

ALMA MATER STUDIORUM – UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

DOTTORATO DI RICERCA IN

Scienze Veterinarie

Ciclo XXX°

Settore Concorsuale: 07/H4

Settore Scientifico Disciplinare: VET/08

**ESAME ECOGRAFICO CON MEZZO DI CONTRASTO (CEUS) NELLO
STUDIO DELLE PATOLOGIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO**

Presentata da: Nikolina Linta

Coordinatore Dottorato

Chia.mo Prof Arcangelo Gentile

Supervisore

Chia.ma Prof.ssa Alessia Diana

Esame finale anno 2018

ESAME ECOGRAFICO CON MEZZO DI CONTRASTO (CEUS) NELLO STUDIO DELLE PATOLOGIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO

- RIASSUNTO -

Il progetto di ricerca sviluppato durante i tre anni di Dottorato si è incentrato sulla valutazione dell'applicabilità dell'esame ecocontrastografico (CEUS) nello studio delle patologie dell'apparato gastroenterico (GE) dei piccoli animali ed in particolare dell'*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) e dell'ischemia gastrointestinale.

In merito alla prima patologia sono stati condotti due studi in parallelo: uno con lo scopo di determinare l'applicabilità della metodica ecocontrastografica nella valutazione della perfusione parietale del duodeno in una popolazione di cani affetti da IBD e l'altro al fine di valutare l'applicabilità della CEUS nel monitoraggio della risposta terapeutica. È stato arruolato quindi un gruppo di cani affetti da IBD (42 soggetti) e uno di cani sani (gruppo di controllo) sui quali sono stati formulati e confrontati degli score clinici, ecografici, ecocontrastografici, endoscopici e istologici della parete duodenale. Inoltre in un ristretto gruppo di soggetti portatori di IBD (12 soggetti) tali score sono stati confrontati sia al momento della diagnosi (T0) sia dopo un intervallo di tempo standardizzato dall'inizio della terapia (T1). Nello specifico non sono state osservate differenze nella modalità di distribuzione del mezzo di contrasto nella parete duodenale tra soggetti sani e quelli portatori di IBD, e tra soggetti con IBD al T0 e al T1. La quantificazione delle variabili perfusive CEUS ha invece evidenziato differenze statisticamente significative tra soggetti sani e malati per quanto riguarda il *Peak Intensity* (PI) e il *Mean Transit Time* (MTT). Nessuna differenza statisticamente significativa è stata evidenziata invece nelle variabili CEUS dei soggetti con IBD pre- e post-terapia. Sulla base di questi risultati preliminari è possibile affermare che la metodica CEUS si è dimostrata utile nel distinguere i cani malati dai soggetti sani ma non è stata in grado di fornire elementi utili per il monitoraggio della terapia.

Per quanto concerne invece lo studio delle patologie ischemiche GE è stato incluso un piccolo gruppo di cani e gatti (5 pazienti) con lesioni ischemiche di diversa natura. La CEUS ha mostrato una severa riduzione o una completa assenza della perfusione parietale del tratto gastroenterico colpito in confronto alla normale perfusione dei tratti intestinali circostanti dimostrando l'applicabilità e l'utilità di questa metodica nel determinare un danno perfusivo parietale in analogia con quanto già dimostrato in Medicina Umana.

CONTRAST ENHANCED ULTRASOUND (CEUS) FOR CHARACTERISATION OF GASTROINTESTINAL DISEASES

- ABSTRACT -

The research project of my PHD was focused on contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) for the evaluation of two different small animal gastrointestinal (GI) diseases: *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) and GI ischemia.

Concerning the first disease, 42 dogs with IBD and 20 clinically healthy dogs were included in the study. CEUS of the duodenum was performed to characterize the perfusion of the wall both in healthy and affected dogs. For 12 patients with IBD we performed comparisons of the CEUS parameters before and after two months of a standardized treatment. The duodenal wall exhibited a typical perfusion pattern characterized by a radial and simultaneous enhancement of wall. No differences were observed on the contrast medium distribution between healthy and affected dogs, and between dogs with IBD before and after treatment. Statistically significant differences occurred in the peak intensity and mean transit time between healthy and affected dogs. No significant differences were found for the perfusion parameters before and after treatment.

In conclusion, this preliminary study demonstrated that CEUS is useful in distinguishing sick dogs from healthy ones, but it was not able to provide useful information to monitor therapeutic response.

Concerning the second disease, the aim of this study was to describe the use of CEUS in a case series of small animal with confirmed GI ischemia. On conventional US all GI lesions were characterized by a focal hypoechoic thickening of the gastric/intestinal wall with loss of normal layering associated with hyperechoic mesentery surrounding the affected GI tract. CEUS showed a severe reduced or absent enhancement of the GI lesions compared to the normally perfused surrounding gastric/intestinal wall. The CEUS features observed in our patients with GI ischemia are similar to those reported in humans. These preliminary findings demonstrated the feasibility and usefulness of CEUS for the detection of canine and feline GI wall impaired perfusion.

INDICE

ESAME ECOGRAFICO CON MEZZO DI CONTRASTO (CEUS) NELLO STUDIO DELLE PATOLOGIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO – CONFRONTO CON LA MEDICINA UMANA

| | |
|---|---|
| Stato dell'arte in Medicina Umana | 1 |
| Bibliografia | 6 |

ESAME ECOCONTRASTOGRAFICO (CEUS) DEL DUODENO IN CANI AFFETTI DA INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

| | |
|---------------------------------|----|
| Introduzione | 11 |
| Materiali e metodi | 13 |
| Risultati | 22 |
| Discussione e conclusioni | 35 |
| Bibliografia | 41 |

ESAME ECOCONTRASTOGRAFICO (CEUS) DEL DUODENO IN CANI AFFETTI DA INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD): VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

| | |
|---------------------------------|----|
| Introduzione | 49 |
| Materiali e metodi | 50 |
| Risultati | 52 |
| Discussione e conclusioni | 58 |
| Bibliografia | 61 |

ECOGRAFIA CON MEZZO DI CONTRASTO (CEUS) IN CORSO DI ISCHEMIA GASTROINTESTINALE NEI PICCOLI ANIMALI

| | |
|---------------------------------|----|
| Introduzione | 64 |
| Materiali e metodi | 65 |
| Risultati | 68 |
| Discussione e conclusioni | 78 |
| Bibliografia | 82 |

ESAME ECOGRAFICO CON MEZZO DI CONTRASTO (CEUS) NELLO STUDIO DELLE PATOLOGIE DELL'APPARATO GASTROENTERICO – CONFRONTO CON LA MEDICINA UMANA

STATO DELL'ARTE IN MEDICINA UMANA

In Medicina Umana, la metodica ecocontrastografica (*contrast-enhanced ultrasound* - CEUS) è ampiamente impiegata nella valutazione delle lesioni gastroenteriche di diversa natura (Badea *et al.*, 2010). La sua utilità è principalmente attribuibile alle ridotte dimensioni (3-5 μ m) del mezzo di contrasto di seconda generazione che riesce a raggiungere la rete capillare, fornendo così un'adeguata rappresentazione del microcircolo del tratto gastroenterico (Maconi *et al.*, 2007). La CEUS è una metodica non invasiva e molto meno costosa rispetto ad altre tecniche di *imaging* pesanti quali la tomografia computerizzata e la risonanza magnetica. E' inoltre ben tollerata considerando che l'incidenza di casi di ipersensibilità o fenomeni allergici nei confronti del mezzo di contrasto ecografico è stata stimata intorno allo 0,001% (Benedetti *et al.*, 2013). In bibliografia umana oltre agli studi che descrivono le fasi della presa di contrasto della parete di un'ansa intestinale normale (Catalano *and* Farina, 2014) sono presenti anche lavori che dimostrano come le patologie di questo apparato (infiammatorie, neoplastiche e ischemiche) siano spesso accompagnate da un'alterazione (aumento, diminuzione o assenza) della perfusione della parte stessa. La combinazione tra rilievi ottenuti mediante ecografia bidimensionale, color Doppler e CEUS risulta fondamentale per:

- visualizzare i vasi mesenterici in pazienti con sospetta patologia gastrointestinale, acuta o cronica;
- migliorare la visualizzazione della parete intestinale dimostrando la presenza di iperemia infiammatoria nei segmenti coinvolti;

- valutare i segni di infiammazione acuta o cronica, la localizzazione della lesione e la sua gravità;
- valutare l'efficacia terapeutica di un trattamento anti-infiammatorio;
- rilevare i tipici pattern di ischemia intestinale e verificare o escludere la presenza di stenosi o occlusioni a carico dei vasi mesenterici;
- monitorare i pazienti in corso di malattia da trapianto (*graft-versus-host disease*, GVHD) (Braden *et al.*, 2010).

Le **patologie infiammatorie** croniche sono quelle maggiormente studiate ed in particolare il comportamento del mezzo di contrasto ecografico è stato ben documentato nella malattia di Crohn e nella colite ulcerativa (Maconi *et al.*, 2007). In queste due patologie, l'ecografia con mezzo di contrasto è stata principalmente proposta per valutare l'attività della malattia, per diagnosticare e caratterizzare le sue principali complicanze (ascessi, fistole e stenosi) e monitorare la risposta alla terapia (Serra *et al.*, 2007; Migaletto *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Girlich *et al.*, 2011; Catalano and Farina, 2014; Maconi *et al.*, 2007). La metodica CEUS, inoltre, è risultata molto utile anche per valutare il tipo di approccio terapeutico delle complicanze associate al Morbo di Crohn, come la stenosi intestinale con conseguente stato occlusivo-subocclusivo. Se quest'ultima è infatti legata a una forma infiammatoria è caratterizzata da un marcato *enhancement* e quindi è responsiva alla terapia medica; se è dovuta invece ad una forma fibrotica, in cui si ha una scarsa perfusione, è di solito necessario un trattamento chirurgico (Catalano and Farina, 2014). In generale, sia per il Morbo di Crohn sia per la colite ulcerativa, la valutazione quantitativa della presa di contrasto della parete intestinale può rappresentare un'ottima alternativa all'endoscopia nello studio dell'attività infiammatoria e della risposta al trattamento, senza l'invasività e i rischi connessi all'ileo-colonscopia (Socaciu *et al.*, 2015).

Un'altra applicazione della metodica CEUS è la valutazione delle **neoplasie** a carico **dell'apparato gastrointestinale** (carcinoma gastrico, carcinoma colon-rettale e tumori stromali gastroenterici). Mediante l'utilizzo

del mezzo di contrasto si può rilevare un'augmentata vascolarizzazione delle pareti infiltrate dal tumore con la presenza di macrovasi, inoltre l'*enhancement* si presenta eterogeneo con la presenza di piccoli difetti perfusivi (Braden *et al.*, 2010; Maconi *et al.*, 2007). In particolare, la CEUS viene impiegata per individuare parametri prognostici e fornire indici di sopravvivenza in relazione all'invasività della neoplasia. Con questa metodica è infatti possibile valutare l'entità della neoangiogenesi ed il potenziale metastatico della neoplasia stessa e monitorare, nelle lesioni non operabili, l'efficacia di un eventuale trattamento medico, valutando la riduzione della vascolarizzazione tumorale dopo la somministrazione di chemioterapici o anti-angiogenetici (Braden *et al.*, 2010; Maconi *et al.*, 2007).

L'ecografia con mezzo di contrasto è ampiamente utilizzata anche per rilevare la presenza di **ischemie intestinali**, conseguenti a strangolamento, embolismo dell'arteria mesenterica superiore, ischemia mesenterica non-occlusiva o occlusioni intestinali (Braden *et al.*, 2010). Sebbene l'angiografia rappresenti ancora il *gold standard*, recentemente uno studio ha dimostrato come l'ecografia con mezzo di contrasto rappresenti una metodica accurata, sensibile e specifica nella valutazione delle ischemie intestinali (Kanzaki *et al.*, 2012). In corso di patologia ischemica di un'ansa intestinale, con la metodica CEUS si osserva una grave riduzione o una completa assenza di *enhancement* dell'ansa coinvolta, a differenza delle anse circostanti la presa di contrasto è normale in tutto lo spessore parietale (Hata *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2007; Giannetti *et al.*, 2010; Kanzaki *et al.*, 2012). Una diagnosi tempestiva, poco invasiva e il più sicura possibile di ischemia mesenterica è essenziale per permettere un adeguato approccio terapeutico, che sia questo medico o chirurgico (Hata *et al.*, 2005; Hamada *et al.*, 2007; Giannetti *et al.*, 2010; Kanzaki *et al.*, 2012).

Un altro utilizzo importante della metodica CEUS è la valutazione della **malattia da trapianto** contro l'ospite o, *graft-versus-host disease* (GVHD). Questa patologia, che colpisce circa il 50-70% dei pazienti sottoposti a trapianto e può causare severi danni a cute, fegato e intestino, con un alto

tasso di morbilità e mortalità. I siti più colpiti, in corso di GVHD intestinale sono l'ileo terminale e il colon (Schreyer *et al.*, 2011). In questa patologia è fondamentale una diagnosi precoce, in quanto un rapido intervento terapeutico può limitare la progressione della patologia e quindi migliorare la prognosi del paziente (Schreyer *et al.*, 2011). All'esame CEUS si osserva un aumento dell'*enhancement* arterioso dovuto alla neoangiogenesi a livello di parete intestinale e una fase prolungata di *wash-out* venoso legato alla formazione di edema infiammatorio (Benedetti *et al.*, 2013). Un altro rilievo riscontrabile durante la CEUS, in pazienti con GVHD, è la penetrazione del mezzo di contrasto, attraverso la parete, all'interno del lume intestinale e questo può essere causato da: danneggiamento della barriera mucosale della parete che diventa più permeabile; danno apoptotico a carico delle cellule epiteliali legato alla perdita delle cripte; terapia a base di inibitori della calcineurina e steroidi che può portare a danno endoteliale ed emorragie pericapillari (Schreyer *et al.*, 2011).

A differenza della corposa bibliografia presente in Medicina Umana per quanto concerne le applicazioni cliniche della metodica CEUS in corso di patologie a carico dell'apparato gastroenterico, in Medicina Veterinaria sono presenti solo pochi studi riguardanti la perfusione parietale del piccolo intestino (duodeno e digiuno) in soggetti sani (Leinonen *et al.*, 2010; Diana *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017). Non sono infatti riportati studi in merito all'applicazione della CEUS in corso di patologie dello stomaco e dell'intestino nei piccoli animali fatta eccezione per due *abstracts* che descrivono l'applicabilità della metodica CEUS in corso di ischemia gastroenterica (Brower *et al.*, 2016; Linta *et al.*, 2016) ed un *abstract* che valuta la possibilità di utilizzare la CEUS come metodica di *imaging* non-invasiva per la diagnosi di *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) (Caivano *et al.*, 2017).

Lo scopo della ricerca sviluppata nell'ambito del periodo di Dottorato è stata pertanto quello di valutare l'applicabilità della metodica CEUS nello studio e

nel monitoraggio di alcune patologie gastroenteriche nei piccoli animali quali l'*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) e l'ischemia gastrointestinale.

BIBLIOGRAFIA

Badea R., Socaciu M., Ciobanu L., Hagiu C., Golea A. (2010). Contrast-Enhanced Ultrasonography (CEUS) for the Evaluation of the Inflammation of the Digestive Tract Wall. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*, 19: 439-444.

Benedetti B., Bruno B., McDonald G. B., Paolicchi A., Caracciolo F., Papineschi F., Pelosini M., Campani D., Galimberti S., Petrini M. (2013). Prospective qualitative and quantitative non-invasive evaluation of intestinal acute GVHD by contrast-enhanced ultrasound sonography. *Bone Marrow Transplantation*, 48: 1421-1428.

Braden B., Ignee A., Hocke M., Palmer R. M., Dietrich C. (2010). Diagnostic value and clinical utility of contrast enhanced ultrasound in intestinal disease. *Digestive and Liver Disease*, 42: 667–674.

Brower C. J., Jiménez D. A., Shaema A., Howerth E. W., Radlinsky M. A. (2016). Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of small intestinal viability in dogs with obstructive foreign material. Proceedings of the Annual ACVR Conference. October 7 to 10, Minneapolis, Minnesota. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 85.

Catalano O., Farina R., (2014). CEUS dell'intestino. In: Farina R., Catalano O., *Ecografia con mezzi di contrasto CEUS – applicazioni extraepatiche*, 1° ed. Eli Medica, 135-142.

Caivano D., Marchesi M. C., Rishniw M., Timpano C., Giorgi M. E., Antognoni M. T., Conti M. B., Miglio A., Lepri E., Biretoni F. (2017). Contrast-Enhanced Ultrasonography of the Duodenum in Dogs with

Inflammatory Bowel Disease: Preliminary Findings. Proceedings of the 27th ECVIM- Ca Annual Conference. September 14 to 16, St. Julian's, Malta.

Diana A., Specchi S., Baron Toaldo M., Chiocchetti R., Laghi A., Cipone M. (2011). Contrast enhanced ultrasonography of the small bowel in healthy cats. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 52: 555-559.

Giannetti A., Biscontri M., Randisi P., Cortese B., Minacci C., Stumpo M. (2010). Contrast-enhanced sonography in the diagnosis of acute mesenteric ischemia: case report. *Journal of Critical Ultrasound*, 38: 156-160.

Girlich C., Schacherer D., Jung E. M., Klebl F., Huber E. (2011). Comparison between quantitative assessment of bowel wall vascularization by contrast-enhanced ultrasound and results of histopathological scoring in ulcerative colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, 27: 193-198.

Hamada T., Yamauchi M., Tanaka M., Hashimoto Y., Nakai K., Suenaga K. (2007). Prospective evaluation of contrast-enhanced ultrasonography with advanced dynamic flow for the diagnosis of intestinal ischaemia. *The British Journal of Radiology*, 80: 603-608.

Hata J., Kamada T., Haruma K., Kusunoki H. (2005). Evaluation of bowel ischemia with contrast-enhanced US: initial experience. *Radiology*, 236: 712-715.

Jimenez D. A., O'Brien R. T., Wallace J. D., Klocke E. (2011). Intraoperative contrast-enhanced ultrasonography of normal canine jejunum. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 52: 196-200.

Johnson-Neitman J. L., O'Brien R. T., Wallace J. D. (2012). Quantitative perfusion analysis of the pancreas and duodenum in healthy dogs by use of contrast-enhanced ultrasonography. *Journal of Veterinary Research*, 73: 385-392.

Kanzaki T., Hata J., Imamura H., Manabe N., Okei K., Kusunoki H., Kamada T., Shiotani A., Haruma K. (2012). Contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid for the evaluation of bowel ischemia. *Journal of Medical Ultrasonics*, 39: 161-167.

Leinonen M. R., Raekallio M. R., Vainio O. M., Ruohoniemi M. O., Biller D. S., O'Brien R. T. (2010). Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidneys, liver, pancreas, small intestine, and mesenteric lymph nodes in healthy cats. *American Journal of Veterinary Research*, 71: 1305-1311.

Linta N., Baron Toaldo M., Cordella A., Pey P., Quinci M., Cipone M., Diana A. (2016). Contrast-enhanced ultrasound feature of gastrointestinal ischemia in dogs and cats: a case series. Proceedings of the 20th EVDI Annual Conference. August 31 to September 3, Wroclaw, Poland. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 663-664.

Maconi G., Bezzio C., Bianchi Porro G. (2007). Ecografia con mezzo di contrasto nelle patologie gastroenteriche. In: Quaia E., *Mezzi di contrasto in ecografia: applicazioni addominali*, 1° ed. Springer, 177-184.

Migaleddu V., Scanu A. M., Quaia E., Cossu Rocca P., Dore M. P., Scanu D., Azzali L., Virgilio G. (2009). Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of inflammatory activity in Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 137: 43-61.

Nisa K., Lim S.Y., Shinohara M., Nagata N., Sasaoka K., Dermlim A., Leela-Arpon R., Morita T., Yokoyama N., Osuga T., Sasaki N., Morishita K., Nakamura K., Ohta H., Takiguchi M. (2017). Repeatability and reproducibility of quantitative contrast enhanced ultrasonography for assessing duodenal perfusion in healthy dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 17: 0174.

Ripollés T., Martinez-Perez M. J., Paredes M. J., Blanc E., Flors L., Delgado F. (2009). Correlation of findings at contrast-enhanced US with severity at endoscopy. *Radiology*, 253: 241-248.

Ripollés T., Rausell N., Paredes J. M., Grau E., Martinez M. J., Vizuete J. (2011). Effectiveness of contrast-enhanced ultrasound for characterization of intestinal inflammation in Crohn's disease: A comparison with surgical histopathology analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7: 120-128.

Schreyer A. G., Landfried K., Zorger N., Hoffstetter P., Ammer J., Fellner C., Friedrich C., Andreesen R., Holler E., Jung E. M. (2011). Transmural penetration of intravenously applied microbubbles during contrast-enhanced ultrasound as a new diagnostic feature in patients with GVHD of the bowel. *Bone Marrow Transplantation*, 46: 1006-1011.

Serra C., Menozzi G., Morselli Labate A. M., Giangregorio F., Gionchetti P., Beltrami M., Robotti D., Fornari F., Cammarota T. (2007). 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*, 62: 114-121.

Socaciu M., Ciobanu L., Diaconu B., Hagiuc C., Seicean A., Badea R. (2015). Non- invasive assessment of inflammation and treatment response in patient with Crohn's disease and ulcerative colitis using contrast-enhanced ultrasonography quantification. *Journal of Gastrointestinal and Liver Disease*, 24: 457-465.

