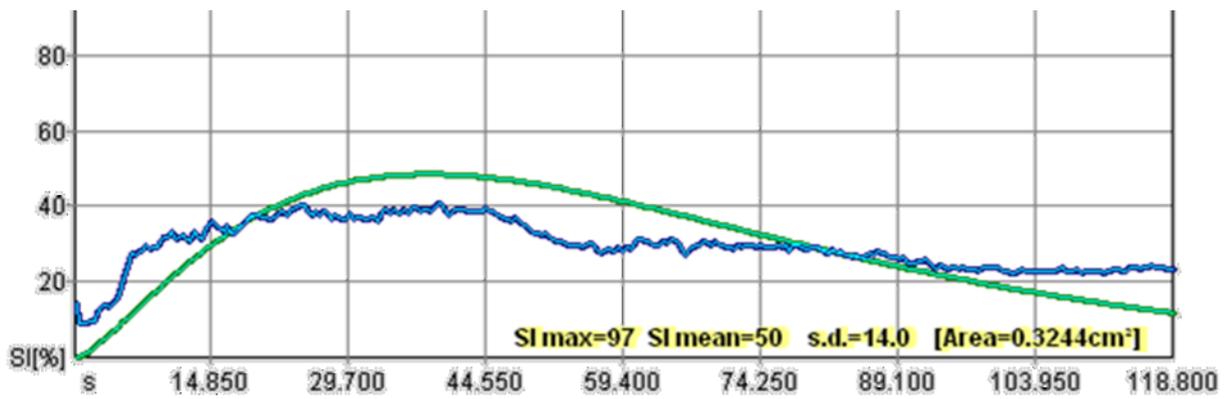


Figura 73. CEUS della Milza di Cuni 9.

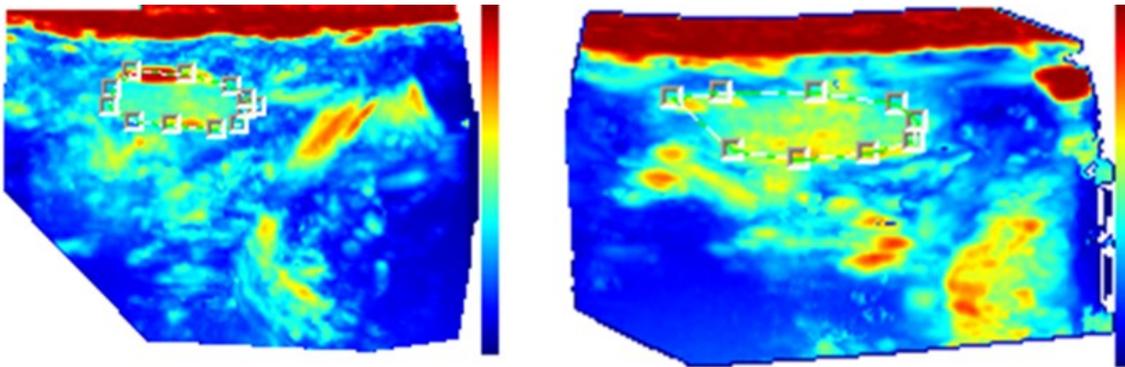


Figura 74. Area di calcolo del CEUS nella Milza di Cuni 9 (sinistra) e Cuni 10 (destra).

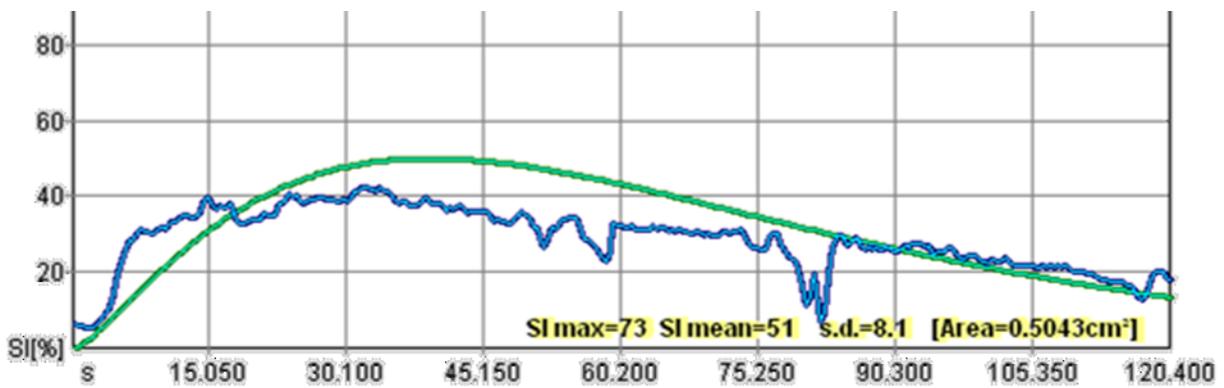


Figura 75. CEUS della Milza di Cuni 10.

## 6.3 Iguana

### 6.3.1 Stato di salute

Nelle Tabelle 21 e 22 sono riportati gli esiti delle indagini diagnostiche effettuate al fine di confermare lo stato di salute dei diversi soggetti.

A causa dell'estrema variabilità dei valori emato-biochimici dovuta al condizionamento da parte di parametri intrinseci ed estrinseci, la definizione di range entro cui un animale possa essere considerato sano è particolarmente problematica nei rettili (Mader, 2006). Pertanto, soltanto variazioni molto accentuate dei parametri rispetto ai valori riportati in bibliografia sono state considerate come patologiche. Inoltre, poiché la maggior parte degli enzimi comunemente indagati nei piccoli animali risultano avere scarsa specificità per il fegato nel caso dei rettili (Mader, 2006), la situazione è sempre stata valutata in accordo con l'anamnesi, qualora presente, e le condizioni cliniche dell'animale.

Poiché attualmente la tecnica maggiormente affidabile per la diagnosi di patologie epatiche nei rettili rimane l'esame istologico, l'esito relativo a questa indagine (Tabella 21) è sempre stato considerato come parametro discriminante nell'inclusione o esclusione di un soggetto dallo studio.

Nome	EOG	Risultato istologia
Iguana 1	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica multifocale
Iguana 2	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa
Iguana 3	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa
Iguana 4	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa, fibrosi portale minima,
Iguana 5	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa
Iguana 6	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa
Iguana 7	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata
Iguana 8	Nessuna Alterazione	lieve degenerazione idropica diffusa
Iguana P1	Nessuna Alterazione	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa, epatite linfocitaria lieve
Iguana P2	Stato cachettico, artrosi avanzata ginocchio destro, cicatrici multiple	lipidosi moderata, lieve degenerazione idropica diffusa

Tabella 21. Esiti degli esami clinici e degli esami istologici nelle iguane sane e nei soggetti patologici.

Nome	Glu	PT	Alb	Glob	UA	CPK	AST	ca	Ca corr	P	Na	K
Range	169-288	5-7,8	2,1-2,8	2,5-4,3	1,2-2,4	73-666	mag-52	8,8-14	04-glu	158-183	1,3-3	
Iguana 1	237	4,3	2	2,4	0,4	1317	50	14,2	15,7	6,7	153	1,5
Iguana 2	150	3,3	1,3	2	2,1	1742	50	12,6	14,8	3,8	152	4,8
Iguana 3	225	5	2	3	3,1	835	46	13,2	14,7	4	153	4,7
Iguana 4	166	4,4	1,6	2,8	2,9	578	23	14,2	16,1	5,7	151	2,7
Iguana 5	155	3,7	1,3	2,4	1,6	1316	30	12,2	14,4	3,7	141	2,4
Iguana 6	608	7,1	1,8	5,3	6	1563	24	13,3	15	7,9	140	3,4
Iguana 7	107	2,2	1,1	1,1	1,3	-	76	6,3		8,7	133	7,1
Iguana 8	155	6,2	2,5	3,7	1	322	16	12,8	13,8	6,6	160	4,2
Iguana P1	203	3,9	1,5	2,4	1	4105	210	11,5	13,5	5,3	147	3,2
Iguana P2	116	5,1	1,1	4	1,6	485	19	11,5	13,9	3,2	151	3,9

Tabella 22. Esito dell'esame biochimico nelle iguane.

Per la maggior parte dei soggetti l'esame istologico ha messo in evidenza una lieve e modesta vacuolizzazione citoplasmatica degli epatociti compatibile con lipidosi moderata e/o un processo di degenerazione idropica multifocale o diffuso, sempre di modesta entità, caratterizzato da una fine granulazione citoplasmatica.

Sebbene la lipidosi epatica sia comunemente considerata una patologia di tipo degenerativo, il deposito di grasso a livello di epatociti è considerato normale per un certo grado in diverse specie di rettili, ad esempio come sostenimento durante la vitellogenesi o il letargo (Mader, 2006). Pertanto, a differenza dei mammiferi, uno stato di lipidosi viene definito patologico solo quanto la quantità di grasso negli epatociti viene considerata maggiore rispetto alle condizioni normali per quanto riguarda la specie, l'età, il sesso e la stagione. Nel caso della lipidosi osservata in tutti i soggetti dello studio, questa è stata giudicata di minima entità e probabilmente di origine gestionale, legata all'abbondanza di alimentazione e alla scarsa attività fisica che caratterizzano le iguane in cattività.

La degenerazione idropica è invece un'alterazione non specifica che indica una possibile sofferenza cellulare. Si tratta normalmente di un processo reversibile. Poiché processi di autolisi del tessuto potrebbero causare alterazioni di questo genere, non si può escludere che si sia trattato di un processo di rapida insorgenza legato al prelievo bioptico. Nel caso del soggetto 4 la fibrosi portale è stata considerata non significativa in quanto di minima entità.

A seguito di questi esami diagnostici 2 animali, denominati Iguana P1 e P2, sono stati considerati patologici (Tabella 23), uno a seguito del reperto istopatologico di un'epatite linfocitica reattiva non specifica, l'altro in relazione al pessimo quadro clinico riscontrato durante l'esame obiettivo generale (Tabella 21). Questi animali sono stati comunque indagati seguendo lo stesso protocollo dei soggetti sani, ma non sono stati inclusi nell'elaborazione statistica.

Nome	Sesso	Età (anni)	Peso (Kg)	sano/patologico
Iguana 1	M	6	2	S
Iguana 2	M	2	2,4	S
Iguana 3	M	10	1,1	S
Iguana 4	F	12	1,9	S
Iguana 5	M	18	2,8	S
Iguana 6	M	14	2,5	S
Iguana 7	M	8	1,3	S
Iguana 8	M	2	1,5	S
Iguana P1	M	8	1,9	P
Iguana P2	M	10	2	P

**Tabella 18. Segnalamento ed esiti delle indagini diagnostiche nelle 10 iguane investigate.**

### 6.3.2 CEUS

In generale la tecnica è stata eseguita con successo in tutti gli animali, nonostante le difficoltà riscontrate nell'esecuzione del protocollo in confronto ai mammiferi, per lo più conseguenti alla presenza di squame piuttosto dure. Tra queste si possono elencare la laboriosità della tecnica di incannulazione e la presenza di artefatti ecografici dovuti alla cattura di bolle d'aria al di sotto delle squame. E' verosimile pensare come la tecnica CEUS possa essere eseguita anche in animali svegli utilizzando le corrette tecniche di restrizione manuale; tuttavia, conseguentemente alla presenza dello studio tomografico nell'indagine, il protocollo ha previsto un'anestesia generale per questi animali.

Il picco registrato è stato del  $19,6\% \pm 7,8$ , con TTP di  $105,09 \pm 98,3$  sec., RBF di  $21,21 \pm 11,02$  e RBV di  $2982,57 \pm 2649,13$ . L'MTT è risultato di  $90,71 \pm 12,74$  nei primi 6 casi, dove il tempo di indagine era di 90 secondi. Questo tempo è considerevolmente aumentato negli ultimi due soggetti, investigati per 10 minuti al fine di visualizzare il termine della fase di wash out. Tutti i risultati, compresa la distinzione tra l'MTT medio calcolato a partire da tutti i soggetti e dai primi 6, sono schematizzati nella Tabella 24.

		N	Media	Deviazione Standard	Mediana
Liver	peak [%]	8	19,6	7,87	18,05
	TTP [sec]	8	105,09	98,3	66,34
	MTT tot [sec]	8	142,57	133	93,78
	MTT su 90 sec [sec]	6	90,71	12,74	88,81
	RBV	8	2982,57	2649,13	1934,63
	RBF	8	21,21	11,02	18,05

Tabella 24. Elaborazione statistica dei risultati dell'analisi CEUS delle iguane.

I risultati sono piuttosto diversi rispetto a quelli ottenuti nei piccoli mammiferi (conigli e furetti), con picchi considerevolmente più bassi (valore medio di  $19,6\% \pm 7,8$  contro il  $37,13\% \pm 7,6$  nei furetti e il  $36,66\% \pm 15,25$  nei conigli) e tempi molto allungati di TTP e MTT particolarmente elevati. In particolare, i valori medi di TTP erano  $105,09 \pm 98,3$  secondi, contro i  $23,39 \pm 4,59$  secondi dei furetti e i  $25,92 \pm 5,13$  secondi dei conigli. Per i motivi sopra citati, minor significato è stato attribuito invece ai valori medi di MTT.

