



***Università degli studi di Messina***  
***Dipartimento di Scienze Veterinarie***

*SSD VET/08*

PhD in Scienze Veterinarie

*Coordinatore: Prof. Rosalba Laurà*

“Utilizzo dell’ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) nella valutazione della perfusione renale in cani affetti da Leishmaniosi”

**DOTTORANDA**

Dott.ssa Alessia Vitali

*Alessia Vitali*

**RELATORE**

Chiar.mo Prof. Massimo De Majo

*Massimo De Majo*

# Indice

## ABBREVIAZIONI

## ABSTRACT

### **Prima parte: Leishmaniosi canina e insufficienza renale**

#### 1 Leishmaniosi canina

---

- Etiologia
  - Patogenesi e segni clinici
  - Diagnosi e stadiazione
- 

#### 2 Insufficienza renale cronica

---

- Eziopatogenesi
  - Fisiopatologia
  - Manifestazioni cliniche
  - Diagnosi
- 
- Reperti di laboratorio
- 
- Diagnostica per immagini
  - Biopsia renale
- Stadiazione
- 

### **Seconda parte: l'ecografia con mezzo di contrasto e la perfusione renale**

#### 3 L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS)

---

- Meccanismo d'azione
  - Metodica d'esecuzione
  - Metodologia di analisi
  - Applicazioni cliniche
- 
-

4 L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS) applicata allo studio della perfusione renale

**Terza parte: Valutazione della perfusione renale tramite mezzo di contrasto (CEUS) in cani affetti da Leishmaniosi**

5 Lo studio clinico

6 I risultati

7 Discussione e Conclusione

**BIBLIOGRAFIA**

---

## **ABBREVIAZIONI**

AUC-Area Under Curve

AS-Ascending Slope

AT-Arrival Time

BI-Base Intensity

CECT-Contrast-Enhanced Computed Tomography

CEUS-Contrast-Enhanced Ultrasound

DS-Descending Slope

DT/2-Time from Peak to One-half

EFSUMB -European Federation of Societies for Ultrasound in Medicine and Biology

GOF -Goodness of Fit

MDC- Mezzo di Contrasto

IM-Indice Meccanico

RM- Risonanza Magnetica

MTT Mean Time Transit

IRC- InsufficienzaRenaleCronica

IRIS- International Renal Interest Society

PCR- Polymerase Chain Reaction

PI -Peak Intensity

RI- Resistivity Index

ROI -Region of Interest

SDMA- Dimetilarginina Simmetrica

TC-Tomografia Computerizzata

TIC- Time Intensity Curve

TTP -Time to Peak

UPCR- Urine Protein: Creatinine Ratio

VFG-Velocità di Filtrazione Glomerulare

---

## ABSTRACT

L'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS-Contrast Enhanced Ultrasound) è una particolare tecnica ecografica che consente di studiare la micro-vascolarizzazione degli organi o tessuti presi in esame. In medicina umana e in veterinaria questa metodica è utilizzata per valutare la morfologia degli organi, la loro perfusione ed eventuali lesioni patologiche (Liu et al., 2018; Lee et al., 2017; Garessus et al., 2021; Han et al., 2021).

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare, utilizzando la metodica CEUS, le alterazioni della perfusione renale in cani affetti da Leishmaniosi.

Sono stati analizzati 16 soggetti, di cui 15 erano positivi per *L. infantum* e uno era negativo. Per ogni paziente è stata effettuata la stadiazione clinica della Leishmaniosi e dell'insufficienza renale cronica, rispettivamente secondo le linee guida LeishVet e IRIS (International Renal Interest Society- 2019).

Lo studio della perfusione renale ha previsto l'esecuzione di un esame ecografico in B-mode, Doppler e CEUS, utilizzando il SonoVue® come mezzo di contrasto. È stata dunque effettuata un'analisi qualitativa e un'analisi quantitativa dei risultati utilizzando un software interno all'ecografo che consente elaborazione delle immagini contrastografiche. I dati ottenuti sono stati sottoposti ad una valutazione statistica e messi in relazione allo stato clinico del paziente.

Le immagini ecografiche non hanno evidenziato alterazioni ecografiche del parenchima renale cortico-midollare e della sua vascolarizzazione, visualizzata mediante la tecnica Color-Doppler.

L'analisi qualitativa della CEUS ha permesso di valutare l'enhancement della corticale e della midollare, evidenziando come quest'ultima fosse invariabilmente successiva rispetto alla prima in ogni soggetto analizzato.

L'analisi statistica relativa alla valutazione qualitativa della perfusione renale ha inoltre permesso di evidenziare come i tempi di raggiungimento del picco di enhancement (TTP), di velocità di ingresso (AS) e di uscita (DT/2) fossero più elevati nei soggetti leishmaniotici, di qualsiasi stadio clinico, rispetto al soggetto non infetto. Il picco di enhancement (PI) e l'area sotto la curva (AUC) erano invece maggiori nei soggetti in stadio 1 e 2, rispetto al controllo.

---

L'analisi dei risultati ha inoltre permesso di evidenziare che non erano presenti significative differenze dei parametri di perfusione della corticale e della midollare tra i soggetti in stadio IRIS 0 e 1.

I risultati ottenuti in questo studio, in accordo con i dati presenti in letteratura, hanno permesso di evidenziare come le alterazioni dei parametri di perfusionali possano essere utilizzati come indice di valutazione della micro-vascolarizzazione renale e dunque della funzionalità d'organo.