ESAME ECOCONTRASTOGRAFICO (CEUS) DEL DUODENO IN CANI AFFETTI DA INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD)

INTRODUZIONE

Con il termine *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) s'indica una serie di enteropatie croniche caratterizzate da segni gastroenterici persistenti e/o ricorrenti e da un'infiltrazione da parte di cellule infiammatorie di vario tipo (linfociti, plasmacellule, eosinofili, neutrofilo o combinazioni di queste) di solito localizzate nella lamina propria della mucosa intestinale e nello spessore dell'epitelio (Luckschander *et al.*, 2009; Allenspach, 2011; Simpson *and* Jergens, 2011). Nonostante l'esatta patogenesi dell'IBD nei piccoli animali non sia stata ancora completamente chiarita, moltissimi studi sui processi infiammatori cronici in Medicina Umana (come ad esempio il Morbo di Crohn e la Colite Ulcerativa) hanno portato alla formulazione di varie ipotesi. La patogenesi è considerata multifattoriale; giocano, infatti, un ruolo importante, i fattori genetici, quelli micro-ambientali dell'intestino (principalmente batteri/microbioti e costituenti della dieta) ed il sistema immunitario (Allenspach, 2011; Simpson *and* Jergens, 2011). La diagnosi di IBD prevede l'integrazione tra segnalamento, anamnesi, segni clinici, test laboratoristici, esame ecografico dell'addome, esame endoscopico e istologico da campioni bioptici intestinali (Luckschander *et al.*, 2009; Simpson *and* Jergens, 2011; Slovak *et al.*, 2015).

Diversi metodi sono stati proposti per cercare di valutare il grado di severità dell'IBD e attualmente il più accreditato è la valutazione istopatologica di campioni bioptici (Washabau *et al.*, 2010) eseguita secondo il metodo standardizzato sviluppato dal *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* (WSAVA) con lo scopo di uniformare la diagnosi di infiammazione gastroenterica tra i diversi patologi (Day *et al.*, 2008). I campioni bioptici sono ottenuti mediante una procedura poco

invasiva come l'endoscopia flessibile; tali campioni, in alcuni casi, possono risultare non diagnostici se sono numericamente scarsi, di dimensioni piccole e fragili.

L'esame ecografico dell'addome rappresenta un valido strumento per la diagnosi delle patologie intestinali dei piccoli animali ma i segni ecografici in corso di IBD oltre a non essere specifici per la malattia, non sempre sono presenti o in accordo con la sintomatologia clinica stessa (Gaschen *et al.*, 2008; Gaschen, 2011; Penninck *and* d'Anjou, 2015).

In Medicina Umana l'esame ecocontrastografico (CEUS) della parete intestinale è ormai tra le applicazioni cliniche validate nei soggetti con Morbo di Crohn al fine di individuare le fasi attive di malattia e per il monitoraggio della risposta alla terapia della malattia stessa (Serra *et al.*, 2007; Migaletto *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Girlich *et al.*, 2012; Wong *et al.*, 2012; Romanini *et al.*, 2014; Medellin-Kowalewski *et al.*, 2016; Mocchi *et al.*, 2017).

In Medicina Veterinaria sono presenti numerosi lavori sulle applicazioni della CEUS per lo studio della perfusione parenchimale di organi normali ma anche di parenchimi con lesioni focali/multifocali (fegato, milza, reni, surrenali, pancreas, alterazioni toraciche non cardiache) (Haers *et al.*, 2010; Wdowiak *et al.*, 2010; Taeymans *and* Penninck, 2011; Pey *et al.*, 2014; Rademacher *et al.*, 2016; Linta *et al.*, 2017). Per quanto concerne l'apparato gastroenterico sono riportati solo pochi studi riguardanti la perfusione parietale duodenale in cani e gatti sani (Leinonen *et al.*, 2010; Diana *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017), due *abstract* sulle ischemie intestinali (Brower *et al.*, 2016; Linta *et al.*, 2016) ed un solo *abstract* che valuta la possibilità di utilizzare la CEUS come metodica di *imaging* non-invasiva per la diagnosi di *Inflammatory Bowel Disease* (IBD) (Caivano *et al.*, 2017).

Gli obiettivi di questo lavoro sono stati pertanto:

- determinare l'applicabilità della metodica ecocontrastografica nella valutazione della perfusione parietale del duodeno in una popolazione di cani affetti da IBD;
- descrivere i *pattern* di perfusione parietale del duodeno con mezzo di contrasto di seconda generazione in una popolazione di cani affetti da IBD;
- confrontare la metodica ecocontrastografica con quella clinica (*score* CCECAI), endoscopica e istologica.

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Questo studio è stato condotto in modo prospettico su una popolazione di cani affetti da IBD (Gruppo **A**) riferiti presso l'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna nel periodo compreso tra Novembre 2014 e Gennaio 2016.

I criteri d'inclusione per questo studio sono stati i seguenti:

- Presenza di sintomi gastroenterici cronici (perdita di peso, diarrea e/o vomito) per un periodo superiore alle 6 settimane;
- Esclusione di altre cause di sintomatologia gastroenterica (disordini di natura non gastroenterica, infestazioni parassitarie, insufficienza pancreatica esocrina, corpi estranei ed alterazioni anatomiche intestinali che necessitino di intervento chirurgico);
- Risposta inadeguata al trattamento medico antiparassitario, antibiotico e al cambio di dieta (vedi protocollo clinico-diagnostico);
- Miglioramento clinico con terapia anti-infiammatoria o immunosoppressiva (vedi protocollo clinico-diagnostico);

- Diagnosi istologica d'infiltrato infiammatorio intestinale eseguita su campioni biotici ottenuti mediante biopsia endoscopica del duodeno.

È stato inoltre selezionato un gruppo di controllo composto da soggetti sani (Gruppo **B**) definiti tali sulla base di:

- assenza di sintomatologia gastroenterica da almeno 3 mesi;
- visita clinica nei limiti della norma;
- profilo emato-biochimico nei limiti della norma;
- esame fecale negativo per parassitosi;
- esame ecografico dell'addome ed in particolare dell'apparato gastroenterico nei limiti della norma.

I proprietari sono stati informati sulle modalità di svolgimento dello studio ed è stato consegnato loro un modulo per il consenso informato.

Lo studio è stato approvato dal Comitato per il Benessere degli Animali dell'Università di Bologna.

Protocollo clinico-laboratoristico

Ogni paziente del gruppo A è stato sottoposto al seguente protocollo clinico-laboratoristico:

- visita clinica specialistica gastroenterologica con compilazione del *Canine Chronic Enteropathy Activity Index* (CCECAI). Inoltre i pazienti sono stati stratificati secondo la loro gravità in 5 gruppi: normale (CCECAI \leq 3), lieve ($4 \leq$ CCECAI \leq 5), moderato ($6 \leq$ CCECAI \leq 8), grave ($9 \leq$ CCECAI \leq 11) e molto grave (CCECAI \geq 12) (Allenspach *et al.*, 2007);
- profilo emato-biochimico;
- dosaggio sierico del TLI canino per l'esclusione di un'insufficienza pancreatica esocrina;

- dosaggio sierico dei folati e della cobalamina (B12) per la valutazione di malassorbimento;
- dosaggio sierico della proteina C-Reattiva (CRP) per la valutazione di uno stato reattivo flogistico sistemico;
- esame parassitologico fecale.

In caso di positività all'esame fecale il soggetto veniva sottoposto a trattamento antielmintico (Febendazolo 50 mg/kg *per os* SID per 3 giorni).

Per escludere la presenza di altre enteropatie croniche come l'enteropatia dieto-responsiva (*Food Responsive Enteropathy, FRD*) e quella antibiotico-responsiva (*Antibiotic-Responsive Enteropathy, ARE*) ogni soggetto veniva sottoposto ad una dieta monoproteica (selezionando una fonte proteica non assunta precedentemente dall'animale) per 3 settimane ed in caso di mancata risposta alla dieta veniva somministrata una terapia antibiotica (Tilosina 15 mg/kg BID per tre settimane).

Successivamente i soggetti sono stati sottoposti in sequenza ad esame ecografico dell'addome, ecocontrastografico del duodeno (vedi successivo protocollo ecografico bidimensionale e con mezzo di contrasto) ed endoscopico del tratto superiore dell'apparato digerente con esame biptico della parete duodenale.

Una volta ottenuta la conferma istologica di IBD al soggetto veniva fatta proseguire la terapia dietetica e antibiotica, associando un trattamento immunosoppressore con corticosteroidi: Prednisolone (1 mg/kg *per os* BID per 3 giorni, quindi 1 mg/kg SID per 1 mese e continuando la terapia in relazione alla risposta) oppure Azatioprina (2 mg/kg *per os* SID associata a Prednisolone a 0,5 mg/kg) oppure Ciclosporina (5 mg/kg *per os* BID per 9 settimane).

Protocollo ecografico bidimensionale

Tutti i soggetti sono stati sottoposti a un esame ecografico dell'addome dopo un digiuno di 12 ore utilizzando un ecografo¹ equipaggiato con una sonda microconvex multifrequenza (5-8 MHz) ed una lineare ad alta frequenza (3-9 MHz). Dopo tricotomia dell'addome, la cute è stata pulita con alcool denaturato al 70% ed è stato applicato del gel ecografico. I cani sono stati contenuti manualmente per evitare eventuali alterazioni della normale perfusione ematica tissutale legate alla sedazione farmacologica.

Per tutti i pazienti è stato valutato in maniera specifica l'apparato gastroenterico, ed in particolare:

- spessore parietale totale duodenale (considerato normale o aumentato, secondo i valori di riferimento presenti in bibliografia - Gladwing *et al.*, 2014; Penninck *and* d'Anjou, 2015-);
- stratigrafia parietale (considerata normale, alterata o destrutturata);
- attività peristaltica (normale, ridotta o aumentata);
- linfadenopatia regionale (assente o presente);
- ecogenicità del mesentere circostante le anse intestinali (normale o aumentata);
- versamento peritoneale (assente o presente).

Utilizzando lo *score* ecografico proposto da D'Angelo *et al.* nel 2017, a ciascuno di questi parametri è stato assegnato un punteggio (0= assente; 1=presente). Sulla base della somma totale, la patologia è stata considerata da un punto di vista ecografico come:

- assente: punteggio pari a 0;
- lieve: punteggio pari a 1/2;
- moderata: punteggio pari 3/4;
- grave: punteggio pari ≥ 5 .

¹ iU22, ultrasound system, Philips Healthcare, Monza, Italy

Concomitanti alterazioni a carico di altri organi addominali sono state inoltre annotate.

Protocollo ecocontrastografico

Su tutti i soggetti dei due gruppi (A e B) è stato successivamente eseguito un esame ecocontrastografico della parete duodenale discendente. La scelta di eseguire l'esame CEUS a questo livello è stata dettata essenzialmente da due motivi: il duodeno è la sede della biopsia endoscopica e, avendo una topografia ben definita, rappresenta un riferimento standardizzabile in tutti i soggetti.

Per eseguire l'esame CEUS l'animale è stato posto in decubito laterale sinistro in modo da poter ottenere una finestra acustica il più ottimale possibile per il duodeno. Quest'ultimo è stato visualizzato in scansione trasversa in corrispondenza di un tratto in cui l'ansa si presentava priva di contenuto.

È stato utilizzato un mezzo di contrasto di seconda generazione² somministrato manualmente attraverso un catetere venoso a livello di vena cefalica alla dose di 0,05 ml/Kg. L'inoculazione è stata eseguita in bolo rapido seguita immediatamente da un bolo di 5 ml di soluzione fisiologica.

Lo studio ecocontrastografico è stato eseguito con una sonda lineare ad alta frequenza (L3-9MHz) dopo l'attivazione del *software* contrasto-specifico (*Pulse Inversion Harmonic and Power Modulation Combined* – PMPI). Per la visualizzazione delle immagini è stata scelta la modalità *dual* che permette di visualizzare affiancate sia l'immagine bidimensionale dell'ansa sia quella ecocontrastografica (**Figura 1**).

Per il protocollo di acquisizione sono stati impostati e mantenuti costanti i seguenti parametri:

Finestra immagine bidimensionale

- Guadagno 86%;
- Indice meccanico 0,06;
- Compressione 36.

² Sonovue®, Bracco diagnostic, Milano Italy

Finestra immagine ecocontrastografica

- Guadagno 80% in modo da ottenere una parete intestinale anecogena prima dell'arrivo del mezzo di contrasto;
- Indice meccanico 0,07;
- Compressione 32.

Il *range* focale è stato posizionato all'altezza dell'ansa.

Per ciascun soggetto è stato registrato un filmato di 60 secondi esportato successivamente in formato DICOM in un archivio esterno di gestione delle immagini per le analisi *off line*.

Su ciascun filmato sono state eseguite delle valutazioni qualitative e quantitative. In particolare per la valutazione qualitativa è stata analizzata soggettivamente la modalità di distribuzione del mezzo di contrasto (omogenea o disomogenea) in particolare in corrispondenza del picco di intensità confrontandola con quanto riportato in bibliografia nel duodeno di cani sani (Jimenez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda l'analisi quantitativa è stato utilizzato un *software* commerciale³. In particolare è stata disegnata manualmente una regione d'interesse (ROI) nello spessore parietale duodenale, a livello dello strato sottomucoso e mucoso. In alcuni *frames* la ROI è stata aggiustata manualmente a causa del movimento respiratorio. Con i dati così ottenuti sono state generate le curve intensità-tempo (**Figura 2**).

Le variabili di perfusione analizzate sono state le seguenti:

- tempo di arrivo (*Arrival Time*, AT) definito come il momento in cui il mezzo di contrasto aumenta rispetto la linea basale nel grafico intensità-tempo;
- tempo al picco di *enhancement* dal momento dell'iniezione (*Time To Peak from injection*, TTPinj);

³ QLAB®, Versione 9.1, Advanced Quantification Software, Philips Healthcare

- tempo al picco da quando il mezzo di contrasto inizia ad incrementare (*TTP from initial rise*, TTPinr);
- intensità del picco (*Peak Intensity*, PI);
- tempo medio di transito (*Mean Transit Time*, MTT) definito come il tempo dall'innalzamento iniziale fino a una diminuzione del 50% dell'intensità del picco;
- area sottesa alla curva (*Area Under the Curve*, AUC);
- wash-in (*Wash-in rate*, Wi) definita come pendenza della curva durante la fase di riempimento.

Protocollo endoscopico

L'esame endoscopico è stato effettuato con paziente in anestesia totale, con videoscopio flessibile. La procedura endoscopica comprendeva la gastroscopia e la duodenoscopia e, sulla base dei riscontri clinici, solo in alcuni casi si è proceduto anche ad ileo e colonscopia.

I parametri morfologici valutati a livello della mucosa durante la duodenoscopia sono stati la friabilità, la granularità, l'erosione e la linfangectasia secondo gli schemi classificativi proposti da Slovak *et al.*, nel 2015.

In particolare per ciascuno di questi parametri sono stati assegnati dei valori (Slovak *et al.*, 2015):

- Friabilità: assente = 0;
 leggero sanguinamento al tocco = 1;
 marcato sanguinamento al tocco = 2.
- Granularità: tessitura della mucosa normale = 0;
 tessitura della mucosa aumentata = 1;
 tessitura gravemente aumentata = 2.
- Erosioni: assenti = 0;
 poche erosioni = 1;
 erosioni diffuse = 2;
- Linfangectasia: assenti = 0;

formazioni bianche focali/multifocali = 1;

formazioni bianche diffuse = 2

Dalla somma dei valori ottenuti è stato ricavato uno **score endoscopico** della gravità della patologia infiammatoria intestinale.

Protocollo istologico

I campioni di mucosa duodenale, da tre a otto per soggetto, destinati alle indagini istologiche sono stati prelevati utilizzando apposite pinze biottiche nella porzione del duodeno discendente. Dopo il campionamento, le biopsie sono state appoggiate ed orientate su appositi supporti cartacei grigliati⁴, in modo che la parte più profonda del tessuto risultasse a contatto con la cartina e la parte luminale fosse indirizzata verso l'alto, consentendo così un corretto orientamento della biopsia. I campioni sono stati poi fissati in formalina tamponata al 10% per 24-48 ore, inclusi in paraffina, sezionati a 5 µm e colorati con ematossilina-eosina (EE).

La valutazione istologica di tali campioni è avvenuta secondo gli schemi proposti dal *World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group* (WSAVA). Le lesioni valutate istologicamente erano quindi: accorciamento dei villi, danno epiteliale, distensione delle cripte, dilatazione del chilifero, fibrosi della mucosa, linfociti intraepiteliali, linfociti e plasmacellule nella lamina propria, eosinofili nella lamina propria, neutrofilo nella lamina propria. La gravità di ogni lesione è stata registrata in una scala a 4 punti, dove 0 corrispondeva ad assenza di lesione; 1 a lesione lieve; 2 a lesione moderata e 3 a gravi alterazioni (Day *et al.*, 2008).

Ai fini comparativi, i valori attribuiti ai nove parametri precedentemente descritti sono stati sommati in un indice numerico unico indicativo della gravità dell'IBD, ottenendo così uno **score istologico** (variabile da 0 a 27). I valori dei parametri considerati sono stati inoltre sommati in due indici separati in cui è stata riportata la somma dei parametri morfologici

⁴ Endofilters®, Bio-Optica

(accorciamento dei villi, danno epiteliale, distensione delle cripte, dilatazione del chilifero, fibrosi della mucosa) (variabile da 0 a 15) e la somma dei parametri infiammatori (linfociti intraepiteliali, linfociti e plasmacellule nella lamina propria, eosinofili nella lamina propria, neutrofili nella lamina propria) (variabile da 0 a 12).

Analisi statistica

Tutte le variabili discrete sono state studiate per la loro distribuzione utilizzando un test *D'Agostino-Pearson*. I dati distribuiti normalmente sono stati espressi come media \pm deviazione standard (DS), mentre quelli che mostravano una distribuzione non normale sono stati espressi come mediana e *range* (minimo – massimo).

Il confronto tra gruppi delle variabili categoriche è stato eseguito tramite un test esatto di *Fisher*, mentre per quanto riguarda le variabili continue, l'analisi è stata condotta con un test *T di Student* per dati non appaiati o con un test di *Mann-Whitney* a seconda del tipo di distribuzione dei dati.

La capacità di ciascun indice ecografico e CEUS di discriminare tra cani sani e cani affetti da IBD è stata valutata attraverso l'analisi di curve ROC (Receiver Operating Characteristic). In particolare, la sensibilità (Se) e specificità (Sp) sono state calcolate a vari punti di *cut-off* al fine di ottenere il valore di *cut-off* con il migliore equilibrio tra Se e Sp. Il valore di AUC come criterio di accuratezza degli indici osservati è stato considerato come segue: basso, da 0,5 a 0,7; moderato, da 0,7 a 0,9; alto $> 0,9$ (Gardner *and* Greiner, 2006).

Tutte le analisi sono state effettuate con un *software* dedicato^{5,6}. Sono stati considerati significativi valori di $P < 0.05$.

⁵ Microsoft Excell, Microsoft Office Professional Plus 2013, Microsoft Corporation, Bellevue, WA

⁶ Prism 5®, GraphPad Software Inc., San Diego, CA

RISULTATI

Popolazione di studio

Sulla base dei criteri d'inclusione precedentemente descritti sono stati arruolati 42 cani nel gruppo A e 20 soggetti nel gruppo B. I dati segnaletici completi dei soggetti appartenenti ai due gruppi sono riportati nella **Tabella 1**.

I soggetti appartenenti al gruppo A al momento della diagnosi presentavano CCECAI con una media pari a $6,74 \pm 3,02$ (**Tabella 2**).

Relativamente ai folati, alla cobalamina (B12) e alla proteina C reattiva (CRP), i livelli sierici di queste molecole mostravano una mediana rispettivamente di 10,3 µg/l con valore minimo di 1,72 µg/l e massimo di 24 µg/l (valore di riferimento 6,50-11,50 µg/l), 314 ng/l con valore minimo di 69 ng/l e massimo di 1500 ng/l (*range* di riferimento 250-730 ng/l) e CRP 0,1 mg/dl con valore minimo di 0,01 mg/dl e massimo di 6,29 mg/dl (*range* di riferimento 0 - 0,5 mg/dl). Tali valori non erano disponibili in 5 soggetti per quanto riguarda i folati e la cobalamina e in 9 pazienti per la CPR (**Tabella 3**).

Ecografia bidimensionale

L'esame ecografico bidimensionale eseguito al momento della prima visita nei soggetti appartenenti al gruppo A ha evidenziato le seguenti alterazioni (**Figure 3 e 4**):

- Spessore di parete: in 21 soggetti (50%) il duodeno presentava un aumento dello spessore di parete rispetto ai valori riportati in letteratura. In particolare il valore medio dello spessore di parete del duodeno era pari a $4,3 \text{ mm} \pm 1,13$.
- Stratigrafia: è risultata essere normale in 11 soggetti ed alterata nei restanti 31 (73,81%). In particolare sono stati evidenziati *spot* iperecogeni in 9/31 soggetti (29%) e striature iperecogene in 7/31

soggetti (22,58%) nello strato mucoso, prominenza dello strato sottomucoso in 3/31 soggetti (9,67%) ed iperecogenicità diffusa di tutto lo strato mucoso in 21/31 cani (67,74%).

- Motilità: è risultata alterata in 8 soggetti (19%); in particolare in 5 si presentava diminuita, mentre in 3 era aumentata.
- Ecogenicità peri-intestinale: presente in 13 soggetti (30,95%).
- Linfoadenomegalia regionale: presente in 16 soggetti (38,10%).
- Versamento addominale: presente in 12 soggetti (28,57%); in 1 soggetto il versamento era grave, in 6 era modico mentre nei restanti 5 era di grado lieve.

Lo **score ecografico** ottenuto dalla somma dei parametri sopra elencati ha classificato 23 cani in un grado di malattia lieve, 13 soggetti in uno moderato, 5 pazienti in uno grave e solo in 1 caso non erano presenti alterazioni ecografiche (**Tabella 3**).