Anche le curve (Figure 76-87) appaiono diverse da furetti e conigli, molto schiacciate, conseguentemente ai bassi picchi, e spostate verso destra, conseguentemente ai TTP elevati.

Analizzando la curva dell'Iguana 8 (Figura 87), in cui i tempi di indagine sono stati allungati fino a 10 minuti, è possibile intravedere la fase di wash out, caratterizzando la curva come una classica curva a "parabola" evidenziabile nelle altre specie, seppur con le sopra citate

differenze. In questo animale è possibile inoltre valutare come, a differenza di conigli e furetti, la pendenza della curva sia simile nelle due fasi di aumento e calo del MDC.

Riguardo alla ripetitività, le curve sono simili tra di loro per quanto concerne il picco, con deviazioni standard paragonabili a quelle ottenute nel caso dei furetti, mentre variabilità notevolmente maggiore rispetto sia a furetti che a conigli è presente in merito al TTP, con posizione molto variabile del picco nell'asse orizzontale dei grafici.

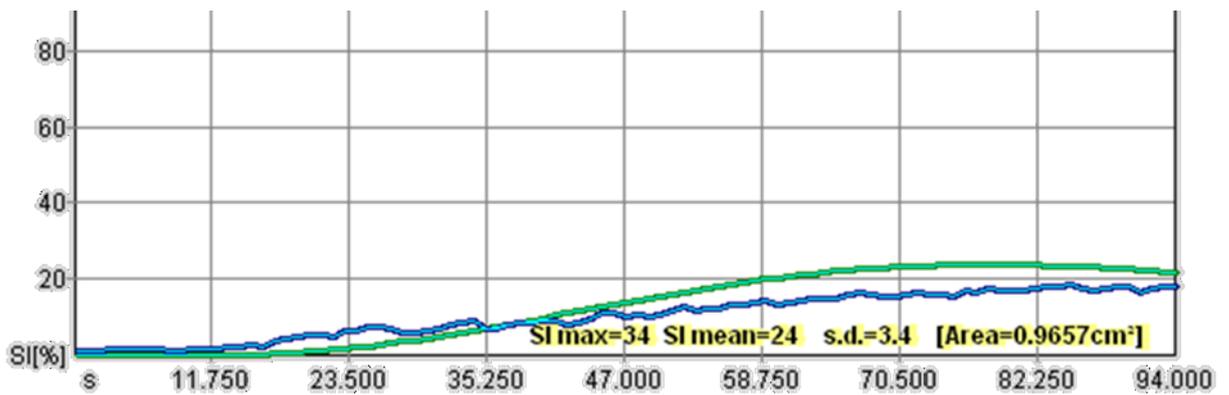


Figura 76. CEUS del Fegato di Iguana 1.

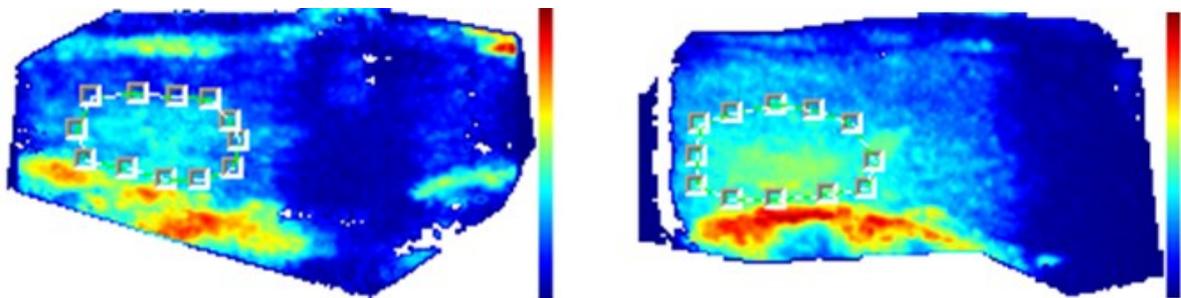


Figura 77. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Iguana 1 (sinistra) e Iguana 2 (destra).

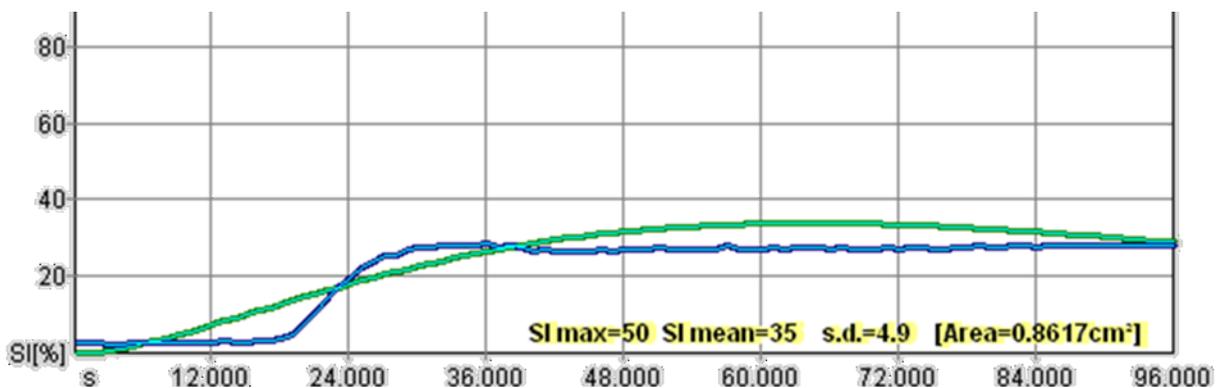


Figura 78. CEUS del Fegato di Iguana 2.

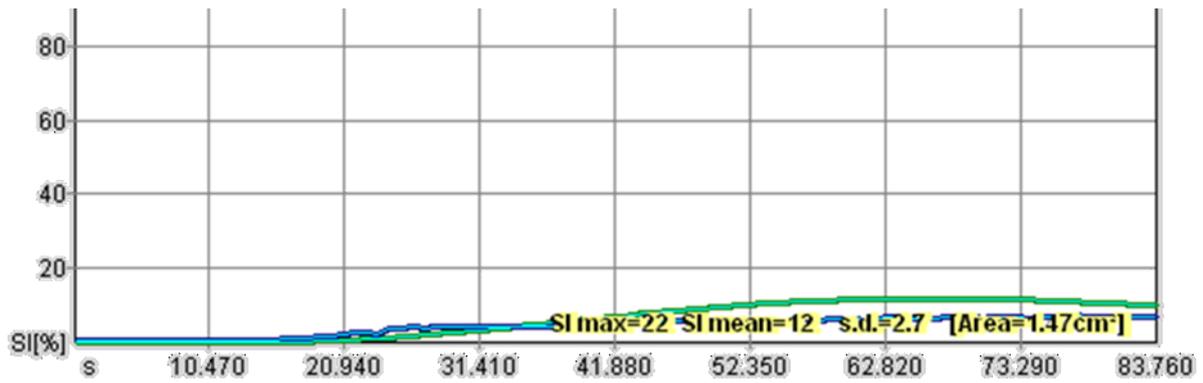


Figura 79. CEUS del Fegato di Iguana 3.

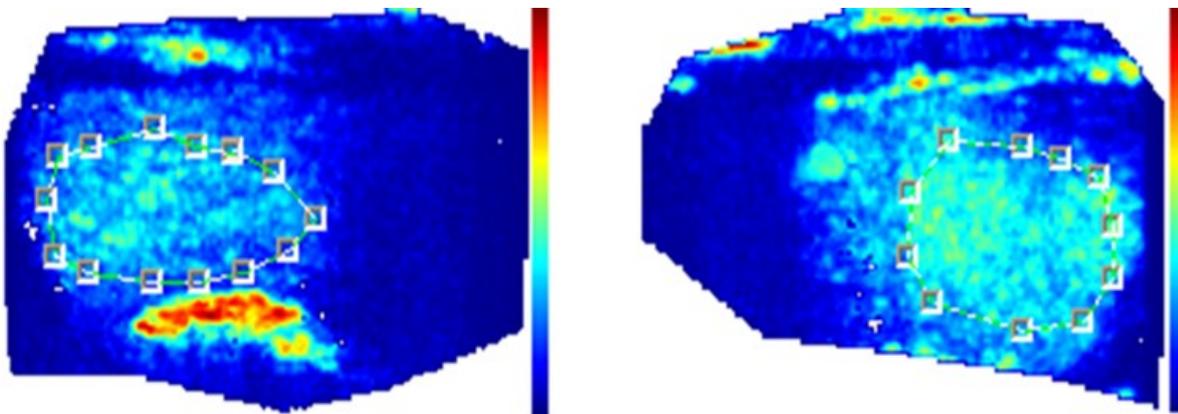


Figura 80. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Iguana 3 (sinistra) e Iguana 4 (destra).

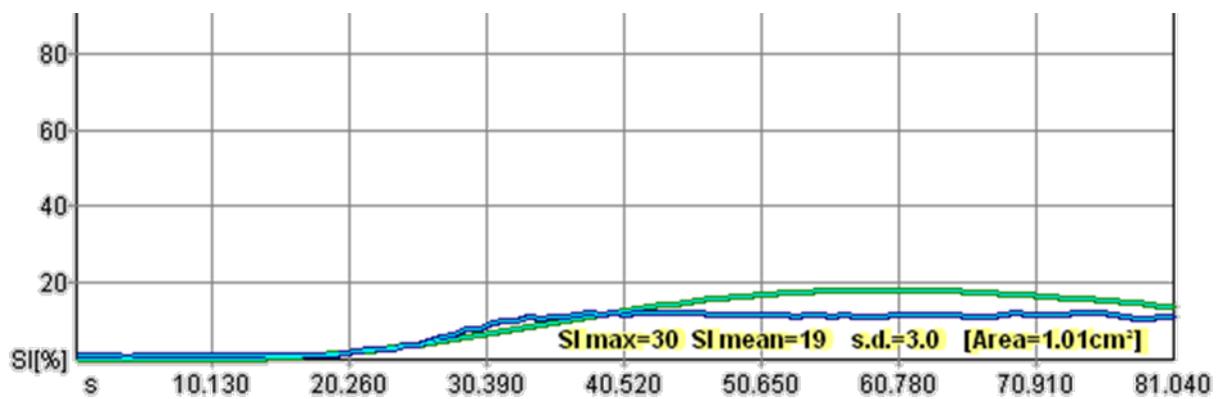


Figura 81. CEUS del Fegato di Iguana 4

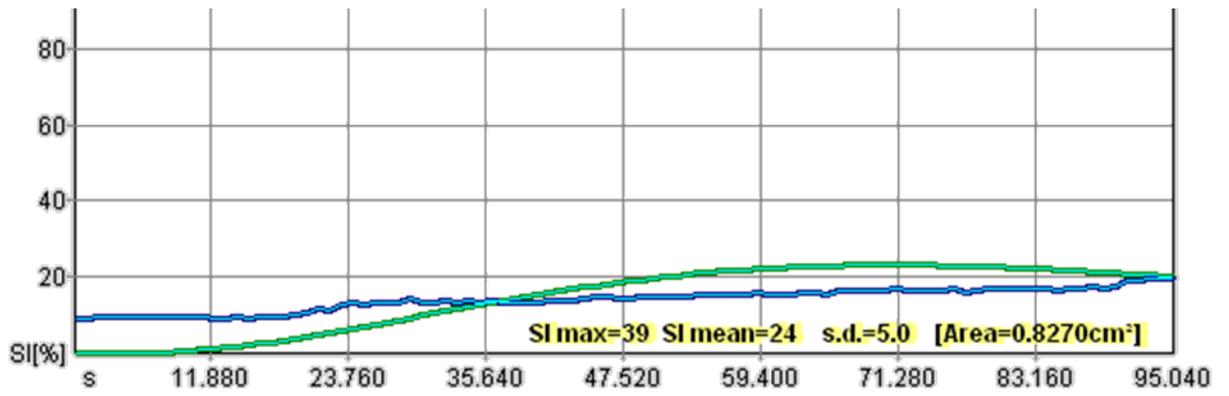


Figura 82. CEUS del Fegato di Iguana 5.