I dati ottenuti, inoltre, mostrano che la variazione di tali parametri risulta essere antecedente rispetto all'incremento e alla variazione degli indicatori emato-biochimici di danno renale cronico.

In virtù di tali considerazioni è possibile affermare che la metodica CEUS sia una tecnica diagnostica particolarmente utile nella diagnosi precoce di danno renale e, dunque, nella valutazione e nella gestione terapeutica dei pazienti affetti da insufficienza renale cronica.

---

# **Prima parte: Leishmaniosi canina e insufficienza renale**

## **1 Leishmaniosi canina**

### **Eziologia**

La leishmaniosi è una patologia sistemica provocata da protozoi, parassiti appartenenti alla specie *Leishmania infantum*. La loro trasmissione è mediata da insetti ematofagi del genere *Phlebotomus* che fungono da vettore (Solano-Gallego et al., 2009; Pennisi et al., 2015).

Altre vie di trasmissione riportate, oltre a quella vettoriale, sono la trasmissione transplacentare, venerea e la trasmissione conseguente trasfusione di sangue infetto (Solano-Gallego et al., 2011).

Questa zoonosi risulta essere molto diffusa in tutto il mondo. Sono stati isolati diversi ceppi di *Leishmania spp.* in Europa, America, Asia e Africa. In Europa risulta particolarmente diffusa nelle aree del bacino Mediterraneo, in Medio Oriente, nel centro e nel sud-est Asiatico, nel nord-ovest della Cina e in Africa Settentrionale. Nel territorio italiano la sua diffusione si estende soprattutto nelle regioni centro-meridionale. Nell'ambito della sua diffusione il cane sembra avere un ruolo molto importante, in quanto funge da serbatoio per gli amastigoti (Paltrinieri et al., 2010; Pennisi et al., 2015).

### **Patogenesi e segni clinici**

La leishmaniosi canina è caratterizzata da manifestazioni cliniche molto varie. Quelle riscontrate con maggior frequenza sono: linfadenomegalia generalizzata, letargia, perdita di peso, anoressia, lesioni oculari, splenomegalia, dermatite, epistassi, artropatia, onicogrifosi, vomito, diarrea e insufficienza renale cronica (tabella 1).

---

MANIFESTAZIONI CLINICHE	
<i>Generali</i>	
	<p>Linfoadenomegalia generalizzata</p> <p>Perdita di peso</p> <p>Aumento o riduzione dell'appetito</p> <p>Letargia</p> <p>Pallore delle mucose</p> <p>Splenomegalia</p> <p>Poliuria e polidipsia</p> <p>Febbre</p> <p>Vomito</p> <p>Diarrea</p>
<i>Cutanei</i>	
	<p>Dermatite esfoliativa non pruriginosa con o senza alopecia</p> <p>Dermatite erosiva-ulcerativa</p> <p>Dermatite nodulare</p> <p>Dermatite papulare</p> <p>Dermatite pustolosa</p> <p>Onicogrifosi</p>
<i>Oculari</i>	
	<p>Blefariti (ulcerative, esfoliative o nodulari), congiuntiviti (nodulari)</p> <p>Cheratocongiuntivite, generalmente secca</p> <p>Uveite anteriore/endoftalmitide</p>
<i>Altri</i>	
	<p>Ulcere mucosali o muco cutanee o lesioni nodulari (orali, congiuntivali e nasali)</p> <p>Epistassi</p> <p>Zoppia</p> <p>Atrofia dei muscoli masticatori</p> <p>Disordini vascolari (vasculiti sistemiche, tromboembolismo arterioso)</p> <p>Alterazioni neurologiche</p>

**Tabella 1.** Principali manifestazioni cliniche rilevate nei cani affetti da *L. infantum*. (Solano-Gallego et al., 2009)



La patogenesi dei sintomi clinici è riconducibile sia all'azione diretta del protozoo, che determina la distruzione delle cellule reticolo-endoteliali e la formazione di infiltrati granulomatosi, sia alla risposta immunitaria indotta dal parassita. Già dalle prime fasi del contagio il sistema immunitario dell'ospite reagisce alla presenza del patogeno attivando una risposta di tipo cellulo-mediata (Th2) o una risposta di tipo anticorpale (Th1). Nel caso in cui la risposta immunitaria preponderante sia di tipo Th1 l'organismo del soggetto infetto genera autoanticorpi diretti contro bersagli *self* e di immunocomplessi circolanti, formati da antigeni e frazioni del complemento. Con il progredire dell'infezione il numero di questi immunocomplessi circolanti tende ad aumentare e questi, una volta formati, si depositano a livello tissutale (Koutinas et al., 2014). Questo meccanismo patogenetico risulta essere alla base della patogenesi di diverse manifestazioni cliniche e del danno tubulare e glomerulare che determinerà l'insorgere dell'insufficienza renale (Paltrinieri et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2011; Esch et al., 2013).

La deposizione degli immunocomplessi a livello glomerulare genera infatti lo sviluppo di una condizione infiammatoria che, causando l'attivazione del sistema immunitario, estende la flogosi anche a livello del comparto tubulointerstiziale. A questo punto si innescano dei meccanismi patogenetici che provocheranno delle lesioni morfologiche e strutturali, caratterizzate da sclerosi e formazione di tessuto cicatriziale. Le alterazioni del parenchima renale causano una progressiva riduzione della perfusione renale. Questi eventi determinano una graduale riduzione della funzionalità e, dunque, in una progressiva e irreversibile insufficienza d'organo (Wilson et al., 2017). Il danno renale è il segno clinico più grave, generalmente insorge nella fase avanzata della malattia e rappresenta la principale causa di mortalità dei soggetti affetti da leishmaniosi (Solano-Gallego et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2011; Geisweid et al., 2012; Roura et al., 2021).