Ecocontrastografia duodenale

La modalità di distribuzione del mezzo di contrasto nella parete duodenale è risultata pressoché uguale in tutti i soggetti di entrambi i gruppi (Gruppo A= IBD; Gruppo B= soggetti sani). In particolare era caratterizzata dalle seguenti fasi contrastografiche (**Figura 5**):

- fase iniziale in cui il mezzo di contrasto raggiunge l'ansa duodenale attraverso i vasi arteriosi digiunali;
- fase di distribuzione intraparietale in cui il mezzo di contrasto si diffonde in maniera radiale simultaneamente in tutta la parete, in assenza di una visualizzazione stratigrafica;
- raggiungimento del picco di intensità dove tutta la parete appare perfusa in maniera omogenea;
- lento dilavamento del mezzo di contrasto dalla parete intestinale.

L'analisi quantitativa della perfusione del mezzo di contrasto nella parete duodenale è stata eseguita in 36 dei 42 soggetti portatori di IBD poiché i movimenti legati all'attività respiratoria e quelli peristaltici intestinali non hanno reso possibile un adeguato posizionamento della ROI in 6 soggetti (**Figura 6**). La quantificazione del gruppo dei soggetti sani è stata eseguita in 10 cani. I risultati relativi alle variabili di perfusione si presentano più alti nei pazienti del gruppo A (**Tabella 4**).

Dall'analisi statistica dei parametri perfusivi CEUS (AT, TTPinj, TTPinr, PI, MTT, AUC e Wi) tra il gruppo A e quello B sono emerse differenze statisticamente significative per le variabili PI e MTT che risultavano più elevate nei pazienti con IBD (**Tabella 4**).

Ai fini comparativi statistici, i cinque gruppi suddivisi sulla base del CCECAI (normale, lieve, moderato, grave e molto grave) sono stati portati a 4 e nello specifico sono stati raggruppati in un solo gruppo (grave) tutti i soggetti classificati in quello grave e molto grave. Confrontando le variabili perfusive CEUS tra i soggetti del gruppo B e quelli appartenenti ai 4 gruppi precedentemente elencati dei soggetti malati sono emerse differenze statisticamente significative per i parametri TTPinj, PI, MTT e AUC tra il gruppo dei soggetti sani e quelli con patologia di grado grave (P rispettivamente pari a 0,0471, 0,0030, 0,0021 e 0,0133); per i parametri PI, MTT e AUC tra il gruppo dei soggetti sani e quelli con patologia di grado lieve (P rispettivamente pari a 0,0089, 0,0191 e 0,0147) (**Tabella 5**).

Score endoscopico e istologico

Lo **score endoscopico** dei pazienti del gruppo A, totalizzato secondo il punteggio di Slovak, è stato pari a 0 in 2 casi (4,8%), 1 in 9 cani (21,4%), 2 in 11 soggetti (26,2%), 3 in 5 pazienti (11,9%), 4 in 9 casi (21,4%), 5 in 4 cani (9,5%) e 6 in 2 pazienti (4,8%).

Le valutazioni istologiche sono state effettuate su 33 soggetti del gruppo A poiché in 9 pazienti i campioni biotici non erano adeguati.

All'esame istologico, tutti i campioni bioptici della parete duodenale analizzati presentavano alterazioni indicative di uno stato flogistico di diversa gravità con uno **score istologico** variabile da 6 a 20. In particolare i criteri strutturali variano da un punteggio di 4 a uno di 13 e quelli infiammatori da 1 a 7.

In **tabella 6** sono riportati i valori medi e le DS dei punteggi endoscopici ed istologici dei pazienti appartenenti al gruppo A.

L'accuratezza diagnostica è stata valutata solo sui parametri CEUS che sono risultati statisticamente diversi tra i pazienti sani e malati (PI e MTT) e tra i sani e i malati gravi (TTPinj, PI, MTT e AUC). Tale accuratezza è risultata moderata per tutti i valori. I valori di Se, Sp e le relative AUC sono state riportate in **Tabella 7 e 8** e nella **Figura 7**. Il parametro con il miglior equilibrio tra Se e Sp nel distinguere un paziente sano da uno con malattia di grado grave è risultato il MTT con un valore di 9,37 secondi (Se del 100% e una Sp del 80%).

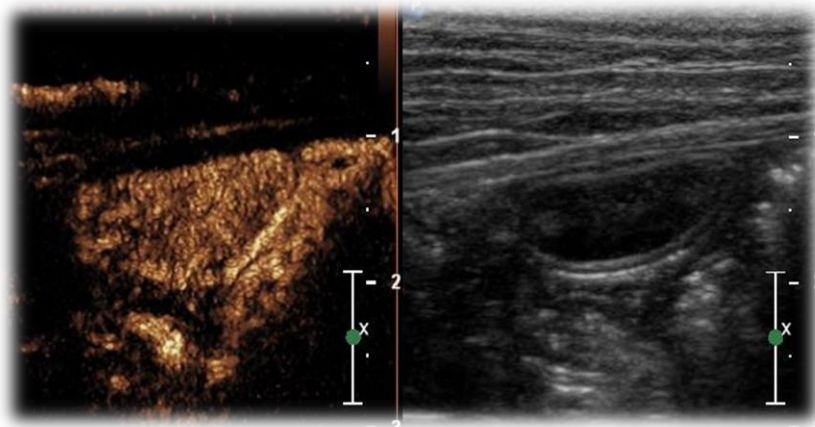


Figura 1: Scansione ecografica in modalità *dual* che permette di visualizzare affiancate sia l'immagine bidimensionale (a destra) che quella ecocontrastografica (a sinistra) del duodeno (Archivio Ecografico Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

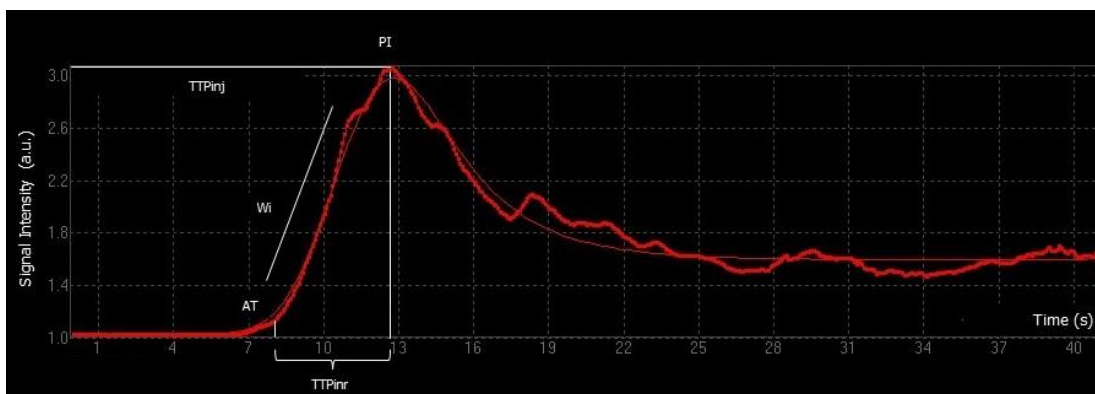


Figura 2: Esempio di curva intensità-tempo del duodeno di un cane appartenente al gruppo A (asse x: tempo in secondi [s]; asse y: intensità segnale in *arbitrary units* [a.u.]). Si nota l'incremento di segnale fino al picco di intensità. AT: arrival time; TTPinj: time to peak from injection; PI: peak intensity; TTPinr: time to peak from initial rise; Wi: wash-in. (Archivio Ecografico Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

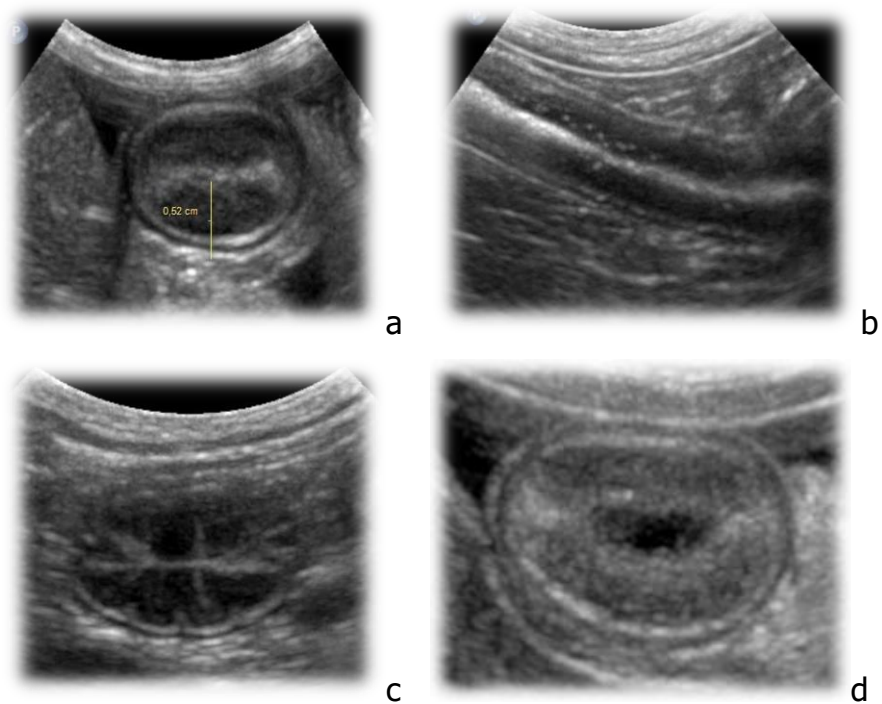


Figura 3: Immagini ecografiche bidimensionali del duodeno in cani affetti da IBD. **a:** scansione trasversale del duodeno discendente con ispessimento parietale. **b:** duodeno in scansione longitudinale con *spot* iperecogeni intramucosali. **c:** duodeno in scansione trasversale con striature iperecogene radiali intramucosali. **d:** duodeno in scansione trasversa con iperecogenicità diffusa dello strato mucoso. (Archivio Ecografico Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

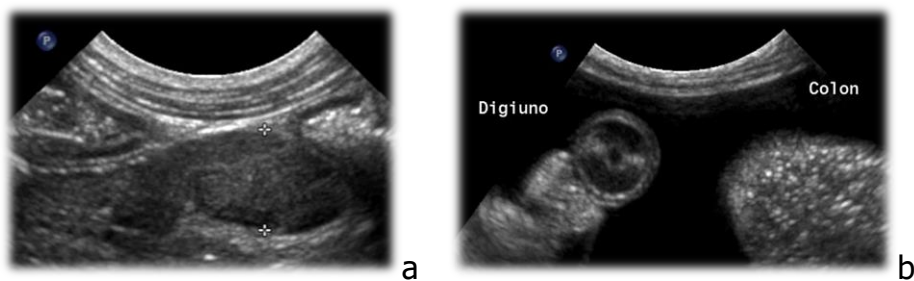


Figura 4: Immagini ecografiche bidimensionali in cani affetti da IBD. **a:** linfadenomegalia del linfocentro digiunale. **b:** versamento addominale anecogeno di grado grave. (Archivio Ecografico Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

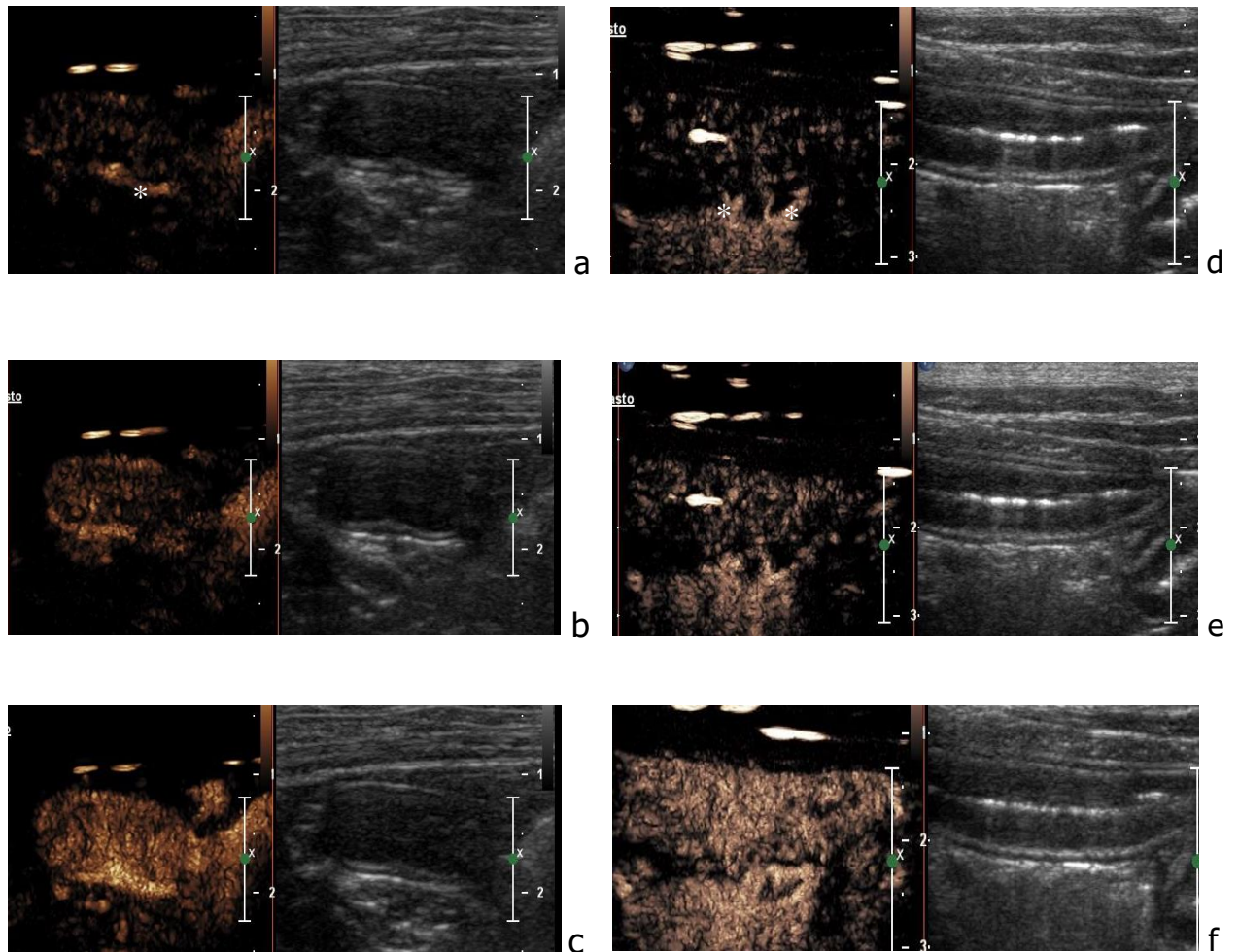


Figura 5: Fasi ecocontrastografiche in un soggetto normale a sinistra (**a,b,c**) e in un soggetto con IBD a destra (**d,e,f**). Arterie digiunali (*) con mezzo di contrasto (**a, d**); distribuzione radiale intraparietale del mezzo di contrasto (**b, e**); parete uniformemente perfusa dal mezzo di contrasto al picco di intensità (**c, f**). (Archivio Ecografico Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

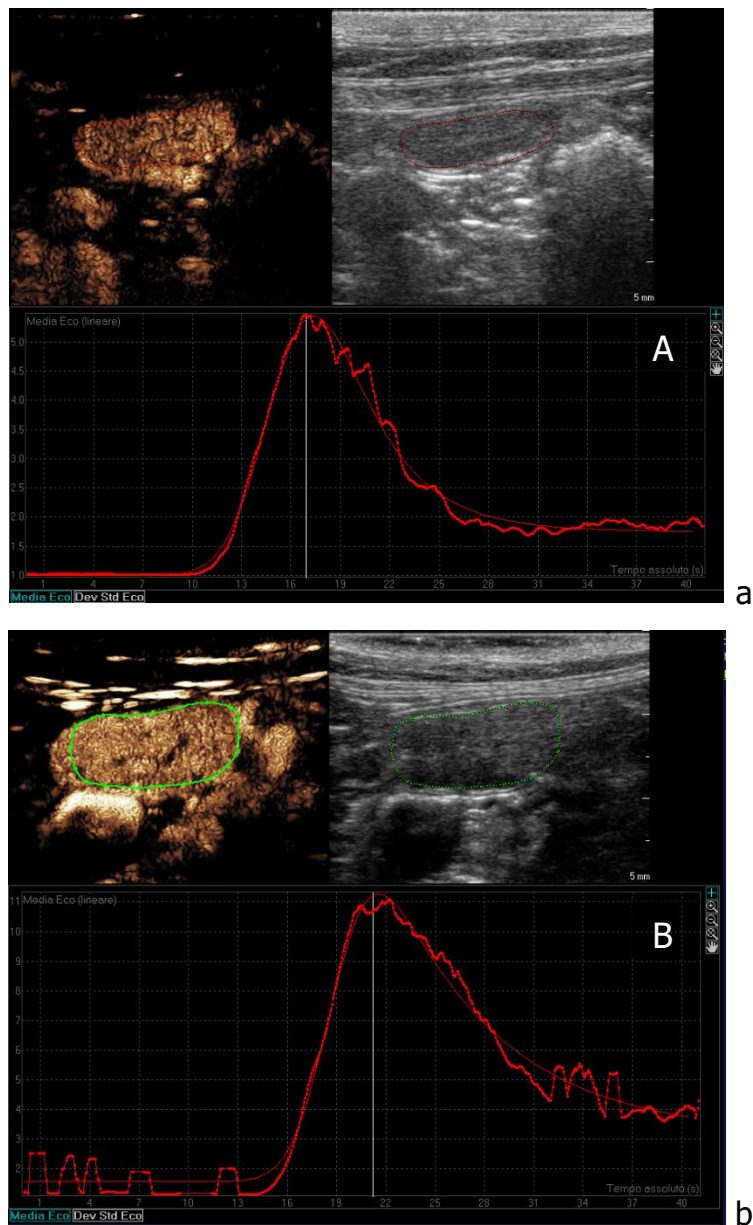


Figura 6: Quantificazione della perfusione con mezzo di contrasto del duodeno in un soggetto sano (**a**) e in uno portatore di IBD (**b**). L'area selezionata (in rosso nel cane sano e in verde in quello con IBD) nell'immagine con mezzo di contrasto rappresenta la regione di interesse (ROI). In basso le rispettive curve intensità/tempo (**A** e **B**). (Archivio Ecografico Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

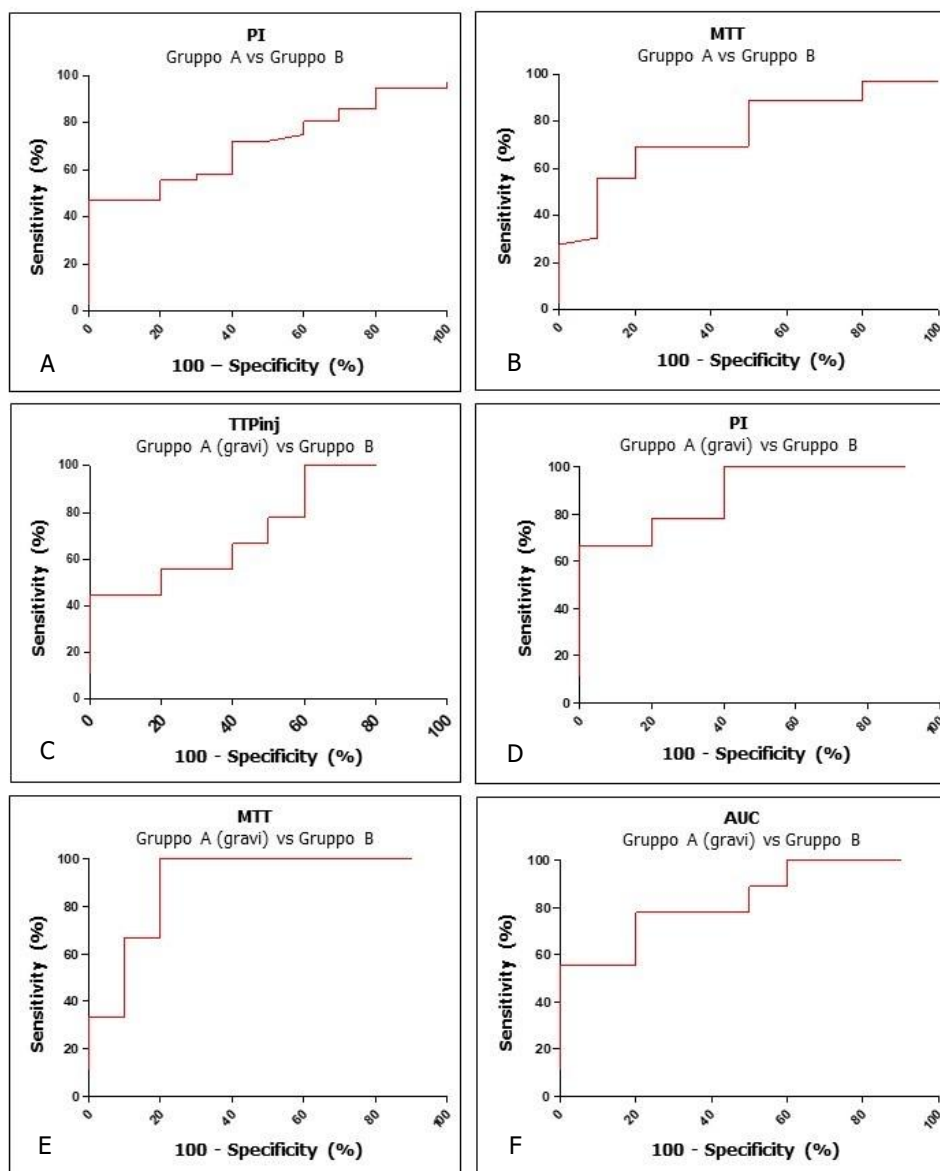


Figura 7: Curve ROC rappresentanti i valori di Se e Sp nella diagnosi di IBD mediante i parametri di perfusione CEUS. Di ciascun valore *cut-off* è riportata la Se (Sensitivity) sull'asse delle ordinate e la Sp (Specificity) sull'asse delle ascisse. **A:** L'AUC (area sottostante la curva) di questa curva ROC è pari a 0,71, ciò dimostra una moderata accuratezza diagnostica del parametro PI nel discriminare cani sani da cani con IBD; al *cut-off* di 3,85 la Se è pari a 72% e la Sp 60%. **B:** L'AUC di questa curva ROC è pari a 0,75, ciò dimostra una moderata accuratezza diagnostica del parametro MTT nel discriminare cani sani da cani con IBD; al *cut-off* di 9,37 la Se è pari a 69% e la Sp a 80%. **C:** L'AUC di questa curva ROC è pari a 0,74, ciò dimostra una moderata accuratezza diagnostica del parametro TTPinj nel discriminare cani sani da cani con IBD grave; al *cut-off* di 17,88 la Se è pari a 56% e la Sp a 80%. **D:** L'AUC di questa curva ROC è pari a 0,89, ciò dimostra una moderata accuratezza diagnostica del parametro PI nel discriminare cani sani da cani con IBD grave; al *cut-off* di 4,84 la Se è pari a 78% e la Sp a 80%. **E:** L'AUC di questa curva ROC è pari a 0,90, ciò dimostra una moderata accuratezza diagnostica del parametro MTT nel discriminare cani sani da cani con IBD grave; al *cut-off* di 9,37 la Se è pari a 100% e la Sp a 80%. **F:** L'AUC di questa curva ROC è pari a 0,83, ciò dimostra una moderata accuratezza diagnostica del parametro AUC nel discriminare cani sani da cani con IBD grave; al *cut-off* di 56,90 la Se è pari a 78 % e la Sp a 80%.