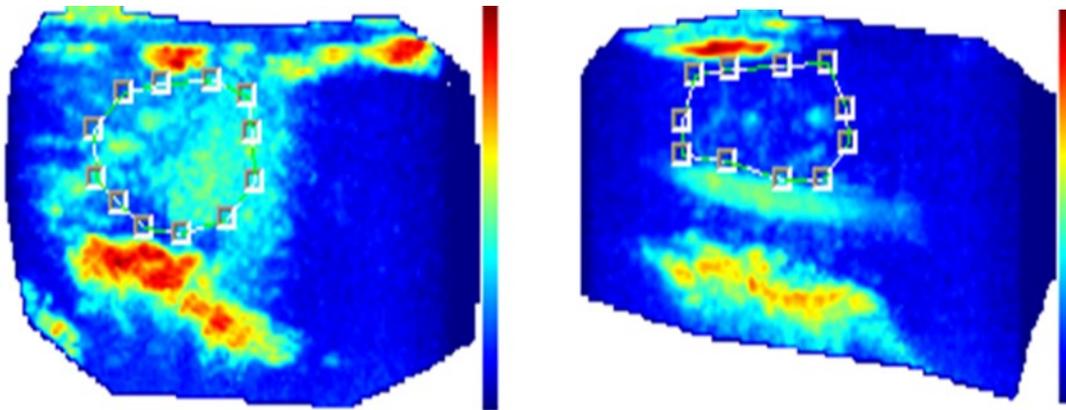


Figura 83. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Iguana 5 (sinistra) e Iguana 6 (destra).

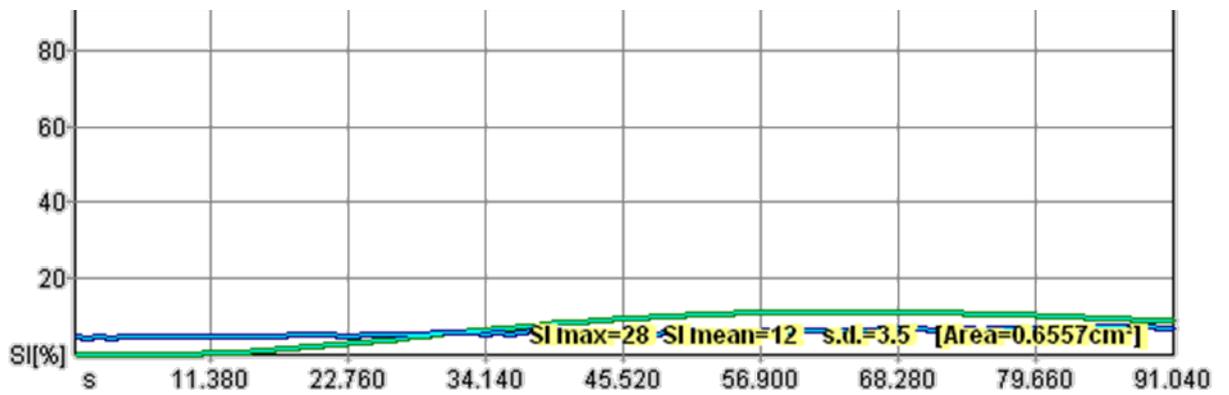


Figura 84. CEUS del Fegato di Iguana 6.

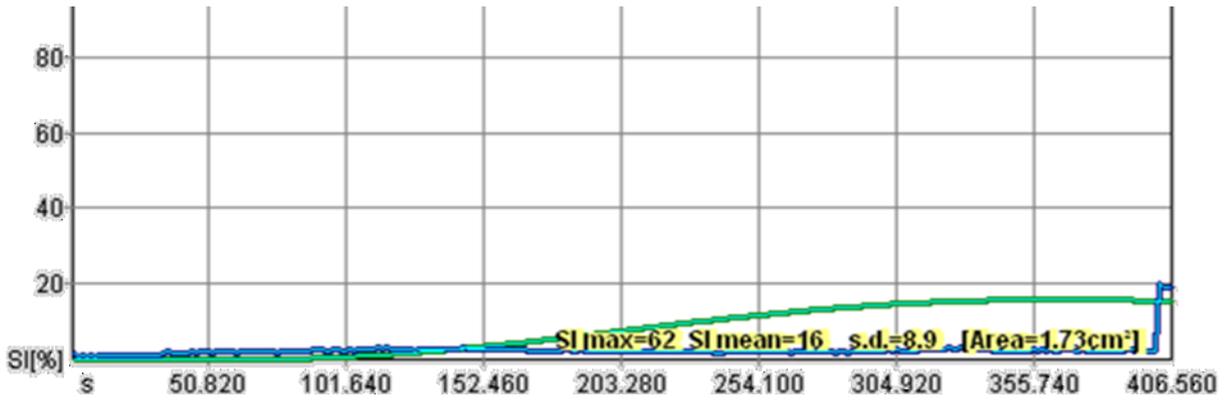


Figura 85. CEUS del Fegato di Iguana 7.

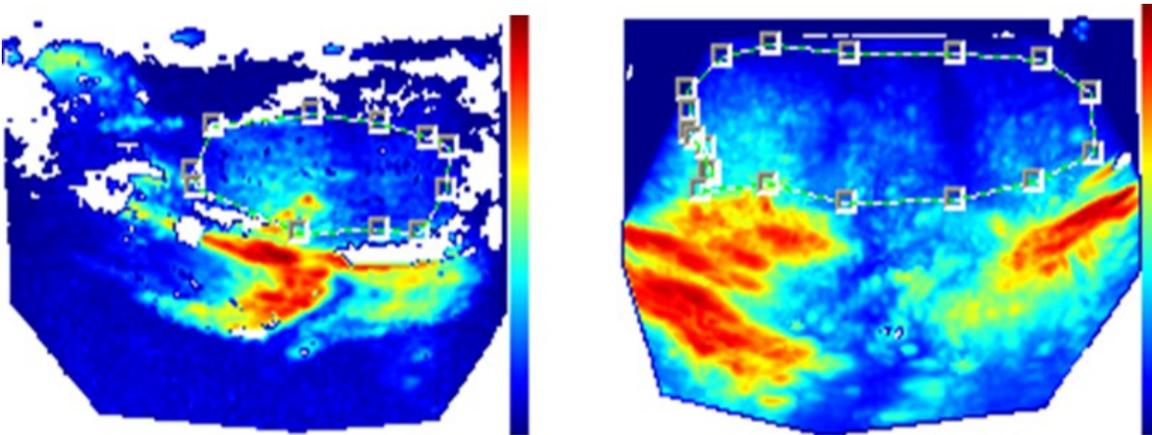


Figura 86. Area di calcolo del CEUS nel Fegato di Iguana 7 (sinistra) e Iguana 8 (destra).

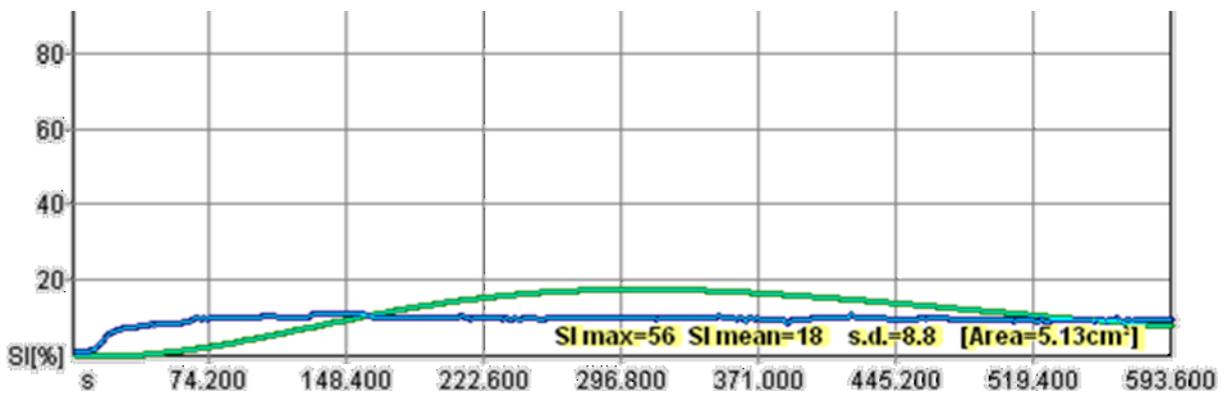


Figura 87. CEUS del Fegato di Iguana 8.

### 6.3.3 TC

L'esecuzione dello studio in anestesia generale è avvenuta senza problemi.

La media dei valori di HU registrati nei diversi soggetti a livello epatico prima della visualizzazione del mezzo di contrasto a quel livello era di  $77,3 \text{ HU} \pm 6,2$ , mentre salivano ad una media di  $179,1 \text{ HU} \pm 35$  durante il picco di concentrazione del mezzo di contrasto. Questa variazione di radiopacità veniva ben visualizzata in tempo reale durante l'esecuzione dello studio dinamico.

Nella Tabella 25 sono riportati i risultati per quanto riguarda il tempo di arrivo del mezzo di contrasto in aorta, nei vasi epatici e nel parenchima epatico, nonché di raggiungimento del picco in aorta e fegato.

	arrivo in aorta (sec)	picco in aorta (sec)	arrivo vasi epatici (sec)	arrivo parenchima epatico (sec)	picco parenchima epatico (sec)
Iguana 1	3	12	7	10	24
Iguana 2	4	14	11	15	31
Iguana 3	3	11	10	12	23
Iguana 4	3	12	10	14	31
Iguana 5	4	12	12	13	24
Iguana 6	4	17	12	16	44
Iguana 7	4	14	14	16	26
Iguana 8	4	21	10	24	45
Media	3,6	14,1	10,8	15,0	31,0
Deviazione Standard	0,5	3,4	2,1	4,2	8,9

**Tabella 25. Risultati esame dinamico TC con mezzo di contrasto per soggetto ed elaborazione statistica.**

Il MDC veniva visualizzato in aorta in  $3,6 \pm 0,5$  secondi, con un TTP medio di  $14,1 \pm 3,6$  secondi. Per quanto riguarda invece il fegato, la prima evidenza visiva del mezzo di contrasto si aveva in  $10,8 \pm 2,1$  secondi, mentre l'arrivo del MDC a livello di parenchima è stato determinato in  $15 \pm 4,2$  secondi. Il TTP epatico medio è stato di  $31 \pm 8,9$  secondi.

L'andamento delle curve derivate dalla registrazione dei valori HU in aorta e fegato è risultato simile in tutti i soggetti analizzati. Di seguito è riportato come esempio il grafico relativo al soggetto Iguana 9 durante i 600 secondi di indagine (Figura 88).

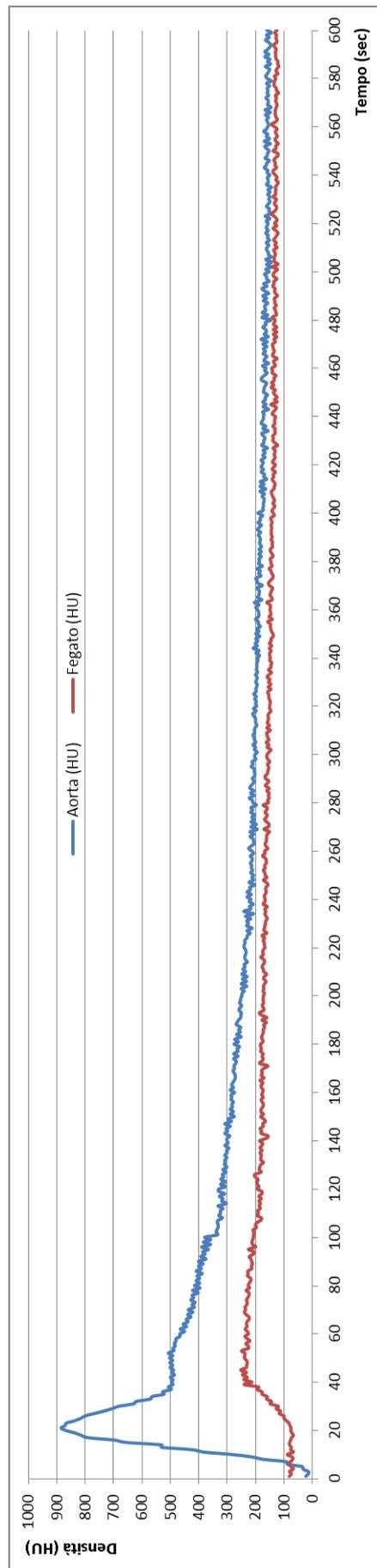


Figura 88. Grafico densità-tempo calcolato nell'Iguana 9 (indagine completa di 600 secondi).

La curva relativa alle densità calcolate a livello di aorta era caratterizzata da un rapido aumento dei valori fino al raggiungimento di un picco, seguito da una prima fase di calo rapido e da una progressiva diminuzione della pendenza della curva, fino ad una sorta di plateau, localizzato generalmente intorno ai 200 secondi di indagine, dove i valori calano quasi impercettibilmente, senza tornare ai valori iniziali entro i 600 secondi. A livello invece di parenchima epatico, la curva era caratterizzata da una pendenza minore nella fase di wash in e da un picco piuttosto basso comparato con i valori registrati a livello di aorta, mentre la seconda parte della curva era piuttosto sovrapponibile alla precedente; nemmeno in questo caso si è verificato un ritorno dei valori di HU allo stato iniziale entro i 600 secondi di indagine, con raggiungimento di una fase di plateau tra i 100 e i 200 secondi.