Come detto in precedenza, la sintomatologia clinica è molto varia e può manifestarsi in forma più o meno grave. Anche le alterazioni emato-biochimiche possono avere un'entità variabile. Nei soggetti che sviluppano la malattia renale è frequente il riscontro di una proteinuria persistente (con UPCR > 0.5) che, nelle fasi più avanzate, si associa anche a iperazotemia, anemia arigenativa e aumento della pressione arteriosa sistemica. Le più comuni alterazioni ematobiochimiche sono riportate in tabella 2 (Paltrinieri et al., 2010; Solano-Gallego et al., 2011; Roura et al., 2020).

---

ALTERAZIONI EMATOBIOCHIMICHE	
<i>Emocromo</i>	
	Lieve o moderata anemia arigenerativa Leucocitosi o leucopenia Trombocitopatia Trombocitopenia Alterazioni secondarie dell'emostasi e fibrinolisi
<i>Biochimico/ Urine</i>	
	Moderata o grave proteinuria Iperazotemia Aumento delle transaminasi
<i>Proteine sieriche ed elettroforesi</i>	
	Iperglobulinemia policlonale beta e/o ipergammaglobulinemia Ipoalbuminemia Riduzione del rapporto albumina/ globuline

**Tabella 2.** Principali alterazioni ematobiochimiche e urinarie in cani affetti da *L. infantum* (Solano-Gallego et al., 2009)

## Diagnosi e stadiazione

La diagnosi della leishmaniosi viene emessa sulla base della visita clinica, della sintomatologia riportata dal soggetto e delle alterazioni riscontrate nei reperti di laboratorio. È possibile, inoltre, effettuare test diagnostici diretti (citologia, biopsia tissutale, immoistochimica e PCR), utili a identificare il parassita a livello dei tessuti, e indiretti (test sierologici qualitativi e quantitativi), utilizzati per rilevare la presenza di anticorpi nel sangue (Solano-Gallego et al., 2011).

TECNICA DIAGNOSTICA	VANTAGGI	SVANTAGGI
<i>Sierologia</i>	<p>-Determinazione dei livelli di anticorpi circolanti.</p> <p>Essenziale per la diagnosi e per la prognosi</p>	<p>-Non conferma l'attuale presenza del parassita</p> <p>- Possibile cross reattività con trypanosomi</p>
<i>Qualitativa</i>	<p>-Test rapido</p>	<p>-Fornisce soltanto indicazioni di positività o negatività</p> <p>-Sensibilità variabile con possibile rischio di ottenere falsi negativi</p> <p>- La positività del test deve essere seguita da una valutazione sierologica quantitativa</p>
<i>Quantitativa</i> (IFAT, ELISA)	<p>-Determinazione dei livelli di anticorpi presenti nel sangue.</p> <p>La presenza di elevati livelli di anticorpi, associati alla presenza di segni clinici e reperti clinico patologici tipici, permettono di emettere diagnosi conclusiva di leishmaniosi</p>	<p>-Precisione e performance del cut-off dipendono dal laboratorio</p> <p>-Differenti standardizzazioni delle tecniche di lavorazione tra i laboratori</p> <p>-Scarsa capacità di rilevare bassi livelli di anticorpi circolanti</p>
<i>Citologia/ Istopatologia</i>	<p>-Permette di identificare con precisione il parassita e il reperto patologico</p> <p>-Permette di escludere altre diagnosi differenziali</p> <p>-Rapida e non invasiva (Citologia)</p>	<p>-Bassa sensibilità nel rilievo di amastigoti di <i>Leishmania</i> nei tessuti, nel sangue e nei fluidi corporei.</p> <p>-quando il parassita non viene identificato necessità di ulteriori test diagnostici (immunoistochimica/PCR)</p> <p>-Non fornisce informazioni sulla condizione immunologica del soggetto</p> <p>-Necessità di personale esperto</p>

PCR	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Permette di identificare il DNA di <i>L. infantum</i></li> <li>-Alta sensibilità e specificità</li> <li>-Permette di quantificare la carica parassitaria (real time-PCR)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Possibili falsi positivi in caso di contaminazione</li> <li>-Differente standardizzazione della tecnica tra i laboratori</li> <li>-Non fornisce informazioni sulla condizione immunologica del soggetto</li> <li>-Non permette di confermare la diagnosi poiché la positività di questa tecnica conferma l'infezione da <i>Leishmania</i>, ma non la malattia</li> </ul>
Coltura parassitaria	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Permette di isolare il parassita</li> <li>-Facilita l'identificazione isoenzimatica del parassita</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Tecnica complessa</li> <li>-Può richiedere lunghi periodi di attesa per il raggiungimento dei risultati (un mese)</li> <li>-Necessità di laboratorispecializzati</li> </ul>

**Tabella 3.** Vantaggi e svantaggi delle comuni tecniche diagnostiche per la diagnosi di infezione da *L. infantum* nel cane (Solano-Gallego et al., 2009; Roura et al., 2020)

In relazione ai dati ottenuti dalla valutazione clinica e dalle analisi di laboratorio, i pazienti affetti da Leishmaniosi vengono classificati in cinque classi come indicato dalle linee guida LeishVet (<https://www.leishvet.org/fact-sheet/clinical-staging/>)(Tabella 4).