| SEGNALAMENTO CANI GRUPPO A | | | | |
|----------------------------|------------------------|-------|-------------|-------------|
| CASO | RAZZA | SESSO | ETA' (anni) | PESO (kg) |
| 1 | Meticcio | Mc | 11 | 17 |
| 2 | Meticcio | Fs | 2 | 6,5 |
| 3 | Maltese | M | 4 | 5,1 |
| 4 | Jack Russel | M | 3 | 7 |
| 5 | Cocker Spaniel | M | 7 | 11 |
| 6 | Pastore Tedesco | M | 2 | 27 |
| 7 | Meticcio | Fs | 14 | 19 |
| 8 | Meticcio | M | 8 | 13,3 |
| 9 | Bassotto | M | 7 | 9,3 |
| 10 | Meticcio | M | 2 | 17 |
| 11 | Pastore Tedesco | M | 8 | 33,8 |
| 12 | Meticcio | Mc | 8 | 25,8 |
| 13 | Pastore Tedesco | M | 5 | 24 |
| 14 | Maltese | M | 3 | 7 |
| 15 | Corso | M | 7 | 48,3 |
| 16 | Meticcio | M | 2 | 14,3 |
| 17 | Pastore Tedesco | M | 3 | 25,5 |
| 18 | Dalmata | Mc | 10 | 29,3 |
| 19 | Rottweiler | M | 6 | 34 |
| 20 | Labrador | M | 1 | 26 |
| 21 | Setter Irlandese | M | 2 | 24,2 |
| 22 | Pastore Tedesco | M | 2 | 22 |
| 23 | Pastore Tedesco | M | 3 | 38,3 |
| 24 | Border Collie | Fs | 6 | 23 |
| 25 | Pastore Tedesco | M | 6 | 23,6 |
| 26 | Rottweiler | M | 3 | 43,9 |
| 27 | Meticcio | Mc | 9 | 19,7 |
| 28 | Boxer | F | 0,7 | 18,8 |
| 29 | Meticcio | Fs | 10 | 25 |
| 30 | Pointer | M | 8 | 15,3 |
| 31 | Beagle | M | 10 | 18 |
| 32 | Boxer | M | 1 | 25,3 |
| 33 | Border Collie | M | 5 | 23,7 |
| 34 | Alano | M | 1 | 64,5 |
| 35 | American Staffordshire | M | 2 | 26,8 |
| 36 | Cavalier King | F | 0,7 | 7,7 |
| 37 | Siberian Husky | F | 5 | 15,9 |
| 38 | Pointer | Fs | 3 | 18 |
| 39 | Meticcio | M | 2 | 28 |
| 40 | Labrador | M | 3 | 28 |
| 41 | Boxer | M | 1 | 31,8 |
| 42 | Siberian Husky | M | 0,6 | 25,7 |
| Media | | | 4,69 | 23 |
| DS | | | 3,4 | 11,7 |

| SEGNALAMENTO CANI GRUPPO B | | | | |
|----------------------------|-----------------|-------|-------------|--------------|
| CASO | RAZZA | SESSO | ETA' (anni) | PESO (Kg) |
| 1 | Setter Inglese | Fs | 6 | 17,2 |
| 2 | Weimaraner | Fs | 7 | 25,3 |
| 3 | Rottweiler | F | 4 | 39 |
| 4 | Meticcio | Fs | 8 | 26,6 |
| 5 | Meticcio | Fs | 3 | 26,6 |
| 6 | Pastore Tedesco | M | 6 | 43 |
| 7 | Pastore Tedesco | M | 6 | 34 |
| 8 | Pastore Tedesco | Fs | 9 | 23 |
| 9 | Border Collie | F | 3 | 18,8 |
| 10 | Border Collie | Fs | 5 | 19,7 |
| 11 | Weimaraner | Fs | 6 | 31,8 |
| 12 | Labrador | Fs | 7 | 26 |
| 13 | Meticcio | F | 5 | 27 |
| 14 | Labrador | M | 2 | 29,2 |
| 15 | Border Collie | Mc | 3 | 20,2 |
| 16 | Meticcio | M | 11 | 8 |
| 17 | Dogo Argentino | M | 4 | 29 |
| 18 | Pastore Tedesco | Fs | 5 | 28 |
| 19 | Dogo Argentino | F | 4 | 23 |
| 20 | Meticcio | Fs | 7 | 17,8 |
| Media | | | 5,55 | 25,66 |
| DS | | | 2,24 | 7,92 |

Tabella 1: Segnalamento soggetti portatori di IBD (gruppo A) a sinistra e cani sani (gruppo B) a destra. M: maschio; Mc: maschio castrato; F: femmina; Fs: femmina sterilizzata, DS: deviazione standard.

| CCECAI - GRUPPO A | | |
|--------------------------|------------------------|-------------------|
| GRADO DI MALATTIA | NUMERO PAZIENTI | MEDIA ± DS |
| Normale | 7 | |
| Lieve | 10 | |
| Moderato | 14 | |
| Grave | 8 | |
| Molto Grave | 3 | |
| Totale | 42 | 6,74 ± 3,02 |

Tabella 2: Distribuzione della popolazione in funzione del punteggio CCECAI. DS: deviazione standard.

| FOLATI, COBALAMINA, CRP e US - GRUPPO A | | |
|--|------------------------|-------------------|
| PARAMETRI | NUMERO PAZIENTI | |
| Folati (µg/l) | 37 | 10,3 (1,72 – 24) |
| Cobalamina (ng/l) | 37 | 314 (69 - 1500) |
| CRP (mg/dl) | 33 | 0,1 (0,01 - 6,29) |
| Score US | 42 | 2,45 ± 1,53 |

Tabella 3: Mediana (minimo – massimo) e media ± deviazione standard (DS) dei valori sierici di Folati, Cobalamina e CRP e dello *score* ecografico (US 2D) di pazienti del gruppo A.

| PARAMETRI DI PERFUSIONE CEUS | | | |
|-------------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------|
| VARIABILI | Gruppo A (n = 36) | Gruppo B (n = 10) | P |
| AT (s) | 10,28 (3,97-25,85) | 10,52 (6,93-14,04) | 0,540 |
| TTPinj (s) | 16,70 ± 5,49 | 15,30 ± 3,19 | 0,514 |
| TTPinr (s) | 5,49 ± 1,54 | 5,18 ± 0,98 | 0,681 |
| PI (a.u.) | 4,96 (0,63-18,02) | 3,80 (1,31-5,05) | 0,046 |
| MTT (s) | 10,64 (4,50-24,79) | 8,47 (5,54-11,56) | 0,015 |
| AUC (a.u.s) | 62,45 (5,30-260,50) | 51,11 (12,59-69,34) | 0,072 |
| Wi (a.u./s) | 0,85 (0,14-3,65) | 0,74 (0,21-0,95) | 0,197 |

Tabella 4: Parametri di perfusione CEUS del Gruppo A e B. I dati distribuiti normalmente e non normalmente sono espressi rispettivamente come media (± deviazione standard - DS) e mediana (minimo – massimo). s= secondi; a.u.= unità arbitraria. **P<0,05**.

| VARIABILI PERFUSIOVE CEUS – SOTTOCLASSI DI GRAVITA' GRUPPO A | | | | |
|---|--|-------------------------------------|--|------------------------------------|
| VARIABILI | GRAVE (n = 9) | MODERATO (n = 11) | LIEVE (n = 10) | NORMALE (n = 6) |
| AT (s) | 11,24 (9,00 - 16,35) [P=0,121] | 10,99 (3,97 - 17,52) [P=0,751] | 9,07 (5,19 - 25,85) [P=0,971] | 8,54 (4,60 - 18,36) [P=0,875] |
| TTPinj (s) | 18,55 ± 3,42 [P=0,047] | 16,67 ± 5,89 [P=0,520] | 16,55 ± 6,17 [P=0,574] | 14,22 ± 6,41 [P=0,656] |
| TTPinr (s) | 5,97 ± 1,08 [P=0,114] | 5,95 ± 1,84 [P=0,252] | 5,35 ± 1,35 [P=0,749] | 4,14 ± 1,29 [P=0,091] |
| PI (a.u.) | 5,47 (3,89 - 14,49) [P=0,003] | 3,77 (1,26 - 18,02) [P=0,699] | 5,28 (2,91 - 11,96) [P=0,009] | 4,11 (0,63 - 11,84) [P=1,000] |
| MTT (s) | 10,88 (9,42 - 20,11) [P=0,002] | 10,73 (5,79 - 24,79) [P=0,149] | 11,03 (7,92 - 19,66) [P=0,019] | 8,98 (4,50 - 17,54) [P=0,793] |
| AUC (a.u.s) | 70,12 (49,80 - 193,00) [P=0,013] | 45,64 (17,38 - 260,50) [P=0,860] | 75,45 (34,74 - 182,00) [P=0,015] | 54,46 (5,30 - 153,90) [P=0,793] |
| Wi (a.u./s) | 0,93 (0,43 - 2,79) [P=0,182] | 0,61 (0,15 - 3,28) [P=0,860] | 0,88 (0,43 - 3,65) [P=0,063] | 0,89 (0,14 - 2,87) [P=0,713] |

Tabella 5: Confronto statistico tra le variabili perfusive CEUS tra le diverse classi di gravità della patologia secondo lo score clinico CCECAI. I dati distribuiti normalmente e non normalmente sono espressi rispettivamente in media (\pm DS) e mediana (minimo – massimo). n: numero dei soggetti, s: secondi, a.u.: unità arbitraria. **P<0,05**

| ENDOSCOPIA ED ISTOLOGIA - GRUPPO A | | |
|---|------------------------|----------------------------------|
| SCORE | NUMERO PAZIENTI | MEDIA \pm DS |
| Endoscopico | 42 | 2,71 \pm 1,60 |
| Istologico | 33 | 11,33 \pm 2,95 |

Tabella 6: Score endoscopico secondo Slovak e istologico secondo Day dei pazienti del Gruppo A. I rispettivi valori sono rappresentati in media \pm deviazione standard (DS).

| ACCURATEZZA DIAGNOSTICA PARAMETRI CEUS PER DISTINGUERE CANI SANI DA CANI CON IBD | | | | | |
|---|----------------|-------------|------------------|-----------------|-----------------|
| VARIABILE | AUC ± SE | 95% CI | Cut-off | Sensibilità (%) | Specificità (%) |
| PI (a.u.) | 0,71 ± 0,079 | 0.56 - 0.86 | > 0.945 | 97,22 | 0,0 |
| | | | > 3.85 | 72,22 | 60,00 |
| | | | > 5.15 | 47,22 | 100,0 |
| MTT (s) | 0,75 ± 0,08045 | 0.60 - 0.91 | > 5.625 | 97,22 | 10,00 |
| | | | > 9.37 | 69,44 | 80,00 |
| | | | > 11.60 | 27,78 | 100,0 |

Tabella 7: Accuratezza diagnostica dei parametri perfusivi CEUS statisticamente differenti tra i pazienti sani e quelli malati valutata attraverso l'analisi delle curve ROC. Sono riportati i valori di area sottesa la curva (AUC), lo standard error (SE), la Sensibilità (Se), la Specificità (Sp), l'intervallo di confidenza (95% CI) e il valore di *cut-off*.

| ACCURATEZZA DIAGNOSTICA PARAMETRI CEUS PER DISTINGUERE CANI SANI DA CANI CON IBD DI GRADO GRAVE | | | | | |
|--|--------------|--------------|-------------------|-----------------|-----------------|
| VARIABILE | AUC ± SE | 95% CI | Cut-off | Sensibilità (%) | Specificità (%) |
| PI (a.u.) | 0,89 ± 0,08 | 0.74 - 1.04 | > 3.85 | 100,0 | 60,00 |
| | | | > 4.84 | 77,78 | 80,00 |
| | | | > 5.22 | 66,67 | 100,0 |
| MTT (s) | 0,90 ± 0,076 | 0.75 - 1.05 | > 9.37 | 100,0 | 80,00 |
| | | | > 11.60 | 33,33 | 100,0 |
| TTPinj (s) | 0,74 ± 0,12 | 0.52 - 0.97 | > 13.52 | 100,0 | 40,00 |
| | | | > 17.88 | 55,56 | 80,00 |
| | | | > 20.55 | 44,44 | 100,0 |
| AUC (a.u.s) | 0,83 ± 0,09 | 0.65 to 1.02 | > 48.29 | 100,0 | 40,00 |
| | | | > 56.90 | 77,78 | 80,00 |
| | | | > 69.73 | 55,56 | 100,0 |

Tabella 8: Accuratezza diagnostica dei parametri perfusivi CEUS statisticamente differenti tra i pazienti sani e quelli con malattia di grado grave valutata attraverso l'analisi delle curve ROC. Sono riportati i valori di area sottesa la curva (AUC), lo standard error (SE), la Sensibilità (Se), la Specificità (Sp), l'intervallo di confidenza (95% CI) e il valore di *cut-off*.

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

L'*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) è un'enteropatia cronica che può potenzialmente manifestarsi in qualsiasi razza canina, anche se in bibliografia è riportata una predisposizione solo per alcune quali il *Weimaraner*, il *Rottweiler*, il Pastore Tedesco, il *Boxer*, il *Border Collie* e lo *Yorkshire Terrier* (Allenspach *et al.*, 2007; Kathrani *et al.*, 2011; Simpson and Jergens, 2011). Nel nostro studio solo 12 dei cani apparteneva a tali razze (7 Pastori Tedeschi, 3 *Boxer* e 2 *Rottweiler*) mentre un nutrito gruppo di cani (10 soggetti) erano meticci. In letteratura non sono riportate predisposizioni di sesso (Cerquetella *et al.*, 2010) anche se nel nostro studio i cani di sesso maschile (34/42) prevalevano su quelli di sesso femminile (8/42). Per quanto riguarda l'età più frequente in cui tale patologia si manifesta, la popolazione inclusa nel nostro studio conferma quanto riportato in bibliografia; l'IBD è più comunemente diffusa nei cani di età intermedia, mentre è più rara nei soggetti di età inferiore ai 12 mesi (Hall, 2013).

Analogamente a quanto riportato in bibliografia veterinaria (Allenspach *et al.*, 2007), anche nel nostro studio abbiamo utilizzato il CCECAI come *score* clinico per stratificare il gruppo dei soggetti malati in diverse categorie sulla base del grado di malattia ottenendo una distribuzione piuttosto omogenea dei pazienti nei sottogruppi. Diversi studi hanno dimostrato come questo *score* assuma anche un valore prognostico poiché a un punteggio più alto corrisponde un minor tempo di sopravvivenza del soggetto stesso (Allenspach *et al.*, 2007; Dandrieux, 2016). Questo tipo di valutazione tuttavia non è stata eseguita nel nostro studio poiché non rientrava tra gli obiettivi che c'eravamo prefissi.

La riduzione sierica della cobalamina e dei folati in pazienti con enteropatia cronica è considerata un fattore prognostico negativo (Dandrieux *et al.*, 2013). Nel nostro studio, ai pazienti classificati secondo il CCECAI come portatori di patologia di grado grave non sempre corrispondevano una diminuzione dei valori sierici di tali molecole; tuttavia questo andamento non è stato valutato sulla base di *follow up* seriali poiché non rientrava tra gli obiettivi del nostro studio. Per quanto riguarda la CRP, nei nostri pazienti è emerso che un maggiore rialzo del suo valore

sierico corrispondeva a un grado più grave di patologia sempre secondo lo *score* clinico. Questo risultato è in analogia con quanto riportato in letteratura, dove è stata dimostrata sia una correlazione tra CRP e punteggio ottenuto dal *Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index* (CIBDAI) che un'utilità di questa molecola nel monitoraggio terapeutico (Jergens *et al.*, 2003).

Per quanto concerne l'esame ecografico dell'addome, questa metodica trova ampio impiego nella valutazione delle patologie del tratto gastroenterico grazie alla sua scarsa invasività e rapidità di esecuzione (Penninck *and* d'Anjou, 2015). I parametri ecografici bidimensionali che si sono maggiormente modificati nei cani del gruppo A del nostro studio sono stati lo spessore parietale, aumentato nel 50% dei soggetti, e la stratigrafia di parete, alterata in più del 70% dei pazienti. Questi risultati, in linea con quanto già riportato in bibliografia veterinaria (Gaschen *et al.*, 2008; Gaschen, 2011), confermano che in corso di IBD la parete gastrointestinale non necessariamente viene compromessa in termini di spessore e stratigrafia. Un aumento dello spessore parietale inoltre, è un segno ecografico comune sia a processi infiammatori che neoplastici, anche se in quest'ultimi l'ispessimento solitamente è focale e la stratigrafia viene destrutturata (Gaschen, 2011). Alterazioni stratigrafiche quali ad esempio *spot* iperecogeni, striature iperecogene e iperecogenicità diffusa dello strato mucoso hanno una scarsa relazione con la severità della patologia (Gaschen *et al.*, 2008; Gaschen *et al.*, 2016; Le Roux *et al.*, 2016) sottolineando la necessità di trovare metodiche che possano essere integrate con l'ecografia bidimensionale nella diagnosi di IBD. Anche altri parametri ecografici bidimensionali quali ad esempio la motilità intestinale, l'ecogenicità del mesentere, la presenza di linfadenopatia regionale e il versamento addominale, sono estremamente aspecifici e pertanto non possono essere considerati in termini prognostici (Gaschen *et al.* 2008).

In merito alla metodica ecocontrastografica della parete duodenale, i rilievi qualitativi osservati nei soggetti del nostro gruppo di controllo, sono stati confrontati con quelli presenti in tre lavori recentemente pubblicati sul cane sano (Jimenez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017). La modalità di distribuzione del mezzo di contrasto nella parete duodenale dei nostri

casi si è dimostrata pressoché analoga a quella riportata in bibliografia. In particolare, dopo un'iniziale visualizzazione delle arterie digiunali si osservava una progressiva presa di contrasto radiale e simultanea di tutta la parete intestinale per arrivare ad un picco di intensità omogeneo e quindi ad un graduale dilavamento del mezzo di contrasto. Tale modalità appare quindi diversa da quanto riportato nel duodeno del gatto sano dove il mezzo di contrasto si distribuisce a strati prima di raggiungere un'omogeneità al picco di intensità (Diana *et al.*, 2011). Questa differenza può essere attribuita ad una diversa modalità di distribuzione ematica parietale che vede la mucosa intestinale nel cane ricevere una percentuale maggiore di flusso sanguigno arterioso (92,8%) rispetto alla sottomucosa (0,77%) (Dinda *and* Beck, 1986).

Nel nostro studio non sono state osservate differenze nella modalità di distribuzione del mezzo di contrasto tra cani sani e cani portatori di IBD.

Questo risultato è apparentemente in contrasto con quanto riportato in un recente *abstract* che descrive la presa di contrasto della parete duodenale in 17 cani con IBD caratterizzata da un'iniziale e rapido *enhancement* dello strato sottomucoso, seguito da un graduale *enhancement* dello strato mucoso. Gli autori descrivono inoltre due diversi tipi di *pattern* al picco di *enhancement*: uno caratterizzato da un completo *enhancement* dello strato mucoso e sottomucoso e uno con presa di contrasto incompleta e disomogenea dello strato mucoso (Caivano *et al.*, 2017).