Di seguito sono riportate graficamente le fasi di wash in, picco e fase più rapida del wash out relative ad aorta e fegato per ogni soggetto; per meglio sottolineare tali fasi sono riportati i tratti di curve relativi ai primi 30 secondi nel caso dell'aorta e ai primi 60 nel caso del fegato (Figure 89-96).

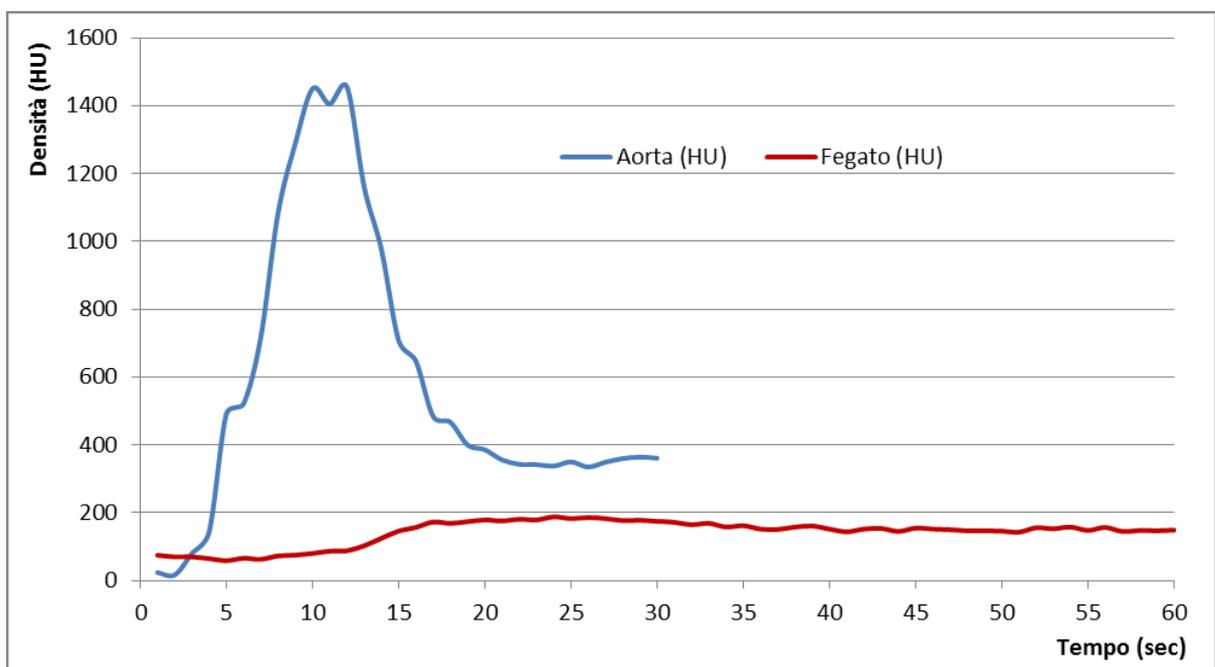


Figura 89. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 1.

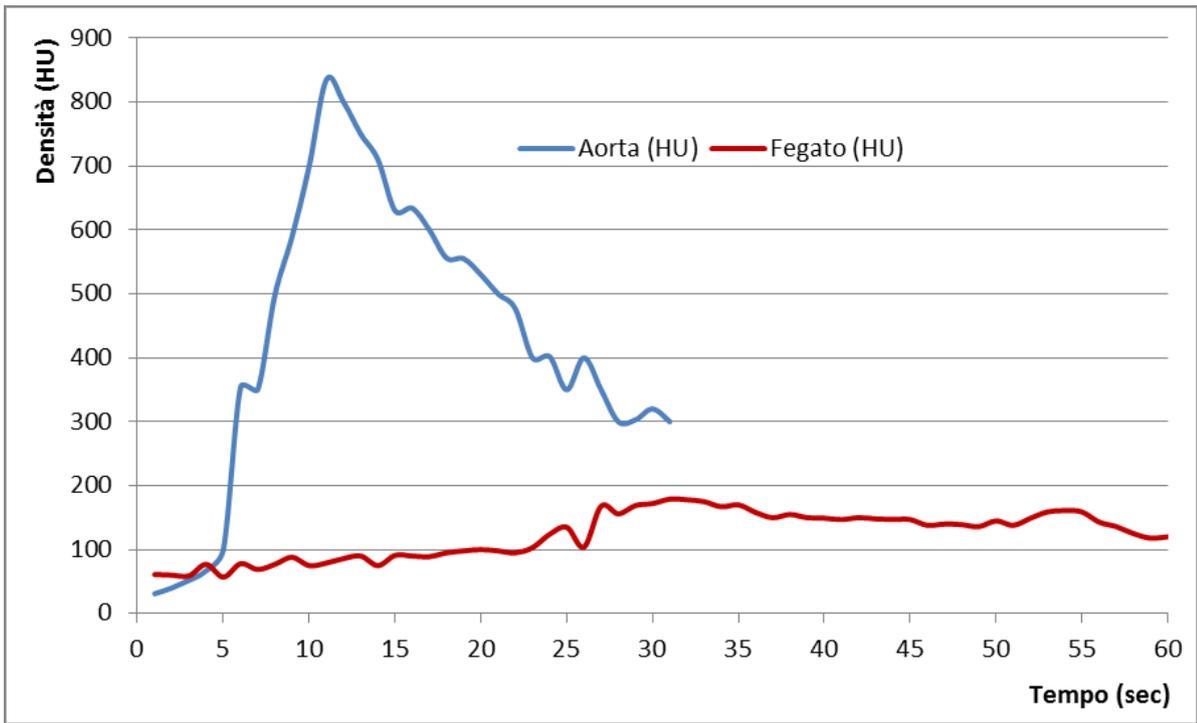


Figura 90. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 2.

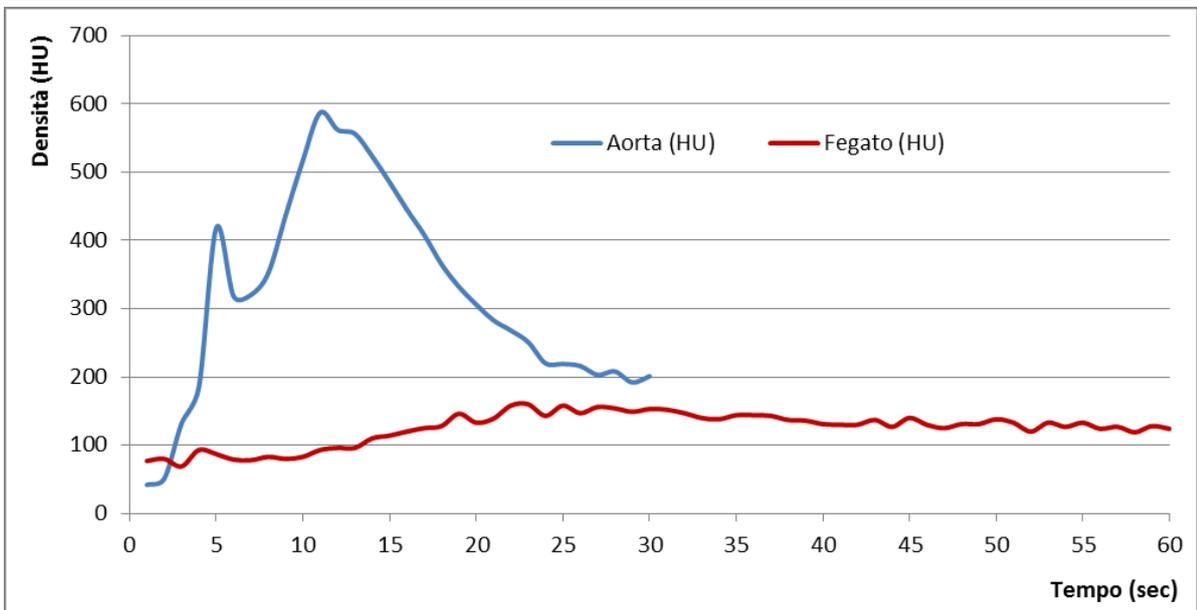


Figura 91. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 3.

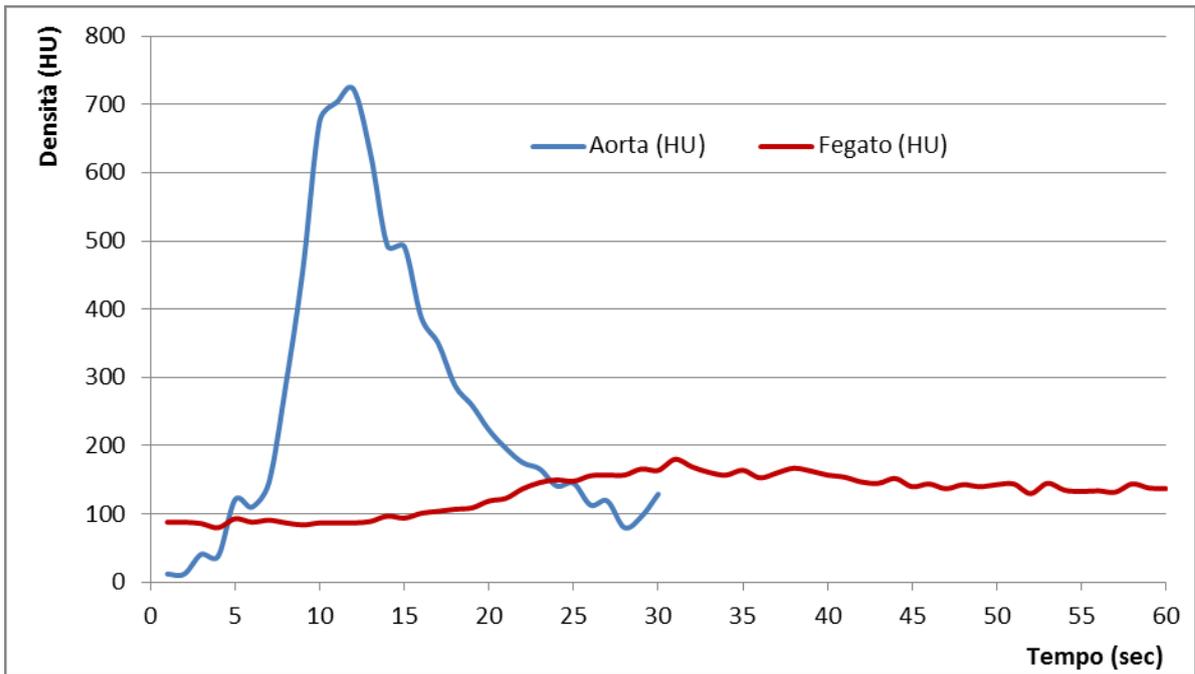


Figura 92. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 4.

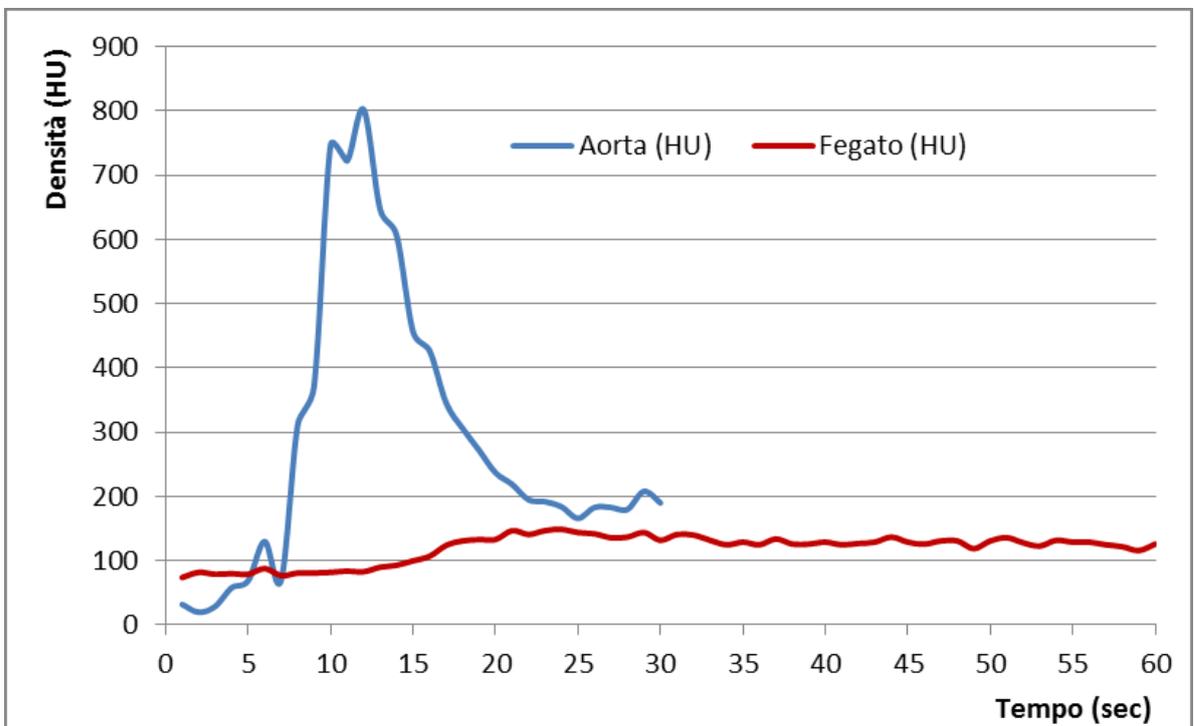


Figura 93. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 5.