STADI	Sierologi	Segni clinici	Reperti di laboratorio	Prognosi
O	a			
STADI O I Patologia lieve	- Negativo - Bassa positività dei livelli	-Segni clinici lievi (linfadenomegalia periferica, dermatite papulare)	-Generalmente non si osservano alterazioni clinicopatologiche - Profilo renale nella norma. Creatinina < 1.4	Buona

	anticorpal i		mg/dl; Assenza di proteinuria (UPCR< 0.5)	
<i>STADI O II Patologia moderata</i>	Positività anticorpal e da bassa a elevata	-linfadenomegalia periferica - dermatite esfoliativa simmetrica o diffusa -dermatite ulcerativa -onicogrifosi -anoressia -epistassi -perdita di peso	Alterazioni clinicopatologiche come anemia, iperglobulinemia, ipoalbuminemia, sindrome da iperviscosità sierica SUBSTADIAZIONE: Profilo renale nella norma. Creatinina < 1.4 mg/dl; Assenza di proteinuria (UPCR< 0.5) Creatinina<1.4 gr/dL. UPCR: 0.5-1	Da buona a riservata
<i>STADI O III Patologia grave</i>	Positività anticorpal e da media a elevata	-Segni clinici dello stadio II -Segni clinici derivati dalla presenza di immunocomplessi: vasculiti, artriti, uveiti e glomerulonefriti	-Alterazioni clinicopatologiche dello stadio II -Insufficienza renale cronica (IRC), stadio IRIS 1 con UPCR> 1 o stadio IRIS II, creatinina 1.4-2 mg/dl)	Da riservata a infausta
<i>STADI O IV Patologia molto grave</i>	Positività anticorpal e da media a elevata	-Segni clinici dello stadio III -Tromboembolismo polmonare -Sindrome nefrosica -Grave insufficienza renale	-Alterazioni clinicopatologiche dello stadio II -Insufficienza renale cronica (IRC), stadio IRIS III creatinina 2-5 mg/dl. Stadio IRIS IV, creatinina >5 mg/dl). Sindrome nefrosica con UPCR>5	Infausta

**Tabella 4.** Classificazione dei soggetti affetti da *L. infantum* secondo le linee guida LeishVet (<https://www.leishvet.org/fact-sheet/clinical-staging/>)

Per effettuare una diagnosi eziologica e una caratterizzazione delle lesioni glomerulari è utile eseguire una biopsia renale e un esame istologico del tessuto. Le lesioni glomerulari primarie che si sviluppano in corso di processi patologici immuno-mediati possono essere classificate istologicamente come glomerulonefrite membranosa, glomerulonefrite membranoproliferativa, glomerulonefrite mesangioproliferativa e, più raramente, glomerulonefrite focale o segmentale. Nel cane, le lesioni glomerulari sono spesso associate a lesioni tubulointerstiziali di grado variabile (Zatelli et al., 2003; Wilson et al., 2017). Queste si evidenziano frequentemente nei soggetti affetti da *L. infantum* e determinano delle alterazioni strutturali e morfo-funzionali che possono essere messe in evidenza anche attraverso un esame ultrasonografico dell'addome. Come detto in precedenza, queste alterazioni sono associate alla presenza del patogeno e, di conseguenza, alla formazione degli immunocomplessi circolanti che determinano l'insorgenza di vasculiti e causano importanti modificazioni della vascolarizzazione dell'organo.

Per quanto concerne la malattia renale, l'indagine diagnostica e la stadiazione nei cani affetti da *Leishmania* dovrebbe includere la misurazione della creatinina sierica e dell'azotemia. È importante effettuare anche un esame chimico-fisico delle urine, del sedimento urinario e la misurazione del rapporto proteine creatinina urinaria (UPCR- Urine Protein: Creatinine Ratio). A seconda dei risultati ottenuti può essere utile valutare, inoltre, la misurazione della pressione arteriosa sistemica e la concentrazione sierica di SDMA (Dimetilarginina simmetrica), come indice di danno renale precoce. Sulla base dei risultati ottenuti da questi rilievi la malattia renale viene classificata (stadio I, II, III, IV) secondo lo schema di valutazione IRIS 2019 (International Renal Interest Society- 2019) (<http://www.iris-kidney.com>).

## **2 Insufficienza renale cronica**

L'insufficienza renale cronica è una sindrome che si manifesta quando entrambi i reni non sono più in grado di svolgere le loro funzioni regolatorie, escretorie ed endocrine, determinando così una ritenzione di sostanze azotate ed un'alterazione dell'equilibrio

idrico, elettrolitico ed acido-basico. Questa disfunzione si rende clinicamente evidente quando viene danneggiato più del 75% dei nefroni (Di Bartola et al., 2002).

L'insufficienza renale viene distinta in acuta (IRA) e cronica (IRC).

La prima è caratterizzata da un'insorgenza improvvisa ed è, a sua volta, classificata in prerenale (di natura funzionale, da deficit emodinamico), renale parenchimale intrinseca (organica, provocata da danno glomerulare, tubulare, interstiziale o vascolare) e postrenale (conseguente a ostruzione o a deviazione del flusso di urina). Se diagnosticata precocemente e trattata adeguatamente, l'IRA è potenzialmente reversibile; in caso contrario può determinare danni renali gravi e irreversibili o, nei casi più gravi, la morte del paziente (Cowgill et al., 2002).