In Medicina Umana una patologia che si presenta, per alcuni aspetti, simile all'IBD del cane è il Morbo di Crohn, per la quale si trova un'ampia bibliografia dell'utilizzo della CEUS per la discriminazione della patologia attiva da quella quiescente (Serra *et al.*, 2007; Migaleddu *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Ripollés *et al.*, 2013; Romanini *et al.*, 2014); pertanto possiamo provare a confrontare la presa di contrasto della parte duodenale di cani con IBD con quanto riportato in bibliografia umana nel Morbo di Crohn. Da questo confronto si osservano delle differenze, in particolare, nel Morbo di Crohn sono stati identificati quattro *pattern* di *enhancement* parietale: *enhancement* parietale completo (*pattern* monostratificato), *enhancement* degli strati più interni eccetto la muscolare (*pattern* bistratificato), *enhancement* del solo strato sottomucoso

(*pattern* tristratificato) e completa assenza di *enhancement* (Serra *et al.*, 2007). I primi due corrispondono a uno stato di flogosi attiva mentre gli altri due esprimono uno stato di quiescenza della malattia legata a fenomeni di fibrosi intraparietale (Serra *et al.*, 2007; Migaleddu *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011). In tutti i nostri soggetti del gruppo A invece, è stato identificato solo un unico *pattern* di distribuzione del mezzo di contrasto (parietale completo) verosimilmente legato allo stato flogistico e alla scarsa presenza di fibrosi rilevata all'esame istologico.

In merito alla valutazione quantitativa della perfusione parietale, la dose di 0,05 ml/kg si è dimostrata adeguata in tutti i soggetti. In solo 6 cani del gruppo A non è stato possibile ottenere le curve intensità tempo per la presenza di movimenti legati all'attività respiratoria e a quelli peristaltici intestinali che non hanno reso possibile un adeguato posizionamento della ROI. I valori ottenuti dalle variabili perfusive nei nostri soggetti sani non possono essere confrontati con gli studi riportati in bibliografia veterinaria (Jimenez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017) per diversi motivi. Innanzitutto i nostri pazienti sono stati contenuti manualmente senza il ricorso a protocolli anestesiolgici; è stato ampiamente dimostrato come l'anestesia possa influenzare la perfusione di un parenchima modificandone i parametri quantitativi (Leinonen *et al.*, 2011; Rossi *et al.*, 2016). Il mezzo di contrasto e le dosi che abbiamo utilizzato sono inoltre differenti da quelle impiegate negli altri studi (Jimenez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017) e anche questi aspetti possono influenzare in modo importante i valori ottenuti con l'analisi quantitativa dei parametri perfusivi.

Confrontando i dati ottenuti dalle variabili perfusive tra i soggetti sani e quelli portatori di IBD, abbiamo osservato come i valori di tutti i parametri CEUS fossero maggiori nei soggetti del gruppo A anche se differenze statisticamente significative sono state evidenziate esclusivamente per il PI e per il MTT. Stratificando invece i pazienti in classi di gravità secondo lo *score* CCECAI, tali differenze statisticamente significative erano presenti anche per altri due parametri quali il TTPinj e l'AUC. Questi risultati, analogamente a quanto riportato in Medicina Umana per il morbo di Crohn, potrebbero essere giustificati da un

aumentato apporto ematico nella parte intestinale come conseguenza dello stato flogogeno. Tale apporto è legato sia ad un incremento della macrovascolarizzazione sia alla neoangiogenesi di microvasi intraparietali (Serra *et al.*, 2007; Magaleddu *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2009). Anche in Medicina Umana sono state riportate differenze statisticamente significative per i valori di PI e di TTP tra pazienti sani e pazienti affetti da morbo di Crohn. In particolare il PI aumenta in corso di patologia attiva perché aumenta il numero dei vasi che risulta in un maggior numero di microbolle di mezzo di contrasto che passano attraverso la parete; mentre il TTP aumenta con la presenza di un'importante componente fibrotica (Ripollés *et al.*, 2013) che nei nostri pazienti era invece piuttosto scarsa.

L'accuratezza diagnostica dei parametri perfusivi CEUS nel differenziare fra soggetti sani e malati, analizzata mediante le curve ROC, è risultata moderata. In particolare, i due parametri perfusivi di PI e MTT sono quelli che, con valori di *cut-off* rispettivamente superiori a 3.85 a.u. e maggiori di 9.37 s, hanno dimostrato il miglior equilibrio tra sensibilità (72% per il PI e 69% per il MMT) e specificità (60% per il PI e 80% per il MMT). In Medicina Umana, l'accuratezza diagnostica del PI nel distinguere una forma di Morbo di Crohn attiva da un'inattiva si è dimostrata piuttosto elevata con valori di sensibilità e specificità rispettivamente paria a 89% e al 93% (Romanini *et al.*, 2014). Questa differenza di accuratezza tra lo studio riportato in medicina umana e il nostro potrebbe essere ascrivibile a diversi motivi. La numerosità del campione, lo scopo differente di discriminare tra forma attiva e inattiva in Medicina Umana piuttosto che tra soggetti sani e malati nel nostro studio oltre all'oggettiva mancanza di una componente fibrotica nella parete duodenale canina dei soggetti portatori di IBD rendono possibili solo dei confronti parziali con quanto riportato nell'uomo (Romanini *et al.*, 2014).

I principali limiti di questo studio sono riportati di seguito. Innanzitutto il gruppo di controllo comprendeva soggetti definiti sani solo sulla base di esami clinici, di diagnostica di laboratorio ed ecografici ma nessuno di loro è stato sottoposto ad esame endoscopico con conseguente biopsia duodenale. Un'assoluta normalità della parete intestinale valutata con l'esame istologico non era pertanto disponibile. Un'ulteriore limitazione riguarda la metodica di quantificazione delle

variabili perfusive: la ROI è stata disegnata e posizionata manualmente in corrispondenza della parete duodenale e pertanto per quanto si sia cercato di standardizzare tale procedura, questi aspetti possono aver inciso sui risultati dei parametri di perfusione.

In conclusione, con questo studio è stata confermata l'applicabilità della metodica ecocontrastografica nella valutazione della perfusione della parete duodenale in cani affetti da IBD. Solo alcuni parametri perfusivi (PI e MTT) si sono dimostrati utili nel riconoscere stati patologici di flogosi intestinale. I rilievi perfusivi qualitativi e quantitativi descritti in questo lavoro pongono le basi per futuri studi volti a valutare l'utilità della CEUS nel monitoraggio della risposta alla terapia in pazienti affetti da IBD.

BIBLIOGRAFIA

Allenspach K., Wieland B., Gröne A., Gaschen F. (2007). Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 700-708.

Allenspach K. (2011). Clinical immunology and immunopathology of the canine and feline intestine. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41: 345-360.

Brower C. J., Jiménez D. A., Shaema A. Howerth E. W., Radlinsky M. A. (2016). Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of small intestinal viability in dogs with obstructive foreign material. Proceedings of the Annual ACVR Conference. October 7 to 10, Minneapolis, Minnesota. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57, 85.

Caivano D., Marchesi M. C., Rishniw M., Timpano C., Giorgi M. E., Antognoni M. T., Conti M. B., Miglio A., Lepri E., Biretoni F. (2017). Contrast-Enhanced Ultrasonography of the Duodenum in Dogs with Inflammatory Bowel Disease: Preliminary Findings. Proceedings of the 27th ECVIM- Ca Annual Conference. September 14 to 16, St. Julian's, Malta.

Cerquetella M., Spaterna A., Laus F., Tesi B., Rossi G., Antonelli E., Villanacci V., Bassotti G. (2010). Inflammatory bowel disease in the dog: differences and similarities with humans. *World Journal of Gastroenterology*, 16: 1050-1056.

D'Angelo S., Fracassi F., Bresciani F., Galuppi R., Diana A., Linta N., Bettini G., Morini M., Pietra M. (2017). Effect of *Saccharomyces boulardii* in dog with chronic enteropathies: double-blinded, placebo-controlled study. *The Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.104241.

Dandrieux J. R. S., Noble P. J., Halladay L. J., McLean L., German A.J. (2013). Canine breed predispositions for marked hypcobalaminaemia or decreased folate concentration assessed by a laboratory survey. *The Journal of Small Animal Practice*, 54:143-148.

Dandrieux J. R. S. (2016). Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *Journal of Small Animal Practice*, 57: 589- 599.

Day M. J., Bilzer T., Mansell J., Wilcock B., Hall E. J., Jergens A., Minami T., Willard M., Washabau R. (2008). Histopathological standards for the diagnosis of gastrointestinal inflammation in endoscopic biopsy samples from the dog and cat: a report from the World Small Animal Veterinary Association Gastrointestinal Standardization Group. *Journal of Comparative Pathology*, 138: 1-43.

Diana A., Specchi S., Baron Toaldo M., Chiocchetti R., Laghi A., Cipone M. (2011). Contrast-enhanced ultrasonography of the small bowel in healthy cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52: 555-559.

Dinda P. K., Beck I. T. (1986). Arteriolar, capillary, and shunt flow gradients along the intestine in relation to the weight distribution of the mucosa, submucosa, and muscularis--a microsphere study. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 64: 1127-1136.

Gardner I. A., Greiner M. (2006). Receiver-operating characteristics curves and likelihood ratios: improvements over traditional methods for the evaluation and application of veterinary clinical pathology tests. *Veterinary Clinical Pathology*. 35: 8-17.

Gaschen L., Kircher P., Stussi A., Allenspach K., Gaschen F., Doherr M., Grone A. (2008). Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBIDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 49: 56-64.

Gaschen L. (2011). Ultrasonography of small intestinal inflammatory and neoplastic diseases in dogs and cats. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41: 329-344.

Gaschen L., Granger L. A., Oubre O., Shannon D., Kearney M., Gaschen F. (2016). The effects of food intake and its fat composition on intestinal echogenicity in healthy dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 546-550.

Girlich C., Schacherer D., Jung E. M., Klebl F., Huber E. (2012). Comparison between quantitative assessment of bowel wall vascularization by contrast-enhanced ultrasound and results of histopathological scoring in ulcerative colitis. *International Journal of Colorectal Disease*, 27: 193-198.

Gladwin N. E., Penninck D. G., Webster C. R. (2014). Ultrasonographic evaluation of the thickness of the wall layers in the intestinal tract of dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 75: 349-353.

Haers H., Vignoli M., Paes G., Rossi F., Taeymans O., Daminet S., Saunders J. H. (2010). Contrast harmonic ultrasonographic appearance of focal space-occupying renal lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 51: 516-522.

Hall J.H. (2013). Small Intestine. In Washabau R. J., Day M. J.: *Canine and Feline Gastroenterology*, 1^o ed. Elsevier St. Louis, MO: 651-728.

Jergens A. E., Schreiner A., Frank D. E., Niyo Y., Ahrens F. E., Eckersall P. D., Benson T. J., Evans R. (2003). A scoring index for disease activity in canine inflammatory bowel disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 17: 291-297.

Jiménez D. A., O'Brien R. T., Wallace J. D., Klocke E. (2011). Intraoperative contrast-enhanced ultrasonography of normal canine jejunum. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52: 196-200.

Johnson-Neitman J. L., O'Brein R. T., Wallace J. D. (2012). Quantitative perfusion analysis of the pancreas and duodenum in healthy dogs by use of contrast-enhanced ultrasonography. *American Journal of Veterinary Research*, 73:385-392.

Kathrani A., Werling D., Allenspach K. (2011). Canine breeds at high risk of developing inflammatory bowel disease in the south-eastern UK. *The Veterinary Record*, 169: 635.

Le Roux A. B., Granger L. A., Wakamatsu N., Kearney M.T., Gaschen L. (2016). Ex vivo correlation of ultrasonographic small intestinal wall layering with histology in dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 534-545.

Leinonen M. R., Raekallio M. R., Vainio O. M., Ruohoniemi M. O., Biller D. S., O'Braian R. T. (2010). Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidney, liver, pancreas, small intestinal and mesenteric lymph nodes in healthy cats. *American Journal of Veterinary Research*, 71: 1305-1311.

Leinonen M. R., Raekallio M. R., Vainio O. M., O'Braian R. T. (2011). Effect of anesthesia on contrast-enhanced ultrasound of the feline spleen. *The Veterinary Journal*, 190: 273-277.

Linta N., Baron Toaldo M., Cordella A., Pey P., Quinci M., Cipone M., Diana A. (2016). Contrast-enhanced ultrasound feature of gastrointestinal ischemia in dogs and cats: a case series. Proceedings of the 20th EVDI Annual Conference. August 31 to September 3, Wroclaw, Poland. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 663-664.

Linta N., Baron Toaldo M., Bettini G., Cordella A., Quinci M., Pey P., Galli V., Cipone M., Diana A. (2017). The feasibility of contrast enhanced ultrasonography (CEUS) in the diagnosis of non cardiac thoracic disorders of dogs and cats. *BMC Veterinary Research*, 13.

Luckschander N., Hall J. A., Gaschen F., Forster U., Wenzlow N., Hermann P., Allenspach K., Dobbelaere D., Burgener I. A., Welle M. (2009). Activation of nuclear factor-kB in dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 133: 228-236.

Medellin-Kowalewski A., Wilkens R., Wilson A., Ruan J., Wilson S. R. (2016). Quantitative contrast-enhanced ultrasound parameters in Crohn's Diseases: their role in disease activity determination with ultrasound. *Gastrointestinal Imaging*, 206: 64-73.

Migaleddu V., Scanu A. M., Quaia E., Cossu Rocca P., Dore M. P., Scanu D., Azzali L., Virgilio G. (2009). Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of inflammatory activity in Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 137: 43-61.

Mocci G., Migaleddu V., Cabras F., Sirigu D., Scanu D., Virgilio G., Marzo M. (2017). SICUS and CEUS imaging in Crohn's disease: an update. *Journal of Ultrasound*, 20: 1-9.

Nisa K., Lim S. Y., Shinohara M., Nagata N., Sasaoka K., Dermlim A., Leela-Arporn R., Morita T., Yokoyama N., Osuga T., Sasaki N., Morishita

K., Nakamura K., Ohta H., Takiguchi M. (2017). Repeatability and reproducibility of quantitative contrast-enhanced ultrasonography for assessing duodenal perfusion in healthy dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79: 1585-1590.

Penninck D., d'Anjou M. (2015). Gastrointestinal tract. In: Penninck D., D'Anjou M. *Atlas of small animal ultrasonography*. Ames, 2^o ed. Wiley Blackwell, 259-308.

Pey P., Rossi F., Vignoli M., Duchateau L., Marescaux L., Saunders J. H. (2014). Use of contrast-enhanced ultrasonography to characterize adrenal gland tumors in dogs. *American Journal of Veterinary Research*, 75: 886-892.

Rademacher N., Schur D., Gaschen F., Kearney M., Gaschen L. (2016). Contrast-enhanced ultrasonography of the pancreas in healthy dogs and in dogs with acute pancreatitis. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 58-64.

Ripollés T., Martinez-Perez M. J., Paredes M. J., Blanc E., Flors L., Delgado F. (2009). Correlation of findings at contrast-enhanced US with severity at endoscopy. *Radiology*, 253: 241-248.

Ripollés T., Martinez-Perez M. J., Blanc E., Delgado F., Vizuite J., Paredes J. M., Vilar J. (2011). Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in Crohn's disease: technique, image interpretation and clinical applications. *Insights Imaging*, 2: 639-652.

Ripollés T., Rausell N., Paredes J. M., Grau E., Martinez M. J., Vizuite J. (2013). Effectiveness of contrast-enhanced ultrasound for characterization of intestinal inflammation in Crohn's disease: A comparison with surgical histopathology analysis. *Journal of Crohn's and Colitis*, 7: 120-128.

Romanini L., Passamonti M., Navarria M., Lanzarotto F., Villanacci V., Grazioni L., Callida F., Maroldi R. (2014). Quantitative analysis of contrast-enhanced ultrasonography of the bowel wall can predict disease activity in inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology*, 83: 1317-1323.

Rossi F., Fina C., Stock E., Vanderperren K., Duchateau L., Saunders J. H. (2016). Effect of sedation on contrast-enhanced ultrasonography of the spleen in healthy dogs. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 276-281.

Serra C., Menozzi G., Morselli Labate A. M., Giangregorio F., Gionchetti P., Beltrami M., Robotti D., Fornari F., Cammarota T. (2007). 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*, 62: 114-121

Simpson K. W., Jergens A. E. (2011). Pitfalls and progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41: 381-398.

Slovak J. E., Wang C., Sun Y., Otoni C., Morrison J., Deitz K., LeVine D., Jergens A. E. (2015). Development and validation of an endoscopic activity score for canine inflammatory bowel disease. *The Veterinary Journal*, 203: 290-295.

Taeymans O., Penninck D. (2011). Contrast enhanced sonographic assessment of feeding vessel as a discriminator between malignant vs. benign focal splenic lesions. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52: 457-461.

Washabau R. J., Day M. J., Willard M. D., Hall E. J., Jergens A. E., Mansell J., Minami T., Bilzer T. W. (2010). Endoscopic, biopsy, and histopathologic

guidelines for the evaluation of gastrointestinal inflammation in companion animals. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24: 10-26.

Wdowiak M., Rychlik A., Nieradka R., Nowicki M. (2010). Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) in canine liver examination. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 13: 767-773.

Wong D. D., Forbes G. M., Zelesco M., Mason R., Pawilk J., Mendelson R. M. (2012). Crohn's disease activity: quantitative contrast-enhanced ultrasound assessment. *Abdominal Imaging*, 37: 369-376.

ESAME ECOCONTRASTOGRAFICO (CEUS) DEL DUODENO IN CANI AFFETTI DA INFLAMMATORY BOWEL DISEASE (IBD): VALUTAZIONE DELLA RISPOSTA ALLA TERAPIA

INTRODUZIONE

L'*Inflammatory Bowel Disease* (IBD) è una delle enteropatie croniche frequentemente presenti in Medicina Veterinaria (Simpson *and* Jergens, 2011). I segni clinici hanno un decorso ciclico con esacerbazione e remissione della sintomatologia (Garcia-Sancho *et al.*, 2007). Mentre alcuni soggetti rispondono in maniera adeguata ai trattamenti, altri non rispondono o rispondono solo in parte. La risposta al trattamento influenza pertanto la qualità di vita e il tempo di sopravvivenza dei pazienti nonché l'impatto economico sui proprietari (Allenspach *et al.*, 2007; Simpson *and* Jergens, 2011). Da qui nasce l'esigenza di trovare delle metodiche che siano in grado di monitorare in modo efficace la risposta alla terapia.

A oggi il metodo più accreditato per monitorizzare la risposta alla terapia è lo *score* clinico valutato mediante due indici, il *Canine Inflammatory Bowel Disease Activity Index* (CIBDAI) ed il *Canine Chronic Enteropathy Activity Index* (CCECAI) (Allenspach *et al.*, 2007; Dandrieux, 2016). I rilievi ottenuti mediante esame ecografico bidimensionale, endoscopico e istologico della parete intestinale non sembrano invece essere utili nel determinare la risposta dei pazienti al trattamento medico poiché non sono presenti modificazioni significative parietale pre- e post-terapia (Garcia-Sancho *et al.*, 2007; Gaschen *et al.* 2008; Schreiner *et al.*, 2008; Dandrieux, 2016).

In Medicina Umana una metodica ampiamente utilizzata per il monitoraggio della risposta alla terapia in corso di enteropatia cronica (ad esempio Morbo di Crohn e Colite Ulcerativa) è l'esame ecocontrastografico

(CEUS) (Quaia *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2012; Socaciu *et al.*, 2015; Mocchi *et al.*, 2017). In particolare, se è presente la diminuzione di alcuni parametri perfusivi della CEUS la risposta alla terapia risulta adeguata (Quaia *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Socaciu *et al.*, 2015; Mocchi *et al.*, 2017).

Attualmente in Medicina Veterinaria non sono riportati studi sull'utilizzo della metodica ecocontrastografica nel monitoraggio della risposta terapeutica in caso di patologia gastroenterica infiammatoria e pertanto lo scopo di questo studio è stato quello di valutare i *pattern* di perfusione parietale del duodeno con mezzo di contrasto di seconda generazione in una popolazione di cani affetti da IBD prima e dopo trattamento farmacologico standardizzato, al fine di identificare dei parametri perfusivi indicativi di risposta alla terapia medica.

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Questo studio è stato condotto in maniera prospettica, in parallelo allo studio precedente descritto, su un gruppo di cani affetti da IBD riferiti presso l'Ospedale Veterinario Universitario del Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie dell'Università di Bologna nel periodo compreso tra Novembre 2014 e Gennaio 2016. Per reclutare i pazienti sono stati utilizzati gli stessi criteri d'inclusione descritti in precedenza nella prima sezione di questa tesi di Dottorato.

I proprietari sono stati informati sulle modalità di svolgimento dello studio mediante accettazione del consenso informato.

Lo studio è stato approvato dal Comitato per il Benessere degli Animali dell'Università di Bologna.

Protocollo clinico-laboratoristico, ecografico bidimensionale, ecocontrastografico, endoscopico e istologico

I protocolli, clinico-laboratoristico, ecografico bidimensionale, ecocontrastografico, endoscopico e istologico del duodeno, eseguiti su ciascun paziente reclutato nello studio, sono stati già descritti in precedenza nella prima sezione di questa tesi di Dottorato. In particolare le valutazioni eseguite su pazienti al momento della diagnosi sono state arbitrariamente definite al tempo 0 (**T0**).

Tutti i pazienti sono stati rivalutati da un punto di vista clinico, ecografico bidimensionale, ecocontrastografico, endoscopico e istologico del duodeno in un intervallo di tempo compreso tra i 62 e i 68 giorni dall'inizio della terapia standardizzata (protocollo terapeutico descritto nella prima sezione di questa tesi di Dottorato). Questo *time point* è stato arbitrariamente definito **T1**.

Analisi statistica

Le variabili discrete sono state studiate per la loro distribuzione utilizzando un test *D'Agostino-Pearson* e presentate come media \pm deviazione standard (DS), o come mediana (*range* con valore minimo e massimo).