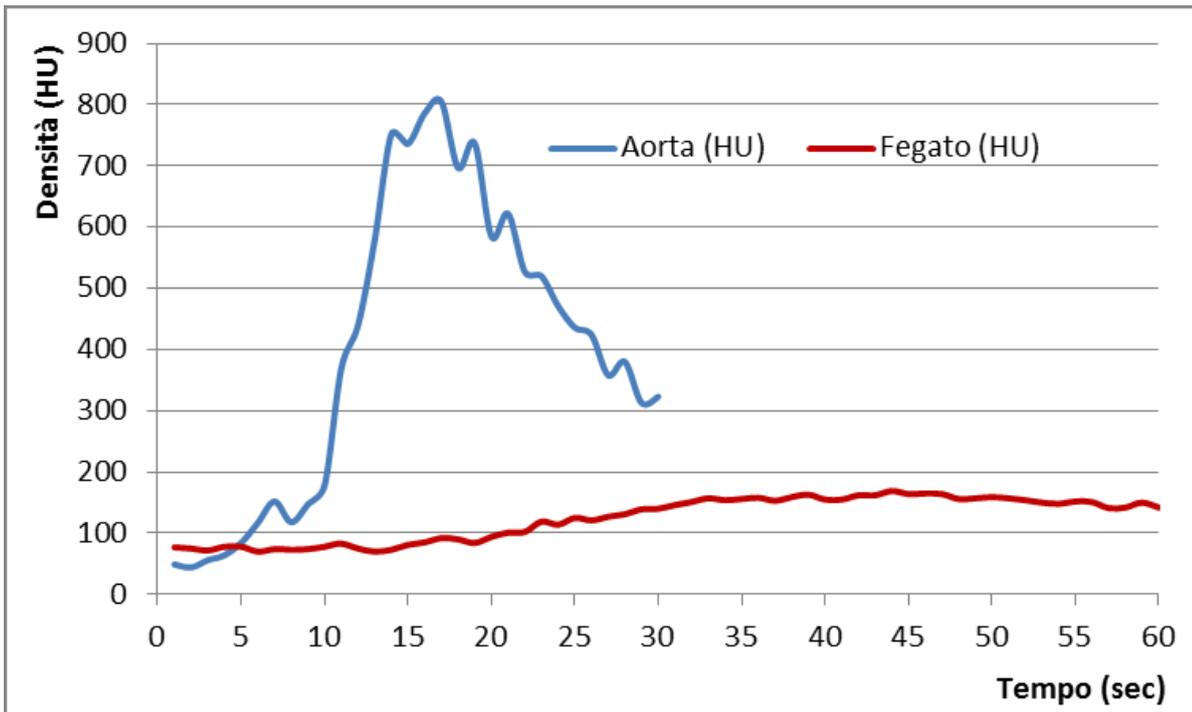


Figura 94. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 6.

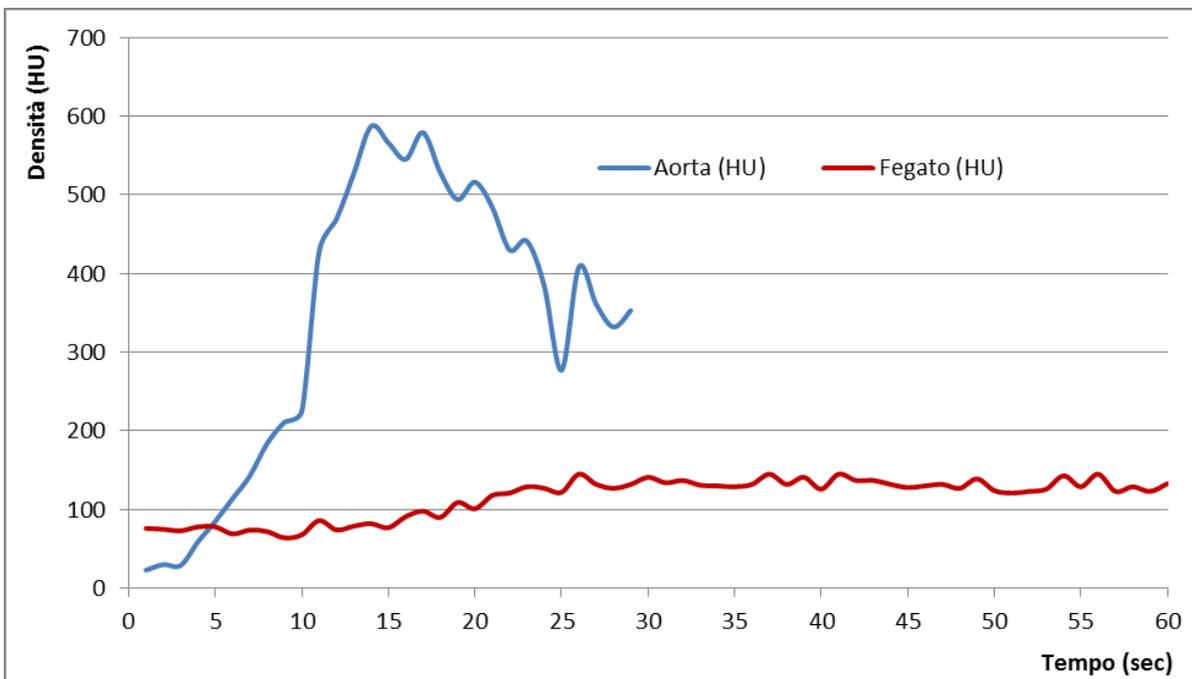


Figura 95. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 7.

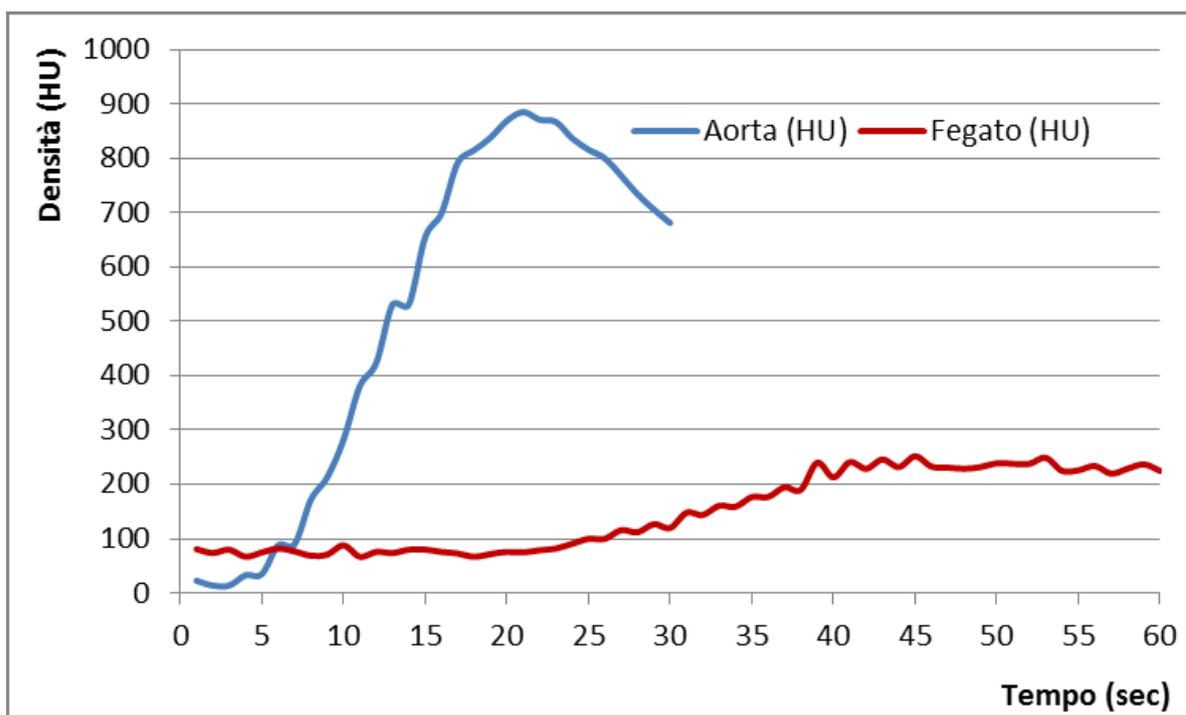


Figura 96. Curva densità-tempo elaborata con Excel a partire dai valori HU della TC dinamica di Iguana 8.

Alcune differenze si sono messe in evidenza in Iguana 6 e in Iguana 8 rispetto alla media (Figura 94 e 96). In entrambi casi si è infatti registrato un TTP maggiore rispetto alle altre. L'analisi visiva delle curve, nonché la valutazione concomitante di tutti i parametri calcolati, sintetizzati nella Tabella 26, permette tuttavia di differenziare le due situazioni.

	Arrivo aorta - vasi epatici (sec)	Arrivo aorta – parenchima epatico (sec)	Arrivo vasi epatici – parenchima epatico (sec)	Arrivo parenchima – picco parenchima (sec)
Iguana 1	4	7	3	14
Iguana 2	7	11	4	16
Iguana 3	7	9	2	11
Iguana 4	7	11	4	17
Iguana 5	8	9	1	11
Iguana 6	8	12	4	28
Iguana 7	10	12	2	10
Iguana 8	6	20	14	21
Media	7,1	11,4	4,3	16,0
Deviazione Standard	1,7	3,9	4,1	6,1

Tabella 26. Risultati esame dinamico TC con mezzo di contrasto per soggetto ed elaborazione statistica.

In Iguana 6 si registra un aumento della fase compresa tra l'arrivo del MDC a livello di parenchima epatico e il picco, facendo pertanto pensare ad un calo nella velocità di diffusione del contrasto a livello parenchimoso. Nel caso invece di Iguana 8 si assiste ad un rallentamento della fase compresa tra la visualizzazione del MDC in aorta e il suo arrivo a livello di parenchima, mentre il rallentamento nella diffusione epatica appare meno significativo. Questo soggetto è inoltre caratterizzato da un picco più elevato a livello epatico. Infine, è da sottolineare la rapida diffusione del MDC dall'aorta ai vasi epatici registrata in Iguana 1, associata a valori di HU particolarmente elevati a livello di aorta, sia alla prima visualizzazione che al picco (80 e 1455 HU rispettivamente). I due eventi, che si può ipotizzare essere legati tra di loro, potrebbero essere conseguenti a differenze nella pressione dell'animale.

Indipendentemente da ciò, il riscontro di queste variazioni rispetto alla media in realtà non stupisce nel caso dei rettili, dove il metabolismo è fortemente condizionato da una moltitudine di parametri difficilmente controllabili, quali ad esempio la temperatura ambientale, la stagione, e lo stato fisiologico dell'animale. Nei rettili, inoltre, la stessa circolazione è strettamente dipendente dall'ambiente esterno e dallo stato dell'animale, nonché da eventuali situazioni di apnea che possono essersi verificate durante lo studio, le quali possono causare un bypass del circolo polmonare, con passaggio di tutto il sangue a livello di circolazione sistemica (Mader, 2006).

Di seguito è riportato il confronto tra i risultati ottenuti nei diversi animali, inclusi i due casi patologici, descritti successivamente nel capitolo 6.3.4. (Figura 97).