L'insufficienza renale cronica (IRC o CRF – ChronicRenalFailure – o CKD– Chronic Kidney Disease) si manifesta come conseguenza di un danno renale acuto che persiste per un periodo prolungato, di solito mesi o anni. In corso di IRC le lesioni strutturali del rene risultano essere irreversibili, indipendentemente dalla causa che le ha provocate. Infatti, instauratasi la malattia di base a carico di una o più strutture del nefrone (glomerulo, tubulo, interstizio o componente vascolare) le funzioni del rene vanno progressivamente deteriorandosi, in un processo di autoperpetuazione che conduce allo stadio uremico terminale.

Nonostante la prognosi sfavorevole a lungo termine, le conseguenze cliniche della ridotta funzionalità renale che determinano lo stato uremico possono essere minimizzate adottando una terapia sintomatica e di supporto in grado di rallentare la progressione dell'IRC, permettendo così al paziente di sopravvivere per mesi o anni conservando una buona qualità di vita (Polzin et al., 1999).

## **Eziopatogenesi**

Le cause dell'insufficienza renale cronica possono essere distinte in congenite (da sospettare sulla base della razza, dell'anamnesi familiare e dell'età) ed acquisite, secondarie quindi ad un processo patologico che ha provocato un danno irreversibile ai glomeruli, ai tubuli, all'interstizio o che ha alterato la vascolarizzazione dell'organo determinando l'alterazione morfo-funzionali dell'intero nefrone. In questo caso il parenchima renale verrà quindi rimpiazzato da tessuto cicatriziale, provocando una progressiva perdita della funzionalità dell'organo stesso (Polzin et al., 2002).

---

In medicina umana e in medicina veterinaria, in particolare nel cane e nel gatto, sono stati individuati dei fattori di rischio per lo sviluppo di malattia renale cronica. Tali fattori possono essere classificati in fattori predisponenti e fattori scatenanti.

Tra i fattori predisponenti possono essere distinti in:

- età: il danno renale si manifesta principalmente in animali anziani. Lo sviluppo della malattia renale cronica in soggetti giovani, infatti, è di solito correlato alla presenza di nefropatie congenite o malformazioni dell'apparato urinario (Polzin, 2011).

-specie: la IRC viene diagnosticata più frequentemente nei gatti rispetto ai cani. Una stima della prevalenza di IRC nella popolazione canina e felina generale è di 0,5-1,5% nella prima e 1-3% nella seconda (Brown, 2007).

-razza: il collegamento più importante tra razza e sviluppo di IRC è rappresentato dalle nefropatie ereditarie. La maggior parte di queste patologie ha un decorso progressivo di durata variabile, che conduce spesso alla morte. Nel cane, le principali sono la displasia renale, le glomerulopatie primarie, l'amiloidosi, la malattia renale policistica e le glomerulonefriti immunomediate. Nel gatto si possono riscontrare principalmente la malattia renale policistica e l'amiloidosi (Lees, 2007). Alcuni studi hanno inoltre riportato una maggiore prevalenza di IRC in gatti di razza Siamese, Abissina, Persiana, Maine Coon e Burmese (Boyd et al., 2008). Questo dato non è però stato confermato in altre ricerche e rimane un'associazione poco significativa (White et al., 2006; Paepe et al., 2013).

I fattori scatenanti che causano direttamente il danno renale sono illustrati in tabella 5. Tuttavia, il reale contributo di questi fattori sull'incidenza della IRC nel cane e nel gatto non è stato del tutto chiarito. Questo è dovuto principalmente al fatto che le sottostanti cause di IRC vengono individuate raramente al momento della diagnosi stessa della IRC (Polzin, 2011). Individuare l'esatta eziologia dell'IRC e la precisa localizzazione del danno renale è molto complesso. Tale difficoltà è principalmente dovuta alla natura progressiva della patologia che, col passare del tempo, coinvolge in maniera generale tutte le componenti del nefrone rendendo quindi impossibile individuare la localizzazione primaria della lesione o le sue caratteristiche peculiari che potrebbero essere utili per la formulazione di una diagnosi eziologica precisa. Di conseguenza, l'eziologia dell'IRC resta spesso sconosciuta e non identificabile, neppure attraverso approfonditi esami di laboratorio come, ad esempio, l'esame istologico condotto su biopsia renale (Grauer et al., 2010).

---



Dal punto di vista patogenetico, una volta instauratosi il danno renale, a prescindere dalla sua causa scatenante e dalla sua primitiva localizzazione, qualsiasi patologia renale acquista un andamento progressivo ed irreversibile che esita in una nefropatia cronica generalizzata. Questa assume spesso un andamento lento, con aumento regolare dell'azotemia. In questo caso la patologia evolve senza conseguenze organiche clinicamente apprezzabili per mesi o anni, grazie ai meccanismi compensatori e adattativi messi in atto dal rene. In altri casi la malattia renale può evolvere rapidamente, con repentino scompenso della funzione renale ed improvvisa crisi uremica che si manifesta con una sintomatologia clinica più o meno grave.

Le principali cause di danno renale nel cane e nel gatto sono le glomerulopatie: esse possono essere di natura congenita o acquisita, primarie o secondarie. In particolare, si ritiene che molte delle malattie glomerulari si sviluppino secondariamente a processi patologici sistemici di natura neoplastica, infiammatoria infettiva o non infettiva (Vaden, 2011).