Il confronto tra le variabili perfusive CEUS, lo *score* clinico, quello ecografico, endoscopico e istologico tra i cani inclusi nei gruppi al T0 e al T1 è stato condotto con il test T di *Student* per dati appaiati e con il test di *Wilcoxon* per coppie appaiate.

Infine è stato condotto uno studio di correlazioni tra le variabili ottenute dai dati perfusivi CEUS e lo *score* clinico, ecografico, endoscopico e istologico impiegando per l'analisi le variabili derivate da tutti i cani affetti da IBD arruolati anche nello studio precedente (36 soggetti) e quelli post-terapia. Tale analisi è stata condotta mediante test di *Pearson* o di *Spearman*.

Tutte le analisi sono state effettuate con *software* dedicati^{1,2}. Sono stati considerati significativi valori di $P < 0.05$.

RISULTATI

In questa seconda parte dello studio sono stati arruolati 12 soggetti i cui dati segnaletici completi sono riportati nella **Tabella 1**.

A T0, i soggetti presentavano un valore medio di CCECAI pari a 7,17 punti con una DS pari a 1,90 mentre a T1 la media era pari a $3,42 \pm 2,75$ punti. Tale differenza tra i due *time points* è risultata statisticamente significativa ($P = 0,025$). Relativamente ai folati, cobalamina (B12) e proteina C reattiva (CRP), i livelli sierici di queste molecole al T0 avevano un valore mediano rispettivamente di 11,81 $\mu\text{g/l}$ (*range* da 3,08 $\mu\text{g/l}$ a 24 $\mu\text{g/l}$ - valore di riferimento 6,50-11,50 $\mu\text{g/l}$), 268 ng/l (*range* da 156 a 653 ng/l - 250-730 ng/l) e 0,02 mg/dl (*range* da 0,01 a 1,59 mg/dl - valore di riferimento 0 - 0,5 mg/dl) (**Tabella 2**).

L'esame ecografico bidimensionale eseguito a T0 ha evidenziato le seguenti alterazioni:

- Spessore di parete: in 6 soggetti (50%) il duodeno presentava un aumento dello spessore di parete rispetto ai valori riportati in letteratura. In particolare lo spessore di parete del duodeno variava da 2,9 mm a 5,7 mm (media $4,3 \text{ mm} \pm 0,8$).
- Stratigrafia: è risultata essere normale in 5 soggetti ed alterata nei restanti 7 (58,3%). In particolare sono stati evidenziati *spot* iperecogeni nello strato mucoso in 1/7 soggetti (14,3%), striature iperecogene nella mucosa in 3/7 soggetti (42,8%), prominenza dello strato sottomucoso in 2/7 soggetti (28,6%) ed iperecogenicità diffusa di tutto lo strato mucoso in 5/7 cani (71,4%).

¹ Microsoft Excell, Microsoft Office Professional Plus 2013, Microsoft Corporation, Bellevue, WA

² Prism 5®, GraphPad Software Inc., San Diego, CA

- Motilità: è risultata alterata in un unico soggetto (8,3%), in particolare era aumentata.
- Ecogenicità peri-intestinale: aumentata in 3 soggetti (25%).
- Linfoadenomegalia regionale: presente in 3 soggetti (25%).
- Versamento addominale: presente in 3 soggetti (25%); in 1 soggetto il versamento era grave, in 2 era moderato.

Lo **score ecografico** ottenuto dalla somma dei parametri sopra elencati ha classificato 8 cani in un grado di malattia lieve, 1 soggetto in uno moderato, 2 pazienti in uno grave e solo in 1 caso non erano presenti alterazioni ecografiche.

Le alterazioni ecografiche bidimensionali evidenziate a T1 erano:

- Spessore di parete: il duodeno si presenta ispessito in 6 soggetti; in particolare lo spessore variava da 3,6 a 5,8 mm con una media di 4,3 mm \pm 0,6.
- Stratigrafia: è risultata essere normale in 7 soggetti ed alterata nei restanti 5 (41,7%). In particolare in 4 pazienti l'alterazione era dovuta alla presenza di *spot* iperecogeni localizzati a livello dello strato mucosale ed in un solo caso per un diffuso aumento dell'ecogenicità sempre dello strato mucoso.
- Motilità: alterata in 3 pazienti, in particolare in un solo caso era aumentata, mentre nei restanti due era diminuita.
- Ecogenicità peri-intestinale: aumentata in due soggetti.
- Linfoadenomegalia regionale: assente in tutti i soggetti.
- Versamento addominale: presente solo in lieve quantità in un unico soggetto.

Lo **score ecografico** ottenuto dalla somma dei parametri sopra elencati ha classificato 7 cani in un grado di malattia lieve, 2 soggetti in uno moderato mentre in tre pazienti non erano presenti alterazioni ecografiche significative.

Anche se il punteggio ecografico si era ridotto confrontando i due *time points*, tali differenze non sono risultate statisticamente significative ($P = 0,669$) (**Tabella 2**).

La modalità di distribuzione del mezzo di contrasto nella parete duodenale è risultata pressoché uguale a T0 e a T1 in tutti i soggetti. In particolare era caratterizzata dalle seguenti fasi contrastografiche:

- fase iniziale in cui il mezzo di contrasto raggiunge l'ansa duodenale attraverso i vasi arteriosi digiunali;
- fase di distribuzione intraparietale in cui il mezzo di contrasto si diffonde in maniera radiale simultaneamente in tutta la parete, in assenza di una visualizzazione stratigrafica;
- raggiungimento del picco di intensità dove tutta la parete appare perfusa in maniera omogenea;
- lento dilavamento del mezzo di contrasto dalla parete intestinale.

L'analisi quantitativa della perfusione del mezzo di contrasto nella parete duodenale è stata eseguita in 10 dei 12 soggetti a T0 poiché i movimenti legati all'attività respiratoria e quelli peristaltici intestinali non hanno reso possibile un adeguato posizionamento della ROI in 2 soggetti. La quantificazione a T1 è stata eseguita su tutti i 12 cani.

Non sono state riscontrate differenze statisticamente significative per ciascun parametro tra i due *time points* (T0; T1) (**Tabella 3**).

Lo **score endoscopico** totalizzato secondo il punteggio di Slovak nei cani a T0 è stato pari a 1 in 1 caso (8,3%), 2 in 3 soggetti (25%), 3 in 2 pazienti (16,5%), 4 in 4 cani (33,3%) e 5 in 2 cani (16,5%); mentre a T1 è stato pari a 1 in 5 cani (41,7%), 2 in 3 soggetti (25%), ciascuno dei seguenti valori 3, 4, 5 e 6 in un solo paziente (8,3%). Sebbene il valore medio dello *score* sia risultato più basso nei cani a T1, tale differenza non era statisticamente significativa (**Tabella 2**).

Le valutazioni istologiche sono state effettuate su 8 soggetti a T0 e su 11 a T1 poiché alcuni parametri dei criteri strutturali non erano valutabili. Tutti i campioni esaminati presentavano alterazioni indicative di uno stato flogistico di diversa gravità con uno **score istologico** variabile da 6 a 20 in 9 pazienti i campioni bioptici non erano adeguati. All'esame istologico, tutti i campioni bioptici della parete duodenale analizzati presentavano alterazioni indicative di uno stato flogistico di diversa gravità con uno **score istologico** variabile da 8 a 16 per entrambi i *time points*.

I valori medi dei punteggi a T0 e a T1 erano pressoché sovrapponibili tra loro, tuttavia tale dato non è stato sottoposto ad una conferma con l'analisi statistica perché in 4/12 soggetti a T0 non è stato possibile ottenere uno score completo (**Tabella 2**).

I test di correlazione tra le variabili ottenute dai dati perfusivi CEUS e lo *score* clinico, ecografico bidimensionale, endoscopico e istologico, eseguiti su 36 soggetti pre-terapia e 10 nel post-terapia, hanno evidenziato una correlazione tra il parametro perfusivo TTPinr e il CCECAI ($P= 0,029$). Non sono state evidenziate altre correlazioni statisticamente significative tra le diverse variabili perfusive CEUS e gli score clinico, ecografico bidimensionale, endoscopico e istologico (**Tabella 4**).

| SEGNALAMENTO | | | | | |
|--------------|------------------|-------|-------------|--------------|--------------|
| Caso | RAZZA | SESSO | ETA' (anni) | PESO T0 (kg) | PESO T1 (kg) |
| 1 | Pastore Tedesco | M | 2 | 27 | 32 |
| 2 | Bassotto | M | 7 | 9,3 | 9,2 |
| 3 | Pastore Tedesco | M | 8 | 33,8 | 32,6 |
| 4 | Meticcio | Mc | 8 | 25,8 | 25,4 |
| 5 | Pastore Tedesco | M | 3 | 25,5 | 36,2 |
| 6 | Setter Irlandese | M | 2 | 24,2 | 24,2 |
| 7 | Rottweiler | M | 3 | 43,9 | 43,9 |
| 8 | Boxer | F | 0,7 | 18,8 | 18,8 |
| 9 | Border Collie | M | 5 | 23,7 | 21 |
| 10 | Alano | M | 1 | 64,5 | 63,2 |
| 11 | Labrador | M | 3 | 28 | 29,3 |
| 12 | Siberian Husky | M | 0,6 | 25,7 | 25,7 |
| Media | | | 3,6 | 29,2 | 30,1 |
| DS | | | 2,7 | 13,8 | 13,7 |

Tabella 1: Segnalamento soggetti portatori di IBD. Il valore del peso viene riportato in entrambi i *time points* (T0 e T1). M: maschio; Mc: maschio castrato; F: femmina; Fs: femmina sterilizzata.

| CCECAI, US, ENDOSCOPIA e ISTOLOGIA - T0 e T1 | | | | |
|--|-----------------|--------------------|--------------------|---------------|
| PARAMETRI | NUMERO PAZIENTI | T0 | T1 | P |
| CCECAI | 12 | 7,17 ± 1,90 | 3,42 ± 2,75 | 0,0246 |
| Folati (µg/l) | 10 | 11,81 (3,08-24) | na | na |
| Cobalamina (ng/l) | 10 | 268 (156-653) | na | na |
| CRP (mg/dl) | 8 | 0,02 (0,01-1,59) | na | na |
| Score US | 12 | 1,92 ± 1,83 | 1,42 ± 1,24 | 0,6693 |
| Score Endoscopico | 12 | 3,25 ± 1,29 | 2,42 ± 1,73 | 0,5702 |
| Score Istologico | 11* | 11,88 ± 3,09 | 11,73 ± 2,69 | na |

Tabella 2: Confronto statistico tra il CCECAI, Score ecografico (US) ed endoscopico tra i due *time points* (T0 – T1). I dati distribuiti normalmente e non normalmente sono espressi rispettivamente in media (± DS) e mediana (minimo – massimo). na: non applicabile, *: il numero dei pazienti si riferisce alla tempistica T1, mentre al T0 il numero dei pazienti era 8. **P<0,05**

| PARAMETRI DI PERFUSIONE CEUS | | | |
|------------------------------|---------------------|----------------------|--------|
| VARIABILI | T0 (n=10) | T1 (n=10) | P |
| AT (s) | 11,04 (8,11-16,01) | 12,32 (6,150-20,30) | 0,8457 |
| TTPinj (s) | 17,77 ± 4,06 | 17,27 ± 4,86 | 0,7892 |
| TTPinr (s) | 6,14 ± 1,65 | 5,12 ± 1,11 | 0,09 |
| PI (a.u.) | 4,14 (1,26-7,87) | 5,41 (2,69-12,34) | 0,1602 |
| MTT (s) | 10,46 (5,79-12,69) | 9,99 (8,44-15,65) | 0,4922 |
| AUC (a.u.s) | 51,59 (17,38-91,50) | 58,89 (32,84-144,60) | 0,2754 |
| Wi (a.u./s) | 0,63 (0,15-1,31) | 1,06 (0,32-2,48) | 0,1602 |

Tabella 3: Confronto statistico tra le variabili perfusive CEUS nei pazienti con IBD nei due *time points*. I dati distribuiti normalmente e non normalmente sono espressi rispettivamente in media (\pm DS) e mediana (minimo – massimo). n: numero dei soggetti, s: secondi, a.u.: unità arbitraria. **P<0,05**

| CORRELAZIONE CEUS, CCECAI, SCORE ECOGRAFICO, ENDOSCOPICO e ISTOLOGICO | | | | | | | | |
|---|----------------|--------|---------------------------|--------|---------------------------|--------|--------------------------|-------|
| VARIABILI CEUS | CCECAI (n= 47) | | SCORE ECOGRAFICO (n = 47) | | SCORE ENDOSCOPICO (n= 47) | | SCORE ISTOLOGICO (n= 38) | |
| | P | r | P | r | P | r | P | r |
| AT (s) | 0,069 | 0,268 | 0,810 | 0,036 | 0,033 | 0,311 | 0,246 | 0,193 |
| TTPinj (s) | 0,095 | 0,246 | 0,840 | 0,03 | 0,079 | 0,259 | 0,123 | 0,255 |
| TTPinr (s) | 0,029 | 0,319 | 0,762 | -0,045 | 0,393 | 0,128 | 0,512 | 0,110 |
| PI (a.u.) | 0,909 | 0,017 | 0,746 | 0,049 | 0,295 | -0,156 | 0,253 | 0,190 |
| MTT (s) | 0,112 | 0,235 | 0,621 | 0,074 | 0,958 | -0,008 | 0,157 | 0,234 |
| AUC (a.u.s) | 0,678 | 0,062 | 0,679 | 0,062 | 0,319 | -0,149 | 0,364 | 0,151 |
| Wi (a.u./s) | 0,516 | -0,097 | 0,628 | 0,073 | 0,143 | -0,217 | 0,373 | 0,149 |

Tabella 4: Correlazioni tra le variabili di perfusione della CEUS con il CCECAI, lo score ecografico 2D, lo score endoscopico secondo Slovak e lo score istologico secondo Day. n: numero dei soggetti, s: secondi, a.u.: unità arbitraria, r: regressione. **P< 0,05.**

DISCUSSIONE e CONCLUSIONI

In questo studio sono stati valutati gli *score* clinici, ecografici bidimensionali, ecocontrastografici, endoscopici e istologici della parete duodenale in una popolazione di soggetti affetti da IBD al momento della diagnosi e dopo un intervallo standardizzato dall'inizio della terapia identificato in un *range* di 62-68 giorni. Questo intervallo temporale è stato identificato sulla base di studi analoghi in cui venivano comparate variabili cliniche ed ecografiche bidimensionali in soggetti portatori di IBD pre- e post-terapia (D'Angelo *et al.*, 2017).

Nel nostro studio è stata evidenziata una differenza statisticamente significativa tra i due *time points* per quanto concerne lo score clinico CCECAI che è passato da un punteggio medio di 7,17 a T0 ad uno di 3,42 a T1. Tale comportamento è in analogia con quanto riportato in letteratura (Allenspach *et al.*, 2007) confermando l'utilità di questo *score* nel monitoraggio della risposta terapeutica dell'IBD.

In merito alle alterazioni ecografiche dell'apparato gastroenterico, ed in particolare dello spessore e della stratigrafia di parete, non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra le due tempistiche (T0 e T1). Questi risultati confermano quanto già in parte riportato in bibliografia. Da un lato non sempre l'IBD crea alterazioni stratigrafiche parietali e dall'altro ad un miglioramento clinico non necessariamente si associa un miglioramento dei rilievi ecografici (Gaschen *et al.*, 2008). Valutando altri parametri ecografici quali l'ecogenicità del mesentere, la presenza di linfadenomegalia regionale e il versamento addominale, nei nostri pazienti si è osservato un miglioramento degli stessi tra il momento della diagnosi e quello del controllo pur non mostrando differenze statisticamente significative. Tuttavia questi rilievi non possono essere considerati dei parametri prognostici o di monitoraggio della risposta alla terapia in corso di IBD poiché non sempre sono alterati al tempo 0 e, come già riportato in

letteratura, sono parametri estremamente aspecifici (Penninck *et al.*, 2003; Gaschen *et al.* 2008).

In merito alla metodica ecocontrastografica applicata alla parete duodenale, sia i rilievi qualitativi sia quelli quantitativi, osservati nei nostri pazienti a T0 e a T1, non hanno evidenziato sostanziali differenze. In particolare la modalità di distribuzione del mezzo di contrasto si è dimostrata analoga a quella descritta nel primo studio di questa tesi di Dottorato, perfettamente in linea con quanto riportato in bibliografia veterinaria nei pazienti sani (Jimenez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017) e uguale per tutti i pazienti nei due *time points*.

Il confronto tra i parametri quantitativi CEUS dei nostri pazienti a T0 e a T1 non ha evidenziato differenze statisticamente significative. In Medicina Umana sono riportati diversi lavori che valutano in maniera quantitativa la metodica CEUS in pazienti portatori di Morbo di Crohn prima e dopo un trattamento medico standardizzato (Quaia *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2012; Socaciu *et al.*, 2015; Mocci *et al.*, 2017). Questi studi riportano un calo statisticamente significativo di PI e AUC nel post-terapia dimostrando come la CEUS possa essere una metodica di *imaging* utile nel valutare l'efficacia del trattamento medico mirato a ridurre la flogosi intestinale (Quaia *et al.*, 2009; Ripollés *et al.*, 2011; Socaciu *et al.*, 2015). Il mancato rilievo di una riduzione statisticamente significativa di questi parametri nei nostri soggetti pre- e post-terapia potrebbe essere attribuibile sia alla ridotta numerosità campionaria (10 soggetti) sia all'intervallo di tempo scelto per il controllo post terapeutico (62-68 giorni dall'inizio della terapia). Come già ribadito in precedenza la scelta di tale tempistica è stata dettata da esperienze riportate in studi di confronto tra diverse variabili pre- e post-terapia in soggetti portatori di IBD (D'Angelo *et al.*, 2017). Non possiamo pertanto escludere che la riduzione di alcuni parametri perfusivi quali il PI e l'AUC richiedano intervalli terapeutici superiori ai due mesi prima di modificarsi in modo sostanziale.

Per quanto riguarda i risultati ottenuti dagli *score* endoscopico ed istologico pre- e post-terapia, anche in questi casi non è stata evidenziata nessuna differenza statisticamente significativa. Questi risultati sono in linea con quanto già riportato in bibliografia veterinaria ossia come questi *score* siano poco utili nel valutare la risposta clinica al trattamento terapeutico mantenendosi pressoché invariati anche di fronte ad una buona risposta clinica (Garcia-Sancho *et al.*, 2007; Schreiner *et al.*, 2008; Dandrieux, 2016). Anche per questi *score* tuttavia, non si può escludere che sia necessario un tempo più prolungato rispetto ai due mesi per un miglioramento degli aspetti endoscopici e istologici.

In questo studio non è stata rilevata una correlazione tra i parametri di perfusione CEUS e gli *score* clinico, ecografico bidimensionale, endoscopico ed istologico. Questi risultati differiscono da quanto riportato in Medicina Umana, dove alcuni lavori hanno evidenziato una correlazione positiva tra il parametro perfusivo AUC e lo *score* clinico (Quaia *et al.*, 2009), endoscopico (Socaciu *et al.*, 2015) ed istologico (Ripollés *et al.*, 2011; Romanini *et al.*, 2014) proponendo pertanto la metodica CEUS come una valida alternativa a quella endoscopica e istologica (Socaciu *et al.*, 2015).

In conclusione, in questo studio non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra i diversi parametri perfusivi CEUS pre- e post-terapia in pazienti portatori di IBD analogamente a quanto riscontrato, sia nel nostro studio sia in bibliografia veterinaria, per gli *score* endoscopici e istologici. Tale ridotta performance della metodica CEUS nel monitoraggio della risposta alla terapia per l'IBD potrebbe tuttavia essere stata condizionata dalla bassa numerosità campionaria oltre che dall'intervallo temporale scelto per il controllo post-terapia. Pertanto i risultati ottenuti con questo studio richiedono una validazione su una casistica più ampia di soggetti portatori di IBD trattati con un protocollo medico standardizzato.

BIBLIOGRAFIA

Allenspach K., Wieland B., Gröne A., Gaschen F. (2007). Chronic enteropathies in dogs: evaluation of risk factors for negative outcome. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 700-708.

D'Angelo S., Fracassi F., Bresciani F., Galuppi R., Diana A., Linta N., Bettini G., Morini M., Pietra M. (2017). Effect of *Saccharomyces boulardii* in dog with chronic enteropathies: double-blinded, placebo-controlled study. *The Veterinary Record*, doi: 10.1136/vr.104241.

Dandrieux J. R. S. (2016). Inflammatory bowel disease versus chronic enteropathy in dogs: are they one and the same? *Journal of Small Animal Practice*, 57: 589- 599.

Garcia-Sancho M., Rodriguez-Franco F., Sainz A., Mancho C., Rodriguez A. (2007). Evaluation of clinical, macroscopic, and histopathologic response to treatment in nonhypoproteinemic dogs with lymphocytic-plasmacytic enteritis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21: 11-17.

Gaschen L., Kircher P., Stussi A., Allenspach K., Gaschen F., Doherr M., Grone A. (2008). Comparison of ultrasonographic findings with clinical activity index (CIBIDAI) and diagnosis in dogs with chronic enteropathies. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 49: 56-64.

Jiménez D. A., O'Brien R. T., Wallace J. D., Klocke E. (2011). Intraoperative contrast-enhanced ultrasonography of normal canine jejunum. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52: 196-200.

Johnson-Neitman J. L., O'Brein R. T., Wallace J. D. (2012). Quantitative perfusion analysis of the pancreas and duodenum in healthy dogs by use of contrast-enhanced ultrasonography. *American Journal of Veterinary Research*, 73: 385-392.