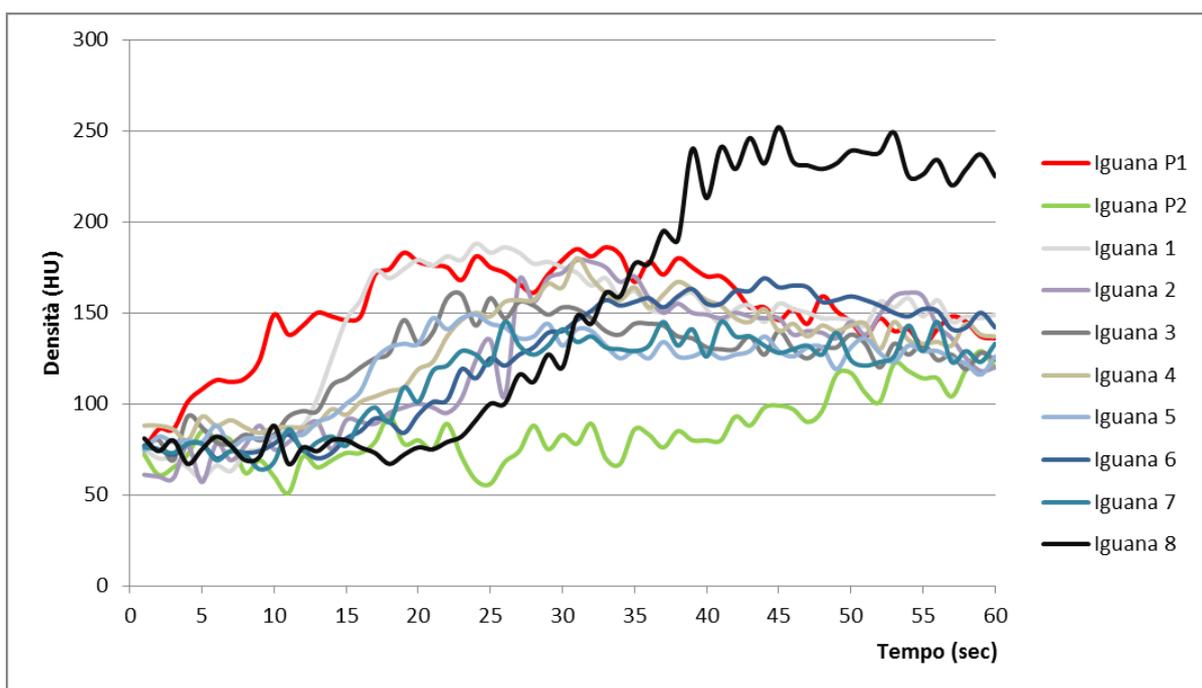


Figura 97. Grafico relative alle curve densità-tempo a livello epatico nelle 10 iguane investigate durante i primi 60 secondi di indagine.

### 6.3.4 Applicazione della tecnica CEUS ai casi patologici

#### *Iguana P1*

Iguana P1, un maschio di 8 anni dal peso di 1,9 kg, è stata esclusa in seguito al reperto istopatologico di epatite linfocitica reattiva non specifica, in assenza tuttavia di alcuna sintomatologia. Per questo animale si erano inoltre messi in evidenza tramite l'esame biochimico valori elevati di AST. In assenza dell'esito istopatologico di epatite, tale parametro non sarebbe stato sufficiente per sospettare una sofferenza epatica, in quanto questo enzima non risulta essere particolarmente specifico nei rettili, ed è di solito riconducibile a patologie cardiache o muscolari quando associato, come in questo caso, ad un innalzamento contemporaneo della CK (McArthur, 2004).

Per quanto riguarda lo studio CEUS, i cui risultati sono schematizzati nella Tabella 27, si sono messi in evidenza valori bassissimi di picco, TTP, RBV e RBF.

	Peak (%)	TTP (sec)	RBV	RBF
Media soggetti sani	19,6	105,09	2982,57	21,21
Deviazione Standard soggetti sani	7,87	98,3	2649,13	11,02
Iguana P1	1,1	15,53	93,19	1,12

Tabella 27. Confronto tra i valori medi ottenuti dallo studio CEUS nei soggetti sani e nell'Iguana P1.

Conseguentemente alle percentuali di MDC minime visualizzate a livello epatico, non è stata possibile la costruzione di alcuna curva (Figura 98). La visualizzazione "real-time" della presenza di lieve MDC e la registrazione di una minima variazione nei valori (Tabella 27) escludono tuttavia che tale risultato possa essere associato ad uno scorretto posizionamento del catetere endovenoso. Inoltre, l'esame tomografico è stato eseguito con successo utilizzando lo stesso accesso venoso.

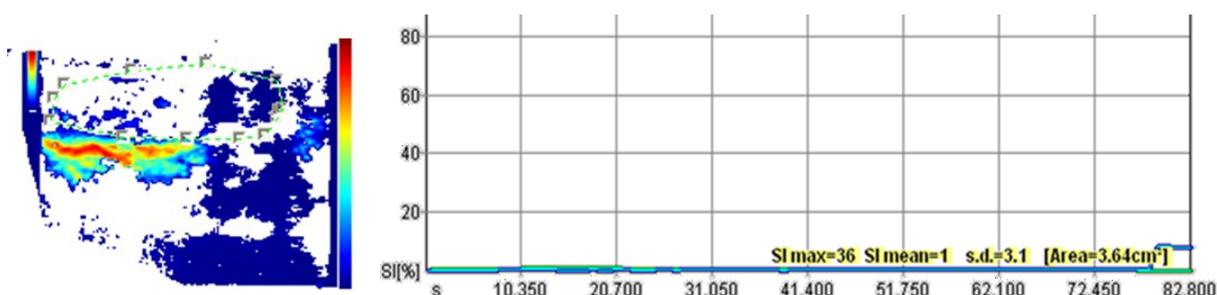


Figura 98. Area di calcolo e grafico del CEUS del Fegato di Iguana P1.

In merito all'esame tomografico, la media dei valori HU registrati a livello epatico prima dell'arrivo del MDC era di 82,3, mentre il valore a livello di picco, era di 186 HU. Entrambi i valori sono in accordo con i risultati evidenziati nei casi fisiologici, dove la media calcolata era di  $77,3 \pm 6,2$  HU prima del MDC, e di  $179,1 \pm 35,1$  durante il picco.

Nella Tabella 28 sono schematizzati i valori medi dei casi fisiologici relativi ai tempi di arrivo del MDC a livello di vasi epatici, di arrivo a livello di parenchima, e il TTP in confronto con quelli evidenziati nel caso Iguana P1. E' possibile notare come ci sia stato un allungamento dei tempi di diffusione del MDC a livello epatico, sebbene il TTP sia in realtà all'interno della media. Al fine di verificare questa teoria, è stato calcolato il tempo intercorso tra l'arrivo del MDC a livello epatico e il raggiungimento del picco, che risulta effettivamente maggiore in Iguana P1 in confronto alla media dei casi fisiologici (Tabella 28).

	Arrivo vasi epatici (sec)	Arrivo parenchima epatico (sec)	Picco nel parenchima epatico (sec)	Arrivo parenchima – picco parenchima (sec)
Media casi sani	10,7	15	31	16
Deviazione Standard casi sani	2,2	4,5	9,6	6,6
Iguana P1	4	5	34	29

**Tabella 28. Confronto tra i risultati ottenuti dall'analisi della TC dinamica nei soggetti sani e in Iguana P1.**

E' tuttavia essenziale sottolineare come questa stessa particolarità fosse stata evidenziata anche nel caso di Iguana 6, il cui fegato era risultato istopatologicamente normale. Con i dati a disposizione è pertanto impossibile relazionare in modo significativo questa modificazione allo stato di infiammazione del fegato.

Da un punto di vista grafico (Figura 99) la curva derivata per Iguana P1 rispetta il pattern di base individuato per i soggetti fisiologici, registrando tuttavia una fase di plateau a livello di picco, corrispondente al rallentamento individuato tra l'arrivo del MDC a livello epatico e il raggiungimento del picco. In questo animale, inoltre, si assiste ad un ritorno dei valori di HU a valori più bassi rispetto al valore individuato all'arrivo del MDC nei vasi epatici a 203 secondi, seppur continuando a registrare variazioni.

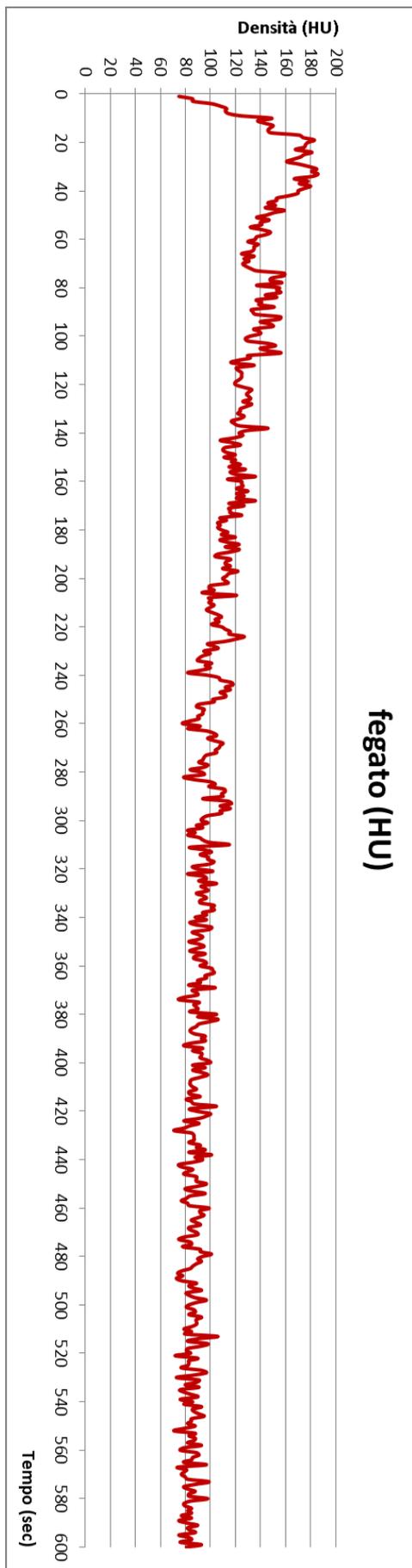


Figura 99. Grafico densità-tempo calcolato in Iguana P1 (indagine completa di 600 secondi).

Concludendo, è possibile affermare come nel caso di lieve epatite non accompagnata da sintomatologia clinica né da evidenza ecografica, si può dedurre come l'esame tomografico dinamico con contrasto possa non risultare significativo, sebbene in questo caso sia stato messo in evidenza un lieve rallentamento nel raggiungimento del picco a livello epatico. Sono invece particolarmente evidenti le modificazioni in corso di CEUS, dove si assiste ad una diffusione minimale del contrasto.

Considerando che il MDC rimane all'interno dei vasi nel CEUS mentre diffonde a livello di parenchima nella TC, la concomitanza di questi risultati farebbe pensare ad un calo della vascolarizzazione a livello epatico, carattere in realtà in disaccordo con le comuni alterazioni conseguenti ai fenomeni infiammatori.

### *Iguana P2*

Sebbene il fegato di questo animale risultasse sano dal punto di vista istopatologico, l'Iguana P2 è stata esclusa in conseguenza di cattive condizioni generali e dal reperto di una condizione patologica degenerativa a livello di articolazioni del ginocchio destro.

Per quanto riguarda la tecnica CEUS è possibile, analogamente a Iguana P1, mettere in evidenza una scarsa visualizzazione del MDC (Tabella 29).

	Peak (%)	TTP (sec)	RBV	RBF
Media soggetti sani	19,6	105,09	2982,57	21,21
Deviazione Standard soggetti sani	7,87	98,3	2649,13	11,02
Iguana P2	6,69	330,3	4594,35	7,74

Tabella 29. Confronto tra i valori medi ottenuti dallo studio CEUS nei soggetti sani e in Iguana P2.

A differenza del caso precedente, i valori registrati sono stati sufficienti per la costruzione di una curva, seppur minimale, caratterizzata da un picco basso e da un allungamento del TTP (Figura 100).

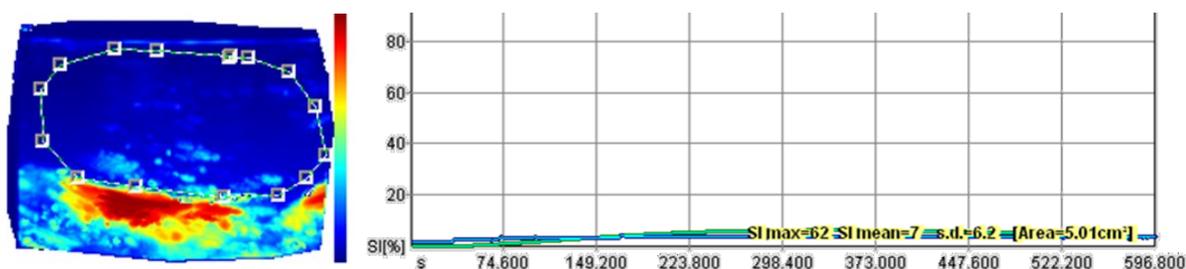


Figura 100. Grafico densità-tempo calcolato in Iguana P2 (indagine completa di 600 secondi).

Relativamente allo studio tomografico, i valori HU registrati a livello epatico prima dell'arrivo del MDC e durante il picco erano nella media dei soggetti sani (74,25 HU e 185 HU rispettivamente), così come il tempo di diffusione del MDC a livello del fegato (Tabella 30). Ciò è in accordo con una condizione fisiologica del fegato in questo animale. Il TTP particolarmente elevato è invece da relazionarsi ad un arrivo particolarmente ritardato del mezzo di contrasto a livello epatico, forse legato ad una condizione di ipotensione-ipovolemia conseguente allo stato di depressione dell'animale.