---

	<b>CANE</b>	<b>GATTO</b>
Neoplastiche	Leucemia Linfoma Mastocitosi Eritrocitosi primaria Istiocitosi sistemica Altre neoplasie	Leucemia Linfoma Mastocitosi Altre neoplasie
Infettive batteriche	Borrelliosi Bartonellosi Brucellosi Endocardite Pielonefrite Piometra Piodermite Altre infezioni batteriche croniche	Infezioni batteriche croniche Poliartrite da Micoplasma
Infettive protozoarie	Babesiosi Epatozoonosi Leishmaniosi Tripanosomiasi	
Infettive da rickettsie	Ehrlichiosi	
Infettive virali	Adenovirus canino tipo 1	Virus dell'immunodeficienza felina (FIV) Peritonite infettiva felina (FIP) Virus della leucemia felina (FELV)
Infettive parassitarie	Dirofiliariosi	
Infettive micotiche	Blastomicosi Coccidiomicosi	
Infiammatorie	Dermatite cronica Malattie infiammatorie croniche intestinali (IBD) Pancreatite Malattie periodontali Lupus sistemico eritematoso Altre patologie immunomediate	Pancreatite Colangioepatite Poliartrite cronica progressiva Lupus sistemico eritematoso Altre patologie immunomediate
Altre cause	Eccessiva somministrazione di corticosteroidi Trimetoprim-sulfa Iperlipidemia Infusione cronica di insulina Ematopoiesi ciclica nel Collie Vaccinazioni eccessive Idiopatiche	Tossicità da mercurio Idiopatiche

**Tabella 5.** Fattori scatenanti responsabili di danno renale a cui può conseguire lo sviluppo di IRC

## **Fisiopatologia**

In corso di malattia renale la perdita delle funzioni metaboliche, escretorie ed endocrine del rene insorge a causa di una sostanziale e progressiva riduzione del numero dei nefroni funzionanti. Come è stato detto nel paragrafo precedente, questa riduzione è legata al processo patologico primario che determina la malattia renale. Alcuni studi su modelli animali hanno illustrato una teoria di progressione spontanea della nefropatia secondo cui la perdita di un quantitativo importante di parenchima comporterebbe un progressivo declino della funzionalità renale, che tende a peggiorare indipendentemente dalla causa iniziale che ha determinato il danno all'organo (Hostetter et al., 2011; Rennke et al., 2007).

E' stato inoltre dimostrato che una riduzione sperimentale pari a 15/16% della massa renale totale, nel cane, comporta lo sviluppo di lesioni quali glomerulosclerosi focale e segmentale, fibrosi e infiltrato infiammatorio a livello tubulointerstiziale (Finco et al., 1992; Polzin, 2011). Questo accade perché i nefroni che non sono stati danneggiati dall'insulto primario, nel tentativo di mantenere una adeguata funzionalità renale, vanno incontro a un'ipertrofia compensatoria e ad un aumento del carico di lavoro. La funzionalità totale dell'organo, infatti, è data dalla somma della funzionalità di ogni singolo nefrone e, attraverso questo meccanismo, il rene è in grado di minimizzare la perdita di funzionalità provocata dalle alterazioni strutturali (Finco et al., 1992; Polzin, 2011).

Inoltre, per compensare la perdita dei nefroni ed aumentare la VFG (Velocità di Filtrazione Glomerulare) di ogni singolo nefrone viene indotta una riduzione della resistenza dell'arteriola glomerulare, cui consegue una marcata vasodilatazione dell'arteriola afferente. Questo genera ipertensione intraglomerulare, come diretta conseguenza di un'aumentata trasmissibilità della pressione arteriosa sistemica al glomerulo; iperperfusione glomerulare, per aumentato flusso plasmatico ed infine iperfiltrazione glomerulare (Finco et al., 1992; Polzin, 2011).

Il meccanismo di compensazione descritto risulta essere, con il passare del tempo, dannoso per il rene stesso. L'ipertrofia e l'ipertensione glomerulare promuovono infatti un insulto a carico delle cellule epiteliali che è stato associato ad un accumulo di sostanza ialina a livello della parete dei capillari glomerulari e a livello delle cellule endoteliali, con conseguente rischio di trombosi capillare (Rennke et al., 2007; Brown et

al., 2016). Inoltre, sia l'ipertensione che l'iperperfusione causano un aumento del volume e della superficie filtrante a cui però non corrisponde un'adeguata risposta funzionale dei podociti che andranno incontro a ipertrofia, ma non a iperplasia. Quando viene superata la capacità dei podociti di mantenere l'integrità dei pedicelli e della barriera che essi creano, alcune porzioni focali e segmentali delle cellule epiteliali sottostanti vengono scoperte, permettendo così un aumentato flusso di acqua e il passaggio di soluti e macromolecole come, ad esempio, le proteine plasmatiche. L'insorgenza della proteinuria di origine glomerulare si osserva infatti a carico dei nefroni i cui podociti sono stati danneggiati e rappresenta dunque un indice precoce di un danno renale (Finco et al., 1992; Polzin, 2011).

La proteinuria di origine tubulare, invece, è determinata dal mancato riassorbimento delle proteine a basso peso molecolare che fisiologicamente sono in grado di superare la barriera di filtrazione glomerulare, per poi essere riassorbite dalle cellule epiteliali dei tubuli. Le cause più frequenti di alterazioni in questo meccanismo di riassorbimento sono legate alla diminuzione numerica dei tubuli funzionanti e all'aumentodell'ultrafiltrato derivanti dai processi di iperfiltrazione precedentemente descritti, oltre che a tubulopatie come, ad esempio, la sindrome di Fanconi (Finco et al., 1992; Polzin, 2011).