Mocci G., Migaleddu V., Cabras F., Sirigu D., Scanu D., Virgilio G., Marzo M. (2017). SICUS and CEUS imaging in Crohn's disease: an update. *Journal of Ultrasound*, 20: 1-9.

Nisa K., Lim S. Y., Shinohara M., Nagata N., Sasaoka K., Dermlim A., Leela-arporn R., Morita T., Yokoyama N., Osuga T., Sasaki N., Morishita K., Nakamura K., Ohta H., Takiguchi M. (2017). Repeatability and reproducibility of quantitative contrast-enhanced ultrasonography for assessing duodenal perfusion in healthy dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 79: 1585-1590.

Penninck D., Smyers B., Webster C., Rand W., Moore A. S. (2003). Diagnostic value of ultrasonography in the differentiating enteritis from intestinal neoplasia in dogs. *Veterinary Radiology Ultrasound*, 44: 570-575.

Quaia E., Migaleddu V., Baratella E., Pizzolato R. (2009). The diagnostic value of small bowel wall vascularity after sulfur hexafluoride-filled microbubble injection in patients with Crohn's disease. Correlation with the therapeutic effectiveness of specific anti-inflammatory treatment. *European Journal of Radiology*, 69: 438-444.

Ripollés T., Martínez-Perez M. J., Blanc E., Delgado F., Vizúete J., Paredes J. M., Vilar J. (2011). Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in Crohn's disease: technique, image interpretation and clinical applications. *Insights Imaging*, 2: 639-652.

Romanini L., Passamonti M., Navarria M., Lanzarotto F., Villanacci V., Grazioni L., Callida F., Maroldi R. (2014). Quantitative analysis of contrast-enhanced ultrasonography of the bowel wall can predict disease activity in inflammatory bowel disease. *European Journal of Radiology*, 83: 1317-1323.

Simpson K. W., Jergens A. E. (2011). Pitfalls and progress in the Diagnosis and Management of Canine Inflammatory Bowel Disease. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, 41: 381-398.

Slovak J. E., Wang C., Sun Y., Otoni C., Morrison J., Deitz K., LeVine D., Jergens A. E. (2015). Development and validation of an endoscopic activity score for canine inflammatory bowel disease. *The Veterinary Journal*, 203: 290-295.

Socaciu M., Ciobanu L., Diaconu B., Hagiuc C., Seicean A., Badea R. (2015). Non-invasive assessment of inflammation and treatment response in patients with Crohn's disease and Ulcerative colitis using contrast-enhanced ultrasonography quantification. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 24: 457-465.

Schreiner N. M., Gaschen F., Gröne A., Sauter S. N., Allenspach K. (2008). Clinical signs, histology, and CD3-positive cells before and after treatment of dogs with chronic enteropathies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22: 1079-1083.

Wong D. D., Forbes G. M., Zelesco M., Mason R., Pawilk J., Mendelson R. M. (2012). Crohn's disease activity: quantitative contrast-enhanced ultrasound assessment. *Abdominal Imaging*, 37: 369-376.

ECOGRAFIA CON MEZZO DI CONTRASTO (CEUS) IN CORSO DI ISCHEMIA GASTROINTESTINALE NEI PICCOLI ANIMALI

INTRODUZIONE

L'ischemia gastrointestinale è un patologia potenzialmente fatale con un decorso progressivo che può portare alla necrosi della parete gastrica o intestinale (Wallack *et al.*, 2003; Kanzaki *et al.*, 2012; Reginelli *et al.*, 2013). La sindrome ischemica gastroenterica rappresenta un insieme complesso di patologie causate da un'inadeguata perfusione delle pareti del tratto gastroenterico ed include l'ischemia acuta dell'arteria o vena mesenterica, l'embolia vascolare, lo strangolamento vascolare o l'ischemia secondaria alla presenza di un corpo estraneo occludente (Hata *et al.*, 2005; Reginelli *et al.*, 2013; Brower *et al.*, 2016). I segni e la presentazione clinica sono piuttosto aspecifici, sebbene i pazienti umani spesso lamentino un severo dolore addominale, soprattutto nelle fasi iniziali (Wallack *et al.*, 2003; Kanzaki *et al.*, 2012). Una tempestiva diagnosi è essenziale per discriminare un approccio chirurgico verso uno di tipo medico (Wallack *et al.*, 2003; Kanzaki *et al.*, 2012). In medicina umana il *gold standard* per la diagnosi definitiva di ischemia gastrointestinale è l'angioTC addominale, dove la sensibilità è pari all' 82-96% e la specificità è a 94% (Hata *et al.*, 2005; Gore *et al.*, 2008; Giannetti *et al.*, 2010; Kanzaki *et al.*, 2012; Reginelli *et al.*, 2013). L'ecografia addominale è una delle modalità di *imaging* comunemente utilizzata in pazienti umani e nei piccoli animali con addome acuto, anche se questa tecnica è ritenuta essere meno accurata nella valutazione delle ischemie intestinali (Hata *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*, 2012; Reginelli *et al.*; 2013). In particolare, il color Doppler è poco adeguato per la valutazione della perfusione della parete gastrointestinale, poichè la velocità del flusso e la potenza del segnale nel microcircolo sono al di sotto del livello di ricezione dello strumento (Mizushige *et al.*, 1999; Hata *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*,

2012; Van den Heijkant *et al.*, 2013). Al contrario, diversi studi hanno dimostrato l'accuratezza della metodica CEUS nell'identificazione dell'ischemia intestinale in ambito umano (Robbotti *et al.*, 2004; Hamada *et al.*, 2007). In letteratura veterinaria, alcuni studi hanno valutato la perfusione della parte intestinale normale felina e canina mediante un mezzo di contrasto di seconda generazione (Leinonen *et al.*, 2010; Diana *et al.*, 2011, Jiménez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017). L'impiego della metodica CEUS per la diagnosi di ischemia intestinale nei piccoli animali è stato recentemente riportato solo in due *abstracts* (Brower *et al.*, 2016; Linta *et al.*, 2016). In particolare nel primo di questi veniva valutata l'utilità della CEUS in corso di patologia ischemica intestinale canina secondaria a occlusione da corpo estraneo (Brower *et al.*, 2016) mentre il secondo descriveva il comportamento della metodica ecocontrastografica in una serie di casi di cani e gatti con ischemia della parete gastrointestinale di diversa natura (Linta *et al.*, 2016).

Lo scopo di questo studio è stato pertanto quello di valutare l'applicabilità della metodica CEUS nella diagnosi di ischemia intestinale nei piccoli animali.

MATERIALI E METODI

Popolazione di studio

Questo è un lavoro condotto in maniera prospettica su pazienti che sono stati portati in visita presso l'Ospedale Veterinario Universitario della Facoltà di Medicina Veterinaria di Bologna con sintomatologia caratterizzata da addome acuto, nel periodo compreso tra Novembre 2014 e Maggio 2017.

I criteri di inclusione per questo studio sono stati i seguenti:

- esame ecografico addominale completo ed in particolare dell'apparato gastroenterico con evidenza di un'alterazione focale ipoecogena per la

quale in diagnosi differenziale potesse essere considerata una lesione ischemica;

- esame ecocontrastografico, dopo somministrazione di mezzo di contrasto di seconda generazione (Sonovue®¹), delle lesioni gastrointestinali evidenziate dall'esame B-Mode eseguito contestualmente con l'esame bidimensionale.
- diagnosi di ischemia gastrointestinale ottenuta mediante osservazione diretta nell'ambito di una procedura chirurgica o mediante esame istologico.

Dallo studio sono stati esclusi i soggetti sprovvisti di una diagnosi definitiva di ischemia intestinale.

Inoltre per ogni caso incluso nello studio sono stati registrati i dati riguardanti il segnalamento (specie, razza, sesso, età), l'anamnesi e la sintomatologia clinica.

Protocollo ecografico

Per l'esame ecografico di base dell'apparato gastroenterico è stato utilizzato un ecografo² equipaggiato con sonda microconvex (C8-5) e lineare ad alta frequenza (L3-9). Durante l'esame bidimensionale è stata anche valutata la perfusione della lesione gastrointestinale mediante metodica color Doppler, che è stata ottimizzata al massimo per i flussi lenti della parete intestinale mediante una PRF (*Pulse Repetition Frequency*) molto bassa.

Per l'esame ecocontrastografico sono state usate due sonde, una lineare ad alta frequenza (L3-9) e una sonda convex (C2-5). È stato impiegato il mezzo di contrasto Sonovue®, somministrato mediante catetere endovenoso inserito nella vena cefalica di ciascun paziente. La dose utilizzata era di 0.5 ml per i gatti e di 0.05 ml/kg per i cani, somministrata in un unico bolo, seguita dal successivo *flush* di 5 ml di soluzione fisiologica. E' stato quindi

¹ Bracco diagnostic, Milano Italy.

² iU22 ultrasound system, Philips Healthcare, Monza, Italy

attivato un *software* di *imaging* dedicato (*Pulse Inversion Harmonic and Power Modulation combined – PMPI*) che seleziona il segnale dato dal mezzo di contrasto.

Le immagini e i filmati raccolti durante l'esame ecografico bidimensionale e con mezzo di contrasto sono stati riesaminati da un unico operatore esperto mediante un *software* specifico³.

Per ciascuna lesione gastrointestinale sono stati valutati i seguenti parametri:

Esame B-Mode

- localizzazione (stomaco, duodeno, digiuno, ileo, colon);
- spessore parietale (mantenuto, aumentato, diminuito rispetto ai valori riportati in bibliografia) (Winter *et al.*, 2014; Penninck *and* d'Anjou, 2015) e distribuzione della lesione (simmetrica, asimmetrica);
- stratigrafia (normale, alterata o destrutturata);
- contenuto del lume gastro-intestinale ed eventuali segni di dilatazione;
- peristalsi (motilità conservata o alterata);
- valutazione del peritoneo con segnalazione dell'eventuale presenza di versamento peritoneale o pneumoperitoneo;
- alterazioni a carico di altri organi.

Esame color-Doppler:

- presenza ed intensità del segnale vascolare a livello intralesionale;
- vascolarizzazione dei segmenti intestinali a monte e a valle della lesione stessa.

Esame CEUS:

- valutazione della presa di contrasto nel punto della lesione (presente, assente o soggettivamente ridotta in riferimento a quanto riportato

³ Show Case software, Trillium Technology, Ann Arbor, MI

precedentemente in bibliografia nei soggetti sani) (Leinonen *et al.*, 2010; Diana *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017);

- valutazione della presa di contrasto a livello delle anse circostanti la lesione (Leinonen *et al.*, 2010; Diana *et al.*, 2011; Jiménez *et al.*, 2011; Johnson-Neitman *et al.*, 2012; Nisa *et al.*, 2017).

RISULTATI

Popolazione di studio

Cinque pazienti, 1 cane e 4 gatti rispettavano i criteri di inclusione descritti precedentemente e pertanto sono stati inseriti nello studio. Si trattava di un cane San Bernardo, femmina sterilizzata di 2 anni e di due gatti femmine sterilizzate e due maschi castrati, tutti di razza europea. L'età dei pazienti era compresa tra 1 e 13 anni con una mediana di 6.

Tutti i soggetti presentavano segni clinici estremamente aspecifici, in particolare: letargia (5 soggetti), anoressia (4 soggetti), dolore addominale (2 casi), vomito (2 casi), ipotermia (1 caso) ed ipertermia (1 caso).

Il segnalamento e i rilievi clinici completi sono stati riportati dettagliatamente nella **Tabella 1**.

| SEGNALAMENTO | | | | | |
|---------------------|---------------|--------------|---------------|------------|--|
| CASO | SPECIE | RAZZA | GENERE | ETÀ | SEGNI CLINICI |
| 1 | Cane | San Bernardo | Fs | 2 A | Anoressia, Letargia, Dolore addominale |
| 2 | Gatto | Europeo | Mc | 6 A | Anoressia, Letargia, Dolore addominale, Vomito |
| 3 | Gatto | Europeo | Fs | 13 A | Anoressia, Letargia, Vomito |
| 4 | Gatto | Europeo | Fs | 11 A | Anoressia, Letargia, Ipotermia |
| 5 | Gatto | Europeo | Mc | 1 A | Letargia, Ipertermia |

Tabella 1: Tabella riassuntiva con le informazioni dettagliate riguardanti segnalamento ed esame clinico ciascun caso compreso nello studio. Fs: Femmina sterilizzata; Mc: Maschio castrato; A: anni.

Le lesioni gastrointestinali rilevate erano a carico di diversi tratti dell'apparato stesso e presentavano una eziologia diversa:

- Caso 1: lesione gastrica dovuta alla trombosi delle arterie gastriche brevi, secondaria a dilatazione e volvolo dello stomaco associati a torsione splenica;
- Caso 2: lesione del duodeno discendente dovuta ad ulcera perforante;
- Caso 3: lesione digiunale secondaria ad enterite necrotizzante transmurale;
- Caso 4: lesione del digiuno dovuta a un danno iatrogeno alle arterie digiunali conseguente ad un intervento chirurgico di enterectomia e linfoadenectomia;
- Caso 5: lesione del colon discendente legata a perforazione dell'organo durante il tentativo di risoluzione manuale della costipazione.

In due casi la diagnosi di ischemia intestinale è avvenuta mediante esame istologico, in particolare:

- nel caso 2 la lesione era dovuta ad un processo di necrosi colliquativa conseguente alla presenza di un frammento di corpo estraneo di natura vegetale;
- nel caso 3 la lesione era secondaria alla presenza di un focolaio di enterite necrotizzante trasmurale.

Nei restanti tre casi la diagnosi è stata eseguita mediante osservazione diretta durante la procedura chirurgica:

- nel caso 1 durante la chirurgia per la risoluzione di dilatazione/volvolo gastrico associata a torsione splenica sono state visualizzate le arterie gastriche brevi trombizzate;
- nel caso 4 le arterie digiunali avevano subito un danno di natura iatrogena durante un intervento di enterectomia per perforazione di una massa digiunale neoplastica (linfoma) ed asportazione dei linfonodi digiunali infiltrati;
- nel caso 5 è stata evidenziata una perforazione colica durante una laparotomia esplorativa, causata accidentalmente durante il tentativo di risoluzione manuale della costipazione del paziente.

Tre dei cinque casi (il caso 1, 3 e 5) sottoposti ad intervento chirurgico per la risoluzione dell'ischemia sono sopravvissuti; per gli altri due soggetti si è proceduto con l'eutanasia per il peggioramento della sintomatologia clinica (soggetto n° 3) o per il mancato consenso dei proprietari alle procedure chirurgiche (soggetto n° 4).

Rilievi ecografici

L'esame **ecografico bidimensionale** ha rilevato:

- lesione focale caratterizzata da un ispessimento parietale ipoecogeno in tutti i 5 pazienti. In particolare, nel caso 1 è stato osservato uno

stomaco diffusamente ispessito con un ispessimento maggiore a livello della lesione esaminata (pari a circa 1,6 cm) che si estendeva per 4 cm. Nei restanti casi, le lesioni a livello intestinale differivano sia per spessore sia per estensione; lo spessore infatti variava da 5 a 7 mm con una mediana di 6,2, mentre l'estensione variava da 1,4 a 4 cm con una mediana di 2,2. Inoltre, in tre casi l'ispessimento era asimmetrico (**Figura 1**) mentre in altri due pazienti la lesione intestinale si presentava circonferenziale e simmetrica (**Figura 2**);

- scomparsa della normale stratigrafia di parete nel punto della lesione in tutti i pazienti;
- lieve distensione del segmento gastrointestinale coinvolto dalla lesione con presenza di contenuto misto fluido e gassoso associata a peristalsi ridotta ed inefficace, in 4 casi su 5;
- peritoneo ispessito ed iperecogeno in prossimità della lesione in tutti i soggetti associato in un caso ad un ispessimento diffuso del mesentere. In tutti i casi era inoltre presente un lieve versamento addominale associato, in tre soggetti, a pneumoperitoneo;
- in 3 pazienti erano presenti alcune aree puntiformi iperecogene accompagnate da riverbero intraparietale, compatibile con la presenza di gas intramurale;
- ulteriori reperti evidenziati: enteropatia diffusa (in 4 casi), epatopatia diffusa (in 1 caso), nefropatia bilaterale compatibile con patologia renale cronica (in 1 caso), assenza della milza dovuta al precedente exeresi chirurgica (in 1 caso), anastomosi digiunale latero-laterale in seguito ad enterectomia (in 1 caso).



Figura 1: Scansione trasversale di un'ansa digiunale di un gatto Europeo di 13 anni (Caso 3). Si osserva un ispessimento parietale asimmetrico, ipoecogeno con totale perdita della normale stratigrafia (freccia). Tale lesione era secondaria ad enterite necrotizzante, diagnosticata all'esame istologico (*Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie*).



Figura 2: Scansione trasversale del colon discendente di un gatto Europeo di 1 anno (Caso 5). Si osserva un ispessimento focale circonferenziale simmetrico della parete con perdita della normale stratigrafia di parete. (*Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie*).

Le caratteristiche ecografiche bidimensionali delle lesioni gastrointestinali rilevate nei 5 soggetti sono state riassunte nella **Tabella 2**.

| CASO | LOCALIZZAZIONE | STRATIGRAFIA | ECOGENICITÀ | SPESSORE LESIONE |
|------|---------------------|--------------|--|--|
| 1 | Fondo gastrico | Assente | Ipoecogena | Ispessimento focale (1,6 cm) che si estende per 4,5 cm su uno stomaco diffusamente ispessito (spessore 9 mm) |
| 2 | Duodeno discendente | Assente | Ipoecogena con presenza di spot iperecogeni accompagnati da riverbero intraparietale | Ispessimento focale asimmetrico (6 mm) che si estende per 1,4 cm |
| 3 | Digiuno | Assente | Ipoecogena | Ispessimento focale asimmetrico (6,4 mm) che si estende per 1,4 cm |
| 4 | Digiuno | Assente | Ipoecogena con presenza di spot iperecogeni accompagnati da riverbero intraparietale | Ispessimento circonferenziale simmetrico (5 mm) che si estende per 3 cm |
| 5 | Colon discendente | Assente | Ipoecogena con presenza di spot iperecogeni accompagnati da riverbero intraparietale | Ispessimento circonferenziale simmetrico (7 mm) che si estende per 4 cm |

Tabella 2: Tabella riassuntiva delle caratteristiche ecografiche delle lesioni rilevate all'ecografia bidimensionale.

In 4 casi (caso 2, 3, 4 e 5) **all'esame color Doppler** il segnale vascolare è risultato assente a livello della parete lesionata, ma anche a livello della parete delle anse circostanti non coinvolte dall'alterazione; si rilevava segnale vascolare solo a livello delle arterie digiunali. Nel caso 1 il segnale vascolare della porzione gastrica con maggiore ispessimento era assente, mentre nelle porzioni adiacenti la vascolarizzazione risultava essere soggettivamente aumentata.

All'esame contrastografico, la modalità di presa di contrasto si presentava diversa a seconda della lesione gastrointestinale esaminata:

- lesione gastrica: la presa di contrasto si presentava soggettivamente ridotta in corrispondenza della lesione con alcuni vasi intralesionali, mentre le restanti porzioni dello stomaco si presentano adeguatamente vascolarizzate (**Figura 3**);
- lesione duodenale: l'assenza della presa di contrasto è evidente esclusivamente nel punto della lesione ischemico-ulcerata, mentre la restante porzione di parete presenta un *enhancement* adeguato (**Figura 4**);
- lesioni digiunali: l'*enhancement* a livello di entrambe le lesioni è risultato assente, mentre le anse circostanti presentano una presa di contrasto adeguata (**Figura 5 e 6**);
- lesione colica: la porzione più interna della parete lesionata risultata essere vascolarizzata, mentre le porzioni più esterne presentavano una mancata presa di contrasto (**Figura 7**).