	Arrivo vasi epatici (sec)	Arrivo nel parenchima epatico (sec)	Picco nel parenchima epatico (sec)	Arrivo parenchima - picco parenchima (sec)
Media casi sani	10,7	15	31	16
Deviazione Standard casi sani	2,2	4,5	9,6	6,6
Iguana P2	80	98	119	20

**Tabella 30. Confronto tra i risultati ottenuti dall'analisi della TC dinamica nei soggetti sani e in Iguana P2.**

Da un punto di vista grafico è possibile visualizzare la scarsissima diffusione del mezzo di contrasto rispetto agli altri animali per quanto riguarda l'aorta. In questo soggetto il picco aortico è infatti notevolmente inferiore e manca completamente la prima fase rapida di wash out riscontrata nella curva fisiologica (Figura 101). La silhouette della curva delle densità a livello epatico appare invece sovrapponibile alla media, sebbene spostata verso destra.

Concludendo, è possibile affermare come uno stato di depressione generale dell'animale conseguente a patologie croniche e malnutrizione modifichi visivamente la diffusione del MDC a livello arterioso, probabilmente a seguito delle ripercussioni vascolari dello stato stesso, mentre nessuna variazione evidente sia presente in merito alle curve determinate dalla TC in merito alla diffusione del MDC a livello epatico, qualora non ci siano ripercussioni della patologia sull'organo (es. condizione di lipidosi grave conseguente all'anoressia). Poiché invece il MDC utilizzato nel CEUS non è in grado di diffondere a livello di parenchima, profonde modificazioni sono visibili anche durante il transito del MDC a livello di vascolarizzazione epatica.

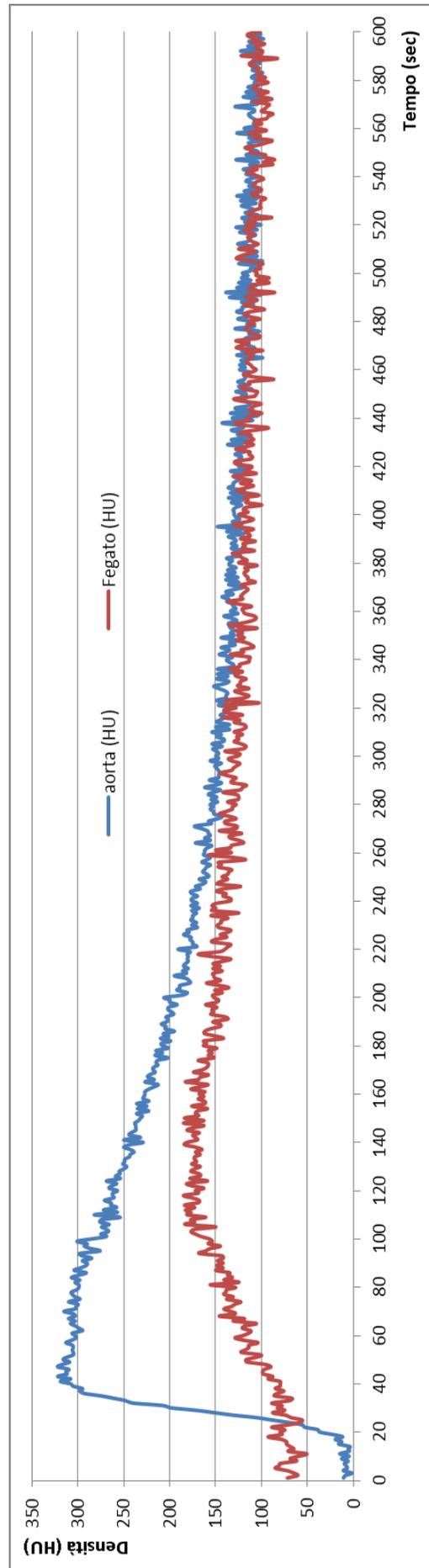


Figura 101. Grafico densità-tempo calcolato nell'iguana P1 (indagine completa di 600 secondi).

## Capitolo 7.

## CONCLUSIONI

Il presente studio rappresenta la prima applicazione della tecnica CEUS in alcune delle più diffuse specie di animali da compagnia non convenzionali, nonché la prima per quanto riguarda i rettili. In particolare sono stati investigati fegato e milza in furetti e conigli e il fegato nelle iguane.

Per quanto riguarda i mammiferi esotici, la tecnica è risultata di facile attuazione e i risultati ottenuti nei casi fisiologici erano in qualche modo equiparabili a quelli già documentati per il cane. In generale le curve erano costituite da una fase di wash in piuttosto rapida, un picco e una fase di wash out caratterizzata da una pendenza della curva minore rispetto alla fase precedente. Maggiore variabilità si è messa in evidenza nel caso della milza rispetto al fegato sia nei conigli che nei furetti e, in generale, nel coniglio rispetto al furetto per entrambi gli organi. Alcune difficoltà si sono messe in evidenza nell'esecuzione della tecnica CEUS nel coniglio per l'indagine della vascolarizzazione splenica, in conseguenza alle dimensioni molto limitate di quest'organo che ne rendono a volte difficile l'esame anche con la sonda lineare.

Per quanto riguarda invece le iguane, il protocollo utilizzato ha presentato delle limitazioni, principalmente dovute alle maggiori difficoltà tecniche nell'incannulazione rispetto a conigli e furetti, e alla presenza di artefatti nella visualizzazione ecografica. Entrambi questi fattori sono conseguenti alla presenza delle squame. La tecnica è stata tuttavia applicata con successo in tutti gli esemplari, mettendo in evidenza curve caratterizzate da picchi molto più bassi e da TTP più lunghi, in comparazione sia con il cane che con gli altri mammiferi inclusi nello studio. Il wash out del MDC non è mai stato completato nemmeno nei 10 minuti di indagine utilizzati negli ultimi soggetti, dove tuttavia è stato possibile individuarne l'andamento, con pendenza della curva simile al tratto di wash in.

Nelle iguane è stata eseguita anche la TC dinamica con mezzo di contrasto, applicata per la prima volta nella medicina dei rettili per quanto riguarda il fegato.

L'esecuzione dello studio in anestesia generale è avvenuta senza problemi. La variazione delle densità in aorta e nel parenchima epatico sono state valutate e i dati ottenuti sono risultati piuttosto ripetibili nei vari casi. Le curve registrate per l'aorta erano caratterizzate da un wash in molto rapido, un picco particolarmente elevato, e una fase di wash out inizialmente abbastanza rapida fino a raggiungere, a circa 200 secondi di indagine, una fase in cui i valori calavano quasi impercettibilmente, senza tornare ai valori iniziali entro i 600 secondi di indagine. Le curve epatiche erano caratterizzate invece da un wash in piuttosto

rapido, un picco relativamente basso, e una fase di wash out sovrapponibile a quella aortica, con inizio della fase di “plateau” tra i 100 e i 200 secondi.

Nonostante questa presentazione di base si sia mantenuta abbastanza bene nei diversi soggetti, una certa variabilità è stata notata in tre individui, risultato alquanto attendibile conseguentemente alla forte dipendenza da fattori sia intrinseci che estrinseci del metabolismo e della funzionalità epatica dei rettili.

L'intero protocollo è stato applicato in un furetto e due iguane patologiche, al fine di evidenziare le potenzialità cliniche delle tecniche. Sebbene il numero esiguo di casi non permetta di trarre conclusioni a questo riguardo, i risultati preliminari relativi possono essere usati da spunto per studi futuri.

## Capitolo 8

## BIBLIOGRAFIA

Arencibia A, Rivero MA, De Miguel I, Contreras S, Cabrero A, Oròs J. Computed tomographic anatomy of the head of the loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *Research in Veterinary Science*. 2006;81:165–169.

Bacci B, Vignoli M, Rossi F, Gallorini F, Terragni R, Laddaga EL, Sarli G. Primary prostatic leiomyosarcoma with pulmonary metastases in a dog. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 2010;46(2):103-6.

Balleyguiera C, Opolon P, Mathie MC, Athanasiou A, Garbay JR, Delalogue S, Dromain C. New potential and applications of contrast-enhanced ultrasound of the breast: Own investigations and review of the literature. *European Journal of Radiology*. 2009;69:14-23.

Banzato T, Selleri P, Veladiano IA, Martin A, Zanetti E, Zotti A. Comparative evaluation of the cadaveric, radiographic and computed tomographic anatomy of the heads of green iguana (*Iguana iguana*), common tegu (*Tupinambis merianae*) and bearded dragon (*Pogona vitticeps*). *BMC Veterinary Research*. 2012;8:53.

Baron RL. Understanding and Optimizing Use of Contrast Material for CT of the Liver. *AJR*. 1994;163:323-331.

Bleuzen A, Huang C, Olar M, Tchuenbou J, Tranquart F. Diagnostic Accuracy of Contrast-Enhanced Ultrasound in Focal Lesions of the Liver Using Cadence Contrast Pulse Sequencing. *Ultraschall Med*. 2006;27:40–48.

Bokor D. Diagnostic Efficacy of SonoVue. *American Journal of Cardiology*. 2000;86(suppl):19G–24G.

Campbell TW, Ellis C. *Avian and Exotic Animal Hematology and Cytology*. Ames: Blackwell publishing; 2007.

Capello V, Lennox A. *Clinical Radiology of Exotic Companion Mammals*. Ames: Blackwell publishing; 2008

Caremani M, Benci A, Lapini L, Tacconi D, Caremani A, Ciccotosto C, Magnolfi AL. Contrast enhanced ultrasonography (CEUS) in peripheral lung lesions: A study of 60 cases. *Journal of Ultrasound*. 2008;11:89-96.

Dawson P. Multi-slice CT contrast enhancement regimens. *Clinical Radiology*. 2004;59:1051–1060.

Diana A, Specchi S, Baron Toaldo M, Chiocchetti R, Laghi A, Cipone M. Contrast-enhanced ultrasonography of the small bowel in healthy cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2011;52(5):555-9.

Dimitrov R, Stamatova K, Russenov A, Kostov D, Vladova D, Stefanov M. Ultrasonographic qualitative characters of rabbit spleen (*Oryctolagus cuniculus*). *Trakia Journal of Sciences*. 2012;10:64-69.

Exacoustos C, Zupi E, Szaboles B, Amoroso C, Giovanni AD, Romanini ME, Arduini D. Contrast-Tuned Imaging and Second-Generation Contrast Agent SonoVue: A New Ultrasound Approach to Evaluation of Tubal Patency. *Journal of Minimally Invasive Gynecology*. 2009;16(4):437-444.

Feltrin GP, Zandonà M, Borile V, Rettore C, Miotto D. Fondamenti sui mezzi di contrasto iodati e reazioni avverse. *La Radiologia Medica*. 2004;107:8-31.

Fleischmann D, Kamaya A. Optimal Vascular and Parenchymal Contrast Enhancement: The Current State of the Art. *Radiologic Clinics of North America*. 2009;47:13-26.

Frye FL. *Iguana Iguana, Guide for Successful Captive Care*. Malabar: Krieger Publishing Company; 1995.

Gans C, Gaunt AS. *Biology of the Reptilia 19G, Visceral organs*. St Louis: Society for the Study of Amphibians and Reptiles; 1998.

Girling SJ, Raiti P. *BSAVA Manual of Reptiles*. Gloucester : BSAVA; 2004.

Görg C, Bert T. Second-Generation Sonographic Contrast Agent for Differential Diagnosis of Perisplenic Lesions. *AJR*. 2006;186:621–626.

Gramiak R, Shah PM. Echocardiography of the aortic root. *Investigative Radiology*. 1968;3:356–366.

- Haers H, Vignoli M, Paes G, Rossi F, Taeymans O, Daminet S, Saunders JH. Contrast harmonic ultrasonographic appearance of focal space-occupying renal lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2010;51(5):516-22.
- Hanley CS, Hernandez-Divers S. Practical Gross Pathology of Reptiles. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2003;12(2):71-80.
- Harcourt-Brown F. *Textbook of Rabbit Medicine*. London: Butterworth Heinemann; 2004.
- Jacobson ER. *Biology, Husbandry, and Medicine of the Green Iguana*. Malabar: Krieger Publishing Company; 2003.
- Jin-Mei G, Shao-Shan T, Wei F, Rong F. Signet-ring cell carcinoma of ampulla of Vater: contrast-enhanced ultrasound findings. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;21:888-891.
- Johnson-Delaney CA. The Ferret Gastrointestinal Tract and *Helicobacter mustelae* Infection. *Veterinary Clinics Exotic Animals*. 2005;8:197-212.
- Kono Y, Steinbach GC, Peterson T, Schmid-Schonbein GW, Mattrey RF . Mechanism of Parenchymal Enhancement of the Liver with a Microbubble-based US Contrast Medium: An Intravital Microscopy Study in Rats. *Radiology*. 2002;224:253-257.
- Krautwald Junghanns ME, Pees M, Reese S, Tully T. *Diagnostic Imaging of Exotic Pets*. Hannover: Schlutersche; 2011.
- Leen E, Horgan P. Ultrasound Contrast Agents for Hepatic Imaging with Nonlinear Modes. *Current Problems in Diagnostic Radiology*. 2003;66-87.
- Leinonen MR, Raekallio MR, Vainio OM, Sankari S, O'Brien RT. The effect of contrast-enhanced ultrasound on the kidneys in eight cats. *The Veterinary Journal*. 2011;190:109-112.
- Lencioni R, Cioni D, Bartolozzi C. Tissue Harmonic and contrast specific imaging: back to grey scale in ultrasound. *European Radiology*. 2002;32:151-165.
- Lewington JH. *Ferret Husbandry, medicine and Surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2007.