La proteinuria è un fattore molto importante per la progressione della IRC sia nel cane che nel gatto (Jacob et al., 2005; Syme et al., 2006). Si ritiene che alcune proteine, come la transferrina o le IgG, possano causare un danno tossico alle cellule epiteliali del tubulo, stimolando la produzione di molecole pro-infiammatorie come la MCP-1, una proteina chemo-attrattiva dei monociti. Un eccessivo accumulo di proteine nel lume del tubulo contorto prossimale potrebbe causare un danno poiché le proteine, in seguito all'endocitosi, scatenano una cascata di eventi intracellulari, come la sovraespressione di geni che codificano molecole vasoattive e pro-infiammatorie che contribuiscono ad alterare lo spazio tubulointerstiziale. La proteinuria è stata anche indicata come causa primaria della differenziazione delle cellule epiteliali tubulari in miofibroblasti. Uno dei mediatori di tale trasformazione è il Transforming Growth Factor (TGF), che promuove anche la sintesi di matrice extracellulare ed è considerato essere uno dei maggiori promulgatori della fibrosi. Un altro importante meccanismo che lega la proteinuria alla progressione della IRC è la formazione di cilindri proteici nel tubulo renale. In questo distretto infatti avviene il riassorbimento dell'acqua e, un'aumentata presenza di

proteine, potrebbe favorire la formazione di tali cilindri che a loro volta potrebbero determinare ostruzione intratubulare (Abbate et al., 2006).

In medicina umana, in presenza di patologie glomerulari si osservano in genere anche lesioni tubulointerstiziali. Al contrario, le patologie primarie dello spazio tubulointerstiziale sono caratterizzate da un decorso molto più lento e graduale (D'Amico, 1999). Non è ancora stato del tutto chiarito come le malattie glomerulari riescano a indurre un danno a livello tubulointerstiziale. Oltre alla proteinuria sono stati identificati altri fattori scatenanti come l'ischemia tubulare secondaria a diminuito flusso post-glomerulare, il passaggio nell'ultrafiltrato di mediatori dell'infiammazione, la deposizione intra-renale di fosfato di calcio e processi immunomediati che si estendono direttamente dal glomerulo al comparto interstiziale (Nath, 1998; Brown et al., 2016.).

In medicina veterinaria l'eziologia delle nefropatie è difficilmente individuabile. Grazie a studi condotti sulle biopsie renali si può però affermare che la IRC nel cane è prevalentemente scatenata da glomerulopatie primarie, mentre nel gatto la malattia sembra originare soprattutto da patologie tubulointerstiziali. Questo reperto potrebbe spiegare la natura lenta e progressiva della IRC felina, mentre il declino rapido della funzionalità renale che tipicamente si riscontra nel cane potrebbe essere attribuito all'origine primariamente glomerulare della IRC (Minkus et al., 1994; Schneider et al., 2013).

L'evoluzione dell'IRC può essere descritta schematicamente in stadi progressivi che rappresentano le fasi di un processo degenerativo continuo, caratterizzato dalla perdita di una quota sempre maggiore di nefroni funzionanti. Il danno glomerulare acuto e persistente innesca il meccanismo di compensazione; a livello di ogni nefrone si realizza uno stato di ipertensione locale e un aumento del GFR, a cui segue l'insorgenza di proteinuria glomerulare e/o tubulare. Questa è associata ad un incremento della produzione di angiotensina II che, facilitando il passaggio di citochine proinfiammatorie nell'interstizio, promuove la migrazione di neutrofili, macrofagi e linfociti T che delineano un quadro di nefrite interstiziale. La flogosi che colpisce l'epitelio tubulare induce lo sfaldamento delle cellule dalla membrana basale, la separazione dalle cellule adiacenti e la trasformazione delle cellule epiteliali tubulari in fibroblasti. Queste cellule producono una matrice di collagene che causa la distruzione dei capillari (es: vasarecta) e dei tubuli rimasti; si assiste a questo punto alla formazione di tessuto di

cicatrizzazione a livello tubulointerstiziale e all'evoluzione dello stato terminale della malattia, associata in genere ad una sintomatologia clinica grave (Harris et al., 2006).

## **Manifestazioni cliniche**

I soggetti affetti da IRC possono presentare sintomi aspecifici, come depressione, debolezza, disidratazione e perdita di peso. Possono inoltre manifestare sintomi a carico del sistema urinario, dell'apparato gastroenterico, del sistema cardiopolmonare, del sistema nervoso, dell'apparato muscolare, dell'occhio, del sistema ematopoietico e del sistema immunitario.

I segni clinici dell'insufficienza renale cronica si presentano con intensità e gravità differente, in relazione al grado della malattia renale. Se la patologia è stazionaria si riscontrano prevalentemente sintomi a carico dell'apparato urinario (poliuria/polidipsia) e gastroenterico (anoressia, vomito). Negli stadi più avanzati, quando insorge l'uremia si assiste generalmente alla manifestazione di più sintomi gravi, fino al coma e alla morte del paziente (Guidi et al., 2006).

### APPARATO URINARIO

Tra le manifestazioni cliniche precoci dell'insufficienza renale cronica troviamo l'insorgenza di poliuria e di polidipsia. La poliuria deriva dalla perdita progressiva della capacità di concentrare e diluire le urine da parte del rene, causata dalle alterazioni funzionali, e dalla sua perdita della risposta all'azione dell'ADH (ormone antidiuretico). La polidipsia insorge invece come meccanismo compensatorio all'ingente perdita di liquidi che si verifica attraverso le urine; nel caso in cui l'assunzione di liquidi non riesce ad equiparare tali perdite, il paziente andrà incontro a disidratazione grave (Polzin et al., 1999).