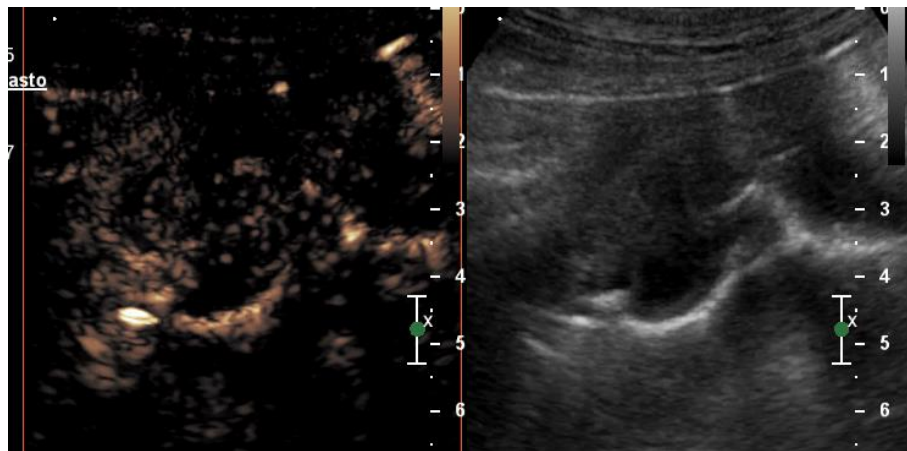


Figura 3: Scansione CEUS (a sinistra) ed ecografica bidimensionale (a destra) della lesione a livello del fondo gastrico in un San Bernardo di 2 anni (Caso 1). All'esame CEUS si osserva una riduzione disomogenea della presa di contrasto compatibile con una alterata perfusione della parete gastrica. (Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

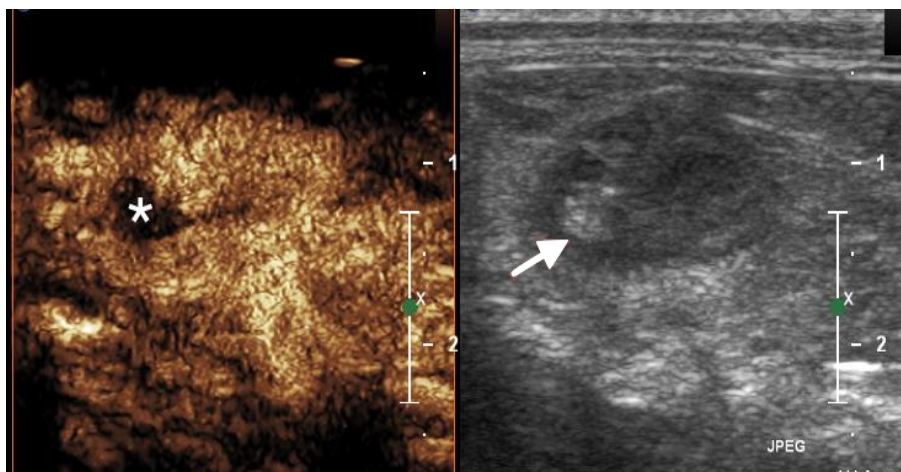


Figura 4: Scansione CEUS (a sinistra) ed ecografica bidimensionale (a destra) della lesione del duodeno discendente, in un gatto Europeo di 6 anni (Caso 2). All'esame CEUS si osserva un'adeguata presa di contrasto a livello parietale ad eccezione del punto in cui è presente la lesione ulcerata (asterisco). Tale lesione è visibile anche nell'immagine bidimensionale (freccia), dove si osserva un'area caratterizzata dalla presenza di aree puntiformi iperecogene accompagnate dalla presenza di artefatto da riverbero, legati alla presenza di aria intraparietale. La lesione ischemica è stata associata, dopo esame istologico, alla presenza di un focolaio di necrosi colliquativa. (Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

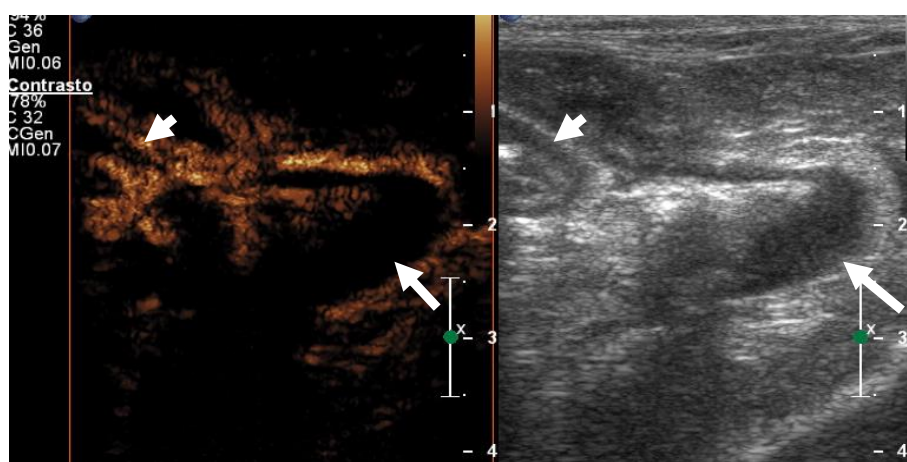


Figura 5: Scansione CEUS (a sinistra) e bidimensionale (a destra) di un'ansa digiunale ischemica, secondaria ad enterite necrotizzante, in un gatto Europeo di 13 anni (Caso 3). Nell'immagine bidimensionale si osserva la presenza di un ispessimento focale, asimmetrico, ipoecogeno con perdita della normale stratigrafia che, all'esame CEUS risulta avascolare (freccia bianca). Inoltre nella stessa scansione si evidenzia un'ansa digiunale adiacente con aspetto ecografico nella norma e con adeguata presa di contrasto all' esame CEUS (punta di freccia bianca). (Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

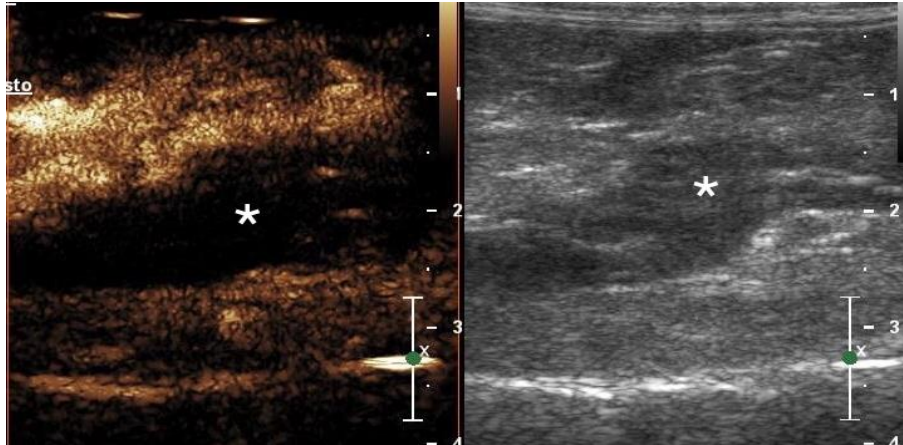


Figura 6: Scansioni ecografiche con metodica CEUS (a sinistra) e bidimensionale (a destra) di un'ansa digiunale ischemica, secondaria a danno iatrogeno a carico delle arterie digiunali, in un gatto Europeo di 11 anni (Caso 4). Nella scansione bidimensionale si osserva una lesione del digiuno caratterizzata da un ispessimento simmetrico ipoecogeno con perdita della normale stratigrafia (asterisco). La medesima lesione, all'esame CEUS presenta un totale assenza di *enhancement*. (Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

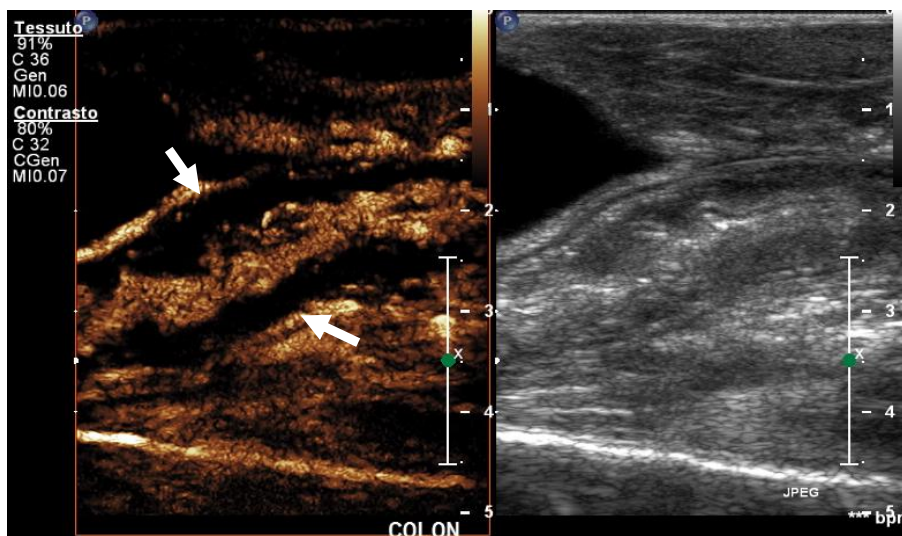


Figura 7: Scansioni ecografiche della lesione del colon discendente con metodica CEUS (a sinistra) e bidimensionale (a destra), in un gatto Europeo di 1 anno (Caso 5). All' esame CEUS si rileva un *enhancement* negli strati più interni della parete con mancata presa di contrasto nelle porzioni più esterne (freccie bianche piene). La lesione era secondaria a un danno ischemico con perforazione avvenuta durante il tentativo di risoluzione manuale di una costipazione. (Archivio ecografico del Servizio di Diagnostica per Immagini - Dipartimento Scienze Mediche Veterinarie).

Le caratteristiche ecocontrastografiche delle lesioni gastrointestinali rilevate nei 5 soggetti sono state riassunte nella **Tabella 3**.

| CASO | CEUS LESIONE | CEUS PARETI CIRCOSTANTI |
|-------------|---|---|
| 1 | Vascolarizzazione notevolmente ridotta, con presenza di alcuni vasi intralesionali | Vascolarizzazione normale |
| 2 | <i>Enhancement</i> assente solo dov'è presente la lesione | Vascolarizzazione normale nella restante parte della parete |
| 3 | <i>Enhancement</i> assente | Vascolarizzazione normale delle anse circostanti |
| 4 | <i>Enhancement</i> assente | Vascolarizzazione normale delle anse circostanti |
| 5 | Presenza di vascolarizzazione a livello della porzione più interna della parete, con assenza di <i>enhancement</i> , nella porzione più esterna | Vascolarizzazione normale delle anse circostanti |

Tabella 3: Tabella riassuntiva con i rilievi riscontrati all'esame CEUS per ogni caso esaminato.

DISCUSSIONE

L'ischemia intestinale è una patologia potenzialmente fatale caratterizzata da una progressione molto rapida e pertanto rappresenta una sfida dal punto di vista diagnostico. Una diagnosi tempestiva di ischemia dell'apparato gastroenterico è essenziale per intraprendere l'approccio terapeutico (medico o chirurgico) più adeguato (Giannetti *et al.*, 2010).

La letteratura veterinaria per questa patologia risulta abbastanza carente, sia dal punto di vista clinico sia per gli aspetti ecografici. La casistica del nostro studio è composta prevalentemente da gatti (4/5 soggetti) anche se in letteratura, non esistono studi riguardanti la predisposizione di specie nei confronti di questa patologia.

In merito alla sintomatologia, questa patologia è caratterizzata da sintomi estremamente variabili ed aspecifici, quali addome acuto e vomito (Wallack *et al.*, 2003). Questo risulta in linea con quanto osservato nel nostro studio dove tutti i pazienti presentavano segni clinici variabili aspecifici, quali letargia (5/5), anoressia (4/5), dolore addominale (2/5), vomito (2/5), ipertermia (1/5) e ipotermia (1/5).

L'angioTC rappresenta la metodica di *imaging* d'elezione per la diagnosi di ischemia gastrointestinale (Kanzaki *et al.*, 2012) ma questa metodica non è sempre disponibile nella pratica clinica veterinaria. Inoltre in TC il paziente viene esposto alle radiazioni ionizzanti ed i mezzi di contrasto utilizzati sono nefrotossici e possono pertanto causare complicanze come l'insufficienza renale acuta (Hata *et al.*, 2005; Kanzaki *et al.*, 2012) . In Medicina Umana, ma anche in Medicina Veterinaria (Wallack *et al.*, 2003), si è provato a proporre l'utilizzo dell'ecografia come strumento non invasivo nella diagnosi di ischemia, ma i rilievi ecografici in corso di tale patologia risultano tuttavia estremamente aspecifici e in parte sovrapponibili con quelli che si incontrano negli stati infiammatori o neoplastici (Hata *et al.*, 2005;

Kanzaki *et al.*, 2012). I rilievi ecografici evidenziati nel nostro studio all'esame bidimensionale risultano in accordo con quelli riportati in letteratura veterinaria, per quanto riguarda le lesioni di natura ischemica (Wallack *et al.*, 2003). Infatti, tutte le lesioni dei nostri casi erano caratterizzate da un ispessimento parietale focale, ipoecogeno con perdita della normale stratigrafia di parete. Le altre caratteristiche ecografiche che sono state rilevate in tutti i nostri pazienti, come la dilatazione del segmento gastroenterico lesionato con accumulo di contenuto misto fluido e gassoso, l'ispessimento e l'iperecogenicità del peritoneo in prossimità della lesione, la presenza di versamento addominale, possono essere associate alle lesioni ischemiche, ma anche a patologie infiammatorie e neoplastiche (Wallack *et al.*, 2003; Penninck *and* D'Anjou, 2015).

In tutti i casi, il segnale vascolare della parete ischemica e di quella delle anse circostanti normali, indagato mediante color Doppler, è risultato assente. Questo rilievo, analogamente a quanto osservato in Medicina Umana, può essere spiegato dal fatto che la velocità di flusso a livello parietale e quindi la potenza del segnale risultano al di sotto della capacità di ricezione della metodica color Doppler (Hata *et al.* 2005; Hamada *et al.*, 2007; Kanzaki *et al.*, 2012).

I rilievi ottenuti dalla metodica CEUS, stante la mancanza di studi specifici in Medicina Veterinaria, sono stati comparati con quelli presenti in Medicina Umana per quanto concerne le lesioni parietali gastrointestinali ischemiche (Hata *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2007; Giantetti *et al.*, 2010). In accordo con questi, anche nel nostro studio la CEUS ha apportato maggiori informazioni rispetto all'esame ecografico di base. Infatti la completa assenza di *enhancement* a livello della lesione parietale è stata evidenziata nel caso 2 e 3 dove da un punto di vista istologico è stato riscontrato un danno ischemico con necrosi di tutto lo spessore parietale coinvolto. La completa assenza di segnale vascolare è stato anche evidenziato nel caso 4 dove la vascolarizzazione della parete è stata danneggiata accidentalmente con la resezione dei vasi digiunali durante una

chirurgia complicata. Nel caso 1 la lesione gastrica presentava una marcata riduzione dell'*enhancement* e questo può essere spiegato dalla trombosi solo parziale delle arterie gastriche brevi. Mentre un discorso a parte va fatto per il caso 5, dove la presa di contrasto dell'alterazione colica risulta particolare, infatti l'*enhancement* è presente nella porzione più interna della parete, mentre è assente nella porzione più esterna. Questo comportamento può essere spiegato da un caso molto simile che è stato riportato in umana, dove a livello di un'ansa digiunale, a seguito dell'inoculazione del mezzo di contrasto, solo la porzione più esterna della parete mostrava una presa di contrasto (Giannetti *et al.*, 2010). L'esame istologico di tale porzione della parete digiunale, evidenziava un'ulcerazione della mucosa, un'ectasia vascolare a livello di sottomucosa e uno stravasamento emorragico nello strato sieroso (Giannetti *et al.*, 2010).

È da segnalare che in Medicina Umana, in alcuni casi i rilievi riscontrati con la metodica CEUS differiscono rispetto a quelli osservati mediante l'angioTC. Questa discrepanza può essere principalmente legata alle diverse caratteristiche dei mezzi di contrasto utilizzati nelle due metodiche: in particolare quello utilizzato nella TC tende ad uscire dal letto vascolare abbastanza facilmente rispetto ad un mezzo di contrasto ecografico di seconda generazione che rimane all'interno dei vasi ematici senza stravasare (Hamada *et al.*, 2007). Questa specifica caratteristica dei mezzi di contrasto ecografici di seconda generazione permette di effettuare una valutazione più accurata della microcircolazione attraverso la metodica CEUS.

L'accuratezza della CEUS nella diagnosi di ischemia gastrointestinale è stata valutata da diversi studi in Medicina Umana. In particolare lo studio di Kanzaki *et al.* del 2012, ha evidenziato una sensibilità e una specificità rispettivamente del 100% e del 98% nell'identificazione di una lesione ischemica. Nel nostro studio, seppur con un basso numero di casi, i rilievi ecografici CEUS hanno permesso di avanzare una diagnosi ecografica di lesione ischemica confermata successivamente mediante osservazione chirurgica diretta o esame istologico in tutti e 5 i pazienti. Grazie alla precoce

diagnosi di danno perfusivo della parete gastroenterica e al conseguente tempestivo approccio chirurgico, tre pazienti dei 5 inclusi nello studio sono sopravvissuti. Mentre nei restanti due casi (casi 3 e 4) si è proceduto all'eutanasia per un peggioramento clinico delle condizioni dopo la diagnosi e per il mancato consenso da parte dei proprietari ad intervento chirurgico.

Questo studio presenta alcuni limiti. Il primo è rappresentato da una casistica ridotta anche se questo aspetto può essere correlato alla bassissima incidenza della patologia stessa nella pratica clinica dei piccoli animali (Fossum, 2013). Un altro limite è dato dal fatto che la valutazione CEUS è stata esclusivamente di tipo qualitativa e pertanto, nei casi in cui l'*enhancement* si presentava ridotto o presente solo in alcuni strati, l'analisi potrebbe essere stata influenzata dall'esperienza dell'operatore.

In conclusione, la casistica presente in questo studio ha permesso di dimostrare l'applicabilità della metodica CEUS per la diagnosi delle ischemie gastroenteriche nei piccoli animali. Inoltre ha posto le basi per eseguire uno studio che comprenda una popolazione più ampia per valutare in maniera adeguata l'accuratezza della CEUS come strumento per la diagnosi non invasiva e rapida di un danno della perfusione parietale dell'apparato gastroenterico.

BIBLIOGRAFIA

Brower C. J., Jiménez D. A., Shaema A., Howerth E. W., Radlinsky M. A. (2016). Contrast-enhanced ultrasonographic evaluation of small intestinal viability in dogs with obstructive foreign material. Proceedings of the Annual ACVR Conference. October 7 to 10, Minneapolis, Minnesota. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 85.

Diana A., Specchi S., Baron Toaldo M., Chiocchetti R., Laghi A., Cipone M. (2011). Contrast enhanced ultrasonography of the small bowel in healthy cats. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 52: 555-559.

Fossum T.W (2013). Surgery of the Digestive System. In: Fossum, T. W. Small Animal Surgery, 3^o ed. Elsevier Health Sciences, 339-659.

Giannetti A., Biscontri M., Randisi P., Cortese B., Minacci C., Stumpo M. (2010). Contrast-enhanced sonography in the diagnosis of acute mesenteric ischemia: case report. *Journal of Critical Ultrasound*, 38: 156-160.

Gore R. M., Thakrar K. H., Mehta U. K., Berlin J., Yaghmai V., Newmark G. M. (2008) Imaging in intestinal ischemic disorders. *Clinical Gastroenterology Hepatology*, 6: 849-858

Hamada T., Yamauchi M., Tanaka M., Hashimoto Y., Nakai K., Suenaga K. (2007). Prospective evaluation of contrast-enhanced ultrasonography with advanced dynamic flow for the diagnosis of intestinal ischaemia. *The British Journal of Radiology*, 80: 603-608.

Hata J., Kamada T., Haruma K., Kusunoki H. (2005). Evaluation of bowel ischemia with contrast-enhanced US: initial experience. *Radiology*, 236: 712-715.

Jimenez D. A., O'Brien R. T., Wallace J. D., Klocke E. (2011). Intraoperative contrast-enhanced ultrasonography of normal canine jejunum. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 52: 196-200.

Johnson-Neitman J. L., O'Brien R. T., Wallace J. D. (2012). Quantitative perfusion analysis of the pancreas and duodenum in healthy dogs by use of contrast-enhanced ultrasonography. *Journal of Veterinary Research*, 73: 385-392.

Kanzaki T., Hata J., Imamura H., Manabe N., Okei K., Kusunoki H., Kamada T., Shiotani A., Haruma K. (2012). Contrast-enhanced ultrasonography with Sonazoid for the evaluation of bowel ischemia. *Journal of Medical Ultrasonics*, 39: 161-167.

Leinonen M. R., Raekallio M. R., Vainio O. M., Ruohoniemi M. O., Biller D. S., O'Brien R. T. (2010). Quantitative contrast-enhanced ultrasonographic analysis of perfusion in the kidneys, liver, pancreas, small intestine, and mesenteric lymph nodes in healthy cats. *American Journal of Veterinary Research*, 71: 1305-1311.

Linta N., Baron Toaldo M., Cordella A., Pey P., Quinci M., Cipone M., Diana A. (2016). Contrast-enhanced ultrasound feature of gastrointestinal ischemia in dogs and cats: a case series. Proceedings of the 20th EVDI Annual Conference. August 31 to September 3, Wroclaw, Poland. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 57: 663-664;

Mizushige K., Ueda T., Yuba M., Seki M., Ohmori K., Nozaki S., Matsuo H. (1999). Dependence of power Doppler image on high pass filter instrumented in ultrasound machine. *Ultrasound in Medicine and Biology* 25: 1389- 1393;

Nisa K., Lim S.Y., Shinohara M., Nagata N., Sasaoka K., Dermlim A., Leela-Arpon R., Morita T., Yokoyama N., Osuga T., Sasaki N., Morishita K., Nakamura K., Ohta H., Takiguchi M. (2017). Repeatability and reproducibility of quantitative contrast enhanced ultrasonography for assessing duodenal perfusion in healthy dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 17: 1585-1590.

Penninck D., D'Anjou M. (2015). Gastrointestinal tract. In: Penninck D., D'Anjou M. *Atlas of small animal ultrasonography*. Ames, 2^o ed. Wiley Blackwell, 259-308.

Reginelli A., Genovese E. A, Cappabianca S., Iacobellis F., Berritto D., Fonio P., Coppolino F., Grassi R. (2013). Intestinal ischemia: US-CT findings correlations. *Critical Ultrasound Journal*, 5: 1-7.

Robotti D., Cammarota T., Debani P., Sarno A., Astegiano M. (2004). Activity of Crohn disease: value of color power-Doppler and contrast-enhanced ultrasonography. *Abdominal Imaging* 29: 648-652.

Van den Heijkant T. C., Aerts B. A., Teijnk J. A., Buurman W. A., Luyer M. D. (2013). Challenges in diagnosing mesenteric ischemia. *World Journal of Gastroenterology* 19: 1338-1341.

Wallack S. T., Hornof W. J., Herrgesell E. J. (2003). Ultrasonographic diagnosis-small bowel infarction in a cat. *Veterinary Radiology and Ultrasound*, 44: 81-85.

Winter D. M., Londono L. (2014). Ultrasonographic evaluation of relative gastrointestinal layer thickness in cats without clinical evidence of gastrointestinal tract disease. *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16: 118-124.