Lim AK, Patel N, Eckersley RJ, Taylor-Robinson SD, Cosgrove DO, Blomley MJ. Evidence for Spleen-specific Uptake of a Microbubble Contrast Agent: A Quantitative Study in Healthy Volunteers. *Radiology*. 2004;231:785–788.

Liu Y, Miyoshi H, Nakamura M. Encapsulated ultrasound microbubbles: Therapeutic application in drug/gene delivery. *Journal of Controlled Release*. 2006;114:89-99.

Lloyd M. *Ferrets health, husbandry and diseases*. Bodmin: Blackwell Science; 1999.

Mackey EB, Hernandez-Divers SJ, Holland M, Frank P. Clinical Technique: Application of Computed Tomography in Zoological Medicine. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2008;3:198-209.

Mader DR. *Reptile Medicine and Surgery*. St. Louis: Saunders Elsevier; 2006.

Maisano JA, Kearney M, Rowe T. Cranial Anatomy of the Spade-Headed Amphisbaenian *Diplometopon zarudnyi* (Squamata, Amphisbaenia) Based on High-Resolution X-ray Computed Tomography. *Journal of Morphology*. 2006;267:70-102.

Marshall KL. Rabbit Hematology. *Veterinary Clinics Exotic Animals*. 2008;11:551–567.

McArthur S, Wilkinson R, Meyer J. *Medicine and Surgery of Tortoises and Turtles*. Oxford: Blackwell Publishing Ltd; 2004.

Melillo A. Rabbit Clinical Pathology. *Journal of Exotic Pet Medicine*. 2007;16(3):35-145.

Meredith A, Rayment L. Liver Disease in Rabbits. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*. 2000;9:146-152.

Mitchell M, Tully T. *Manual of Exotic Pet Practice*. St Louis: Saunders; 2009.

Mondillo S, Galderisi M. Ecocardiografi “prêt à porter”: un mondo eterogeneo con potenziali usi ed utilizzatori. *Italian Heart Journal*. 2005;6:265-271.

Naff KA, Craig S. The Domestic Rabbit, *Oryctolagus Cuniculus*: Origins and History. In Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (p. 157-162). London: Elsevier; 2012.

- Nardini G, Leopardi S, Bielli M. Clinical Hematology in Reptilian Species. *Veterinary Clinics Exotic Animals*. 2013;16:1–30.
- Nicolau C, Vilana R, Catalá V, Bianchi L, Gilabert R, García A, Brù C. Importance of Evaluating All Vascular Phases on Contrast-Enhanced Sonography in the Differentiation of Benign from Malignant Focal Liver Lesions. *AJR*. 2006;186:158-167.
- Nyman HT, Kristensen AT, Kjelgaard M, McEvoy FJ. Contrast-enhanced ultrasonography in normal canine liver. Evaluation of imaging and safety parameters. *Veterinary Radiology and Ultrasound*; 2005;46, 243–250.
- O'Brien RT, Holmes SP. Recent Advances in Ultrasound Technology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 2007;22:93-103.
- Oglesbee BL. *The 5-Minute Veterinary Consult Ferret and Rabbit*. Ames: Blackwell Publishing; 2006.
- Ohlerth S, O'Brien RT. Contrast ultrasound: General principles and veterinary clinical applications. *The Veterinary Journal*; 2007;174:501-512.
- Ohlerth S, Rüefli E, Poirier V, Roos M, Kaser-Hotz B. Contrast harmonic imaging of the normal canine spleen. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2007;48(5):451-6.
- Ohlerth S, Scharf G. Computed tomography in small animals – Basic principles and state of the art applications. *The Veterinary Journal*. 2007;173:254–271.
- Pey P, Vignoli M, Haers H, Duchateau L, Rossi F, Saunders JH. Contrast-enhanced ultrasonography of the normal canine adrenal gland. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2011;52(5):560-7.
- Piscaglia F, Bolondi L. The Safety of Sonovue in Abdominal Applications: Retrospective Analysis of 23188 Investigations. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2006;32(9):1369–1375.
- Powers LV, Brown SA. Ferret: Basic anatomy, Physiology, and Husbandry. In Quesenberry KE, Carpenter JV. *Ferret, Rabbits and Rodents clinical medicine and surgery* (p. 1-12). St. Louis: Saunders, Elsevier Inc; 2012.

Preziosi R, Diana A, Florio D, Gustinelli A, Nardini G. Osteitis deformans (Paget's disease) in a Burmese python (*Python molurus bivittatus*) – A case report. *The Veterinary Journal*. 2007;174:669–672.

Puchalski SM. Advances in Equine Computed Tomography and Use of Contrast Media. *Veterinary Clinics Equine*. 2012;28:563–581.

Quesenberry KE, Carpenter JW. *Ferrets, Rabbits and Rodents clinical medicine and surgery*. St. Louis: Saunders Elsevier; 2012.

Rademacher N, Ohlerth S, Scharf G, Lalahova D, Sieber-Ruckstuhl N, Alt M, Roos M, Grest P, Kaser-Hotz B. Contrast-enhanced power and color Doppler ultrasonography of the pancreas in healthy and diseased cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 2008;22(6):1310-6.

Reese S. *Small Mammals Ultrasonography*. In: *Diagnostic Imaging of Exotic Pets*. Hannover: Schlutersche; 2011.

Reusch B. Rabbit Gastroenterology. *Veterinary Clinics Exotic Animals*. 2005;8:351–375.

Rieppel O. The naso-frontal joint in snakes as revealed by high-resolution X-ray computed tomography of intact and complete skulls. *Zoologischer Anzeiger*. 2007;246:177–191.

Rossi F. Ecografia con mezzo di contrasto: principi generali e applicazioni in medicina veterinaria. *Veterinaria*. 2007;21(5):49-60.

Rossi F, Leone VF, Vignoli M, Laddaga E, Terragni R. Use of contrast-enhanced ultrasound for characterization of focal splenic lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2008;49(2):154-164.

Rossi F, Rabba S, Vignoli M, Haers H, Terragni R, Saunders JH. B-mode and contrast-enhanced sonographic assessment of accessory spleen in the dog. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2010;51(2):173-7.

Rubel A, Isenbugel E, Wolvekamp P. *Atlante di Diagnostica Radiologica dei Piccoli Animali Esotici*. Roma: Antonio Delfino Editore; 1992.

Russo M, Vignoli M, Catone G, Rossi F, Attanasi G, England GC. Prostatic perfusion in the dog using contrast-enhanced Doppler ultrasound. *Reproduction in Domestic Animals*. 2009;44(Suppl 2):334-5.

Russo M, Vignoli M, England GC. B-mode and contrast-enhanced ultrasonographic findings in canine prostatic disorders. *Reproduction in Domestic Animals*. 2012;47(Suppl 6):238-42.

Sboros V, Averkiou M, Lampaskis M, Thomas DH, Silva N, Strouthos C, Docherty J, Mc Neilly AS. Imaging of the Ovine Corpus Luteum Microcirculation with Contrast Ultrasound. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2011;37(1):59–68.

Schroeder RJ, Bostanjoglo M, Rademaker J, Maeurer J, Felix R. Role of power Doppler techniques and ultrasound contrast enhancement in the differential diagnosis of focal breast lesions. *European Radiology*. 2003;13:68–79.

Serra C, Menozzi G, Labate AMM, Giangregorio F, Gionchetti P, Beltrami M, Robotti D, Fornari F, Cammarota T. Ultrasound assessment of vascularization of the thickened terminal ileum wall in Crohn's disease patients using a low mechanical index real-time scanning technique with a second generation ultrasound contrast agent. *European Journal of Radiology*. 2007;62:114-121.

Slomka-McFarland EF. *Clinical Anatomy of Lizards*. Proceedings of 84th Annual Western Veterinary Conference. Las Vegas;2012.

Sohn J, Couto MA. Rabbit Anatomy, Physiology, and Behavior. In Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (p. 195-2015). St. Louis: Saunders Elsevier; 2012.

Specchi S. Impiego della tecnica ecocontrastografica nella valutazione dell'apparato gastroenterico del gatto. Tesi di dottorato in Clinica e Terapia d'Urgenza Veterinaria. Università degli studi di Bologna; 2011.

Stewart VR, Sidhu PS. New directions in ultrasound: microbubble contrast. *The British Journal of Radiology*. 2006;79:188–194.

Thomsen HS. European Society of Urogenital Radiology (ESUR) guidelines on the safe use of iodinated contrast media. *European Journal of Radiology*. 2006;60:307–313.

Thorelius L. Contrast-enhanced ultrasound for extrahepatic lesions: preliminary experience. *European Journal of Radiology*. 2004;51S:S31–S38

Tidwell AS. Advanced Imaging Concepts: A Pictorial Glossary of CT and MRI Technology. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 1999;14(2):65-111.

Tinke PT, Uthamanthil RK, Weisbroth SH. Rabbit Neoplasia. In Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (p. 447-501). St. Louis: Saunders Elsevier; 2012.

Trillaud H, Bruel JM, Valette PJ, Vilgrain V, Schmutz G, Oyen R, Jakubowski W, Danes J, Valek V, Greis C. Characterization of focal liver lesions with SonoVue®- enhanced sonography: International multicenter-study in comparison to CT and MRI. *World Journal of Gastroenterology*. 2009;15(30):3748-3756.

Unger EC, Porter T, Culp W, Labell R, Matsunaga T, Zutshi R. Therapeutic applications of lipid-coated microbubbles. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56:1291– 1314.

Valente ALS, Cuenca R, Zamora M, Parga ML, Lavin S, Alegre F, Marco I. Computed tomography of the vertebral column and coelomic structures in the normal loggerhead sea turtle (*Caretta caretta*). *The Veterinary Journal*. 2007;174:362–370.

Vella D, Donnelly TM. Rabbits: basic anatomy, Physiology, and Husbandry. In Quensenberry KE, Carpenter JV. *Ferret, Rabbits, and Rodents: clinical medicine and surgery* (p. 157 - 173). St. Louis: Saunders, Elsevier Inc; 2012.

Vignoli M. Tomografia Computerizzata. In *Radiologia del cane e del gatto* (capitolo 11). Milano: Poletto Editore; 2005.

Vignoli M, Russo M, Catone G, Rossi F, Attanasi G, Terragni R, Saunders J, England G. Assessment of vascular perfusion kinetics using contrast-enhanced ultrasound for the diagnosis of prostatic disease in dogs. *Reproduction Domestic Animals*. 2011;46(2):209-13.

Yamaya Y, Niizeki JK. Anaphylactoid response to Optison (R) and its effects on pulmonary function in two dogs. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2004;66(11):1429-1432.

Yanagisawa K, Moriayasu F, Miyahara T, Yuki M, Iijima H. Phagocytosis of ultrasound contrast agent microbubbles by kuppfer cells. *Ultrasound in Medicine and Biology*. 2007;33(2):318–325.

Wang Y, Cheng Z, Li J, Tang J. Gray-scale contrast-enhanced utrasonography in detecting sentinell lymph nodes: An animal study. *European Journal of Radiology*. 2010;74:55-59.

Washington IM, Hoosier GV. *Clinical Biochemistry and Hematology*. In Suckow MA, Stevens KA, Wilson RP. *The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents* (p. 57–116). St. Louis: Saunders Elsevier; 2012.

Webster N, Holloway A. Use of contrast ultrasonography in the diagnosis of metastatic feline visceral haemangiosarcoma. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2008;10:388-394.

Wei K, Le E, Bin JP, Coggins M, Thorpe J, Kaul S. Quantification of Renal Blood Flow With Contrast-Enhanced Ultrasound. *Journal of the American College of Cardiology*. 2001;37:1135–40.

Wolf TM. The Ferret. In Michelle M, Tully T. *Manual Of Exotic Pet Practice* (p. 345-375). St. Louis: Saunders; 2009.

Ziegler LE, O'Brien RT, Waller KR, Zagzebski JA. Quantitative contrast harmonic ultrasound imaging of normal canine liver. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2003;44,:451–454.

Zwingenberger AL, Schwarz T. Dual-phase CT Angiography of the Normal Canine Portal and Hepatic Vasculature. *Veterinary Radiology and Ultrasound*. 2004;45(2):117–124