Un altro sintomo molto frequente nei soggetti affetti da IRC è la nicturia, poiché la posizione supina, migliorando la perfusione ematica dei reni, contribuisce ad incrementare la produzione e la successiva eliminazione di urina (Guidi et al., 2006).

---

## APPARATO GASTROENTERICO

I sintomi gastroenterici spesso sono precoci ed aspecifici; sono frequentemente riscontrati l'anoressia e la conseguente perdita di peso, associata ad episodi di vomito. L'origine dell'anoressia è multifattoriale ed imputabile ad un'eccessiva assunzione di liquidi causata dalla polidipsia, all'ipopotassiemia, all'acidosi metabolica e alla gastrite uremica riconducibile alla ridotta metabolizzazione renale della gastrina (Guidi et al., 2006).

Il vomito è un'altra manifestazione clinica frequentemente riscontrata in soggetti con grave danno renale. Questo sintomo è provocato dall'azione di una tossina uremica, non ancora identificata, sulla zona d'innesto chemiorecettoriale emetica midollare e dalla gastrite uremica; la gravità con cui si manifesta è dunque correlata al livello di iperazotemia. La gastropatia uremica tende in genere a provocare ulcere gastriche, per questo motivo può verificarsi anche ematemesi. Un segno caratteristico degli stadi avanzati della IRC e/o dell'uremia è la stomatite uremica, caratterizzata da ulcerazioni e aree di necrosi a livello della mucosa orale associate ad alito urinoso. La patogenesi è riconducibile principalmente all'iperammoniemia che deriva dalla scissione dell'urea da parte dei batteri ureasi-produttori. Questa sostanza, non essendo escreta a sufficienza con le urine, viene eliminata attraverso le mucose dell'apparato gastroenterico (Guidi et al., 2006).

Meno frequentemente è possibile riscontrare l'enterocolite uremica, caratterizzata da diarrea nel cane e costipazione prevalentemente riscontrata nel gatto (Guidi et al., 2006; Polzin et al., 2006).

## SISTEMA CARDIOCIRCOLATORIO

L'insufficienza renale cronica è spesso associata a ipertensione arteriosa sistemica (PA > 170 mmHg). La patogenesi di questa alterazione pressoria può essere attribuita alla combinazione di diversi fattori quali la ritenzione di sodio, l'espansione del volume extracellulare, la vasocostrizione generata dall'attivazione del sistema renina-angiotensina-aldosterone, l'incremento dei livelli di noradrenalina, la diminuzione delle sostanze vasodilatatrici di origine renale, l'aumento della gittata cardiaca e delle resistenze periferiche, l'iperparatiroidismo secondario. Gli organi che maggiormente risentono di un aumento della pressione arteriosa sono proprio i reni, nei quali

contribuisce a incrementare i meccanismi che determino la glomerulosclerosi. A livello cardiaco determina invece ipertrofia ventricolare sinistra, ischemia cardiaca ed extrasistoli. Nell'occhio l'ipertensione può provocare distacco retinico, ifema ed emorragia della retina. A livello del sistema nervoso centrale può determinare l'insorgenza di un'encefalopatia con manifestazioni di demenza ed emorragia cerebrovascolare (Guidi, et al., 2006). Nei pazienti umani ipertesi spesso si manifestano sintomi come mal di testa, debolezza, impossibilità all'esercizio fisico, nervosismo e disturbi del sonno. Nel cane e nel gatto l'ipertensione arteriosa è invece considerata una condizione clinicamente silente, ad eccezione dei casi in cui è possibile osservare manifestazioni oculari e soffi cardiaci sistolici (Polzin et al., 2002).

Una rara complicazione dell'insufficienza renale cronica è la pericardite uremica, probabilmente provocata dalle tossine uremiche e da fattori immunomediati. È correlata a questa sindrome anche la polmonite uremica, seppur raramente diagnosticata sia nel cane che nell'uomo, che si manifesta con edema polmonare non cardiogeno presumibilmente dovuto al danneggiamento degli alveoli da parte delle tossine uremiche e al conseguente aumento della permeabilità capillare. I soggetti colpiti lamentano disturbi respiratori e circolatori, quali grave dispnea e cianosi (Polzin et al., 1999; Guidi et al., 2006).

## SISTEMA NERVOSO

Nell'IRC in stato avanzato e nella sindrome uremica lo stato del sensorio può risultare normale oppure mostrarsi depresso con affaticamento e apatia. I segni neurologici più comuni sono sonnolenza, letargia, tremori, barcollamenti, mioclonie, convulsioni, stupore e coma. Tali manifestazioni cliniche sono riconducibili all'encefalopatia uremica, provocata dalla presenza delle tossine uremiche, dall'iperparatormonemia che causa un aumento dei livelli di calcio a livello encefalico e delle alterazioni nei meccanismi di neurotrasmissione periferica, dagli squilibri elettrolitici derivati dall'uremia e dall'ipertensione arteriosa sistemica (Polzin et al., 1999; Guidi et al., 2006).

Gli squilibri elettrolitici, soprattutto quelli del potassio, connessi all'insufficienza renale cronica sono inoltre alla base dei meccanismi patogenetici che determinano la polimiopatia ipopotassiemica, riscontrata spesso nel gatto. Questa sindrome si manifesta



con debolezza muscolare generalizzata, con la tipica ventroflexione cervicale e con andatura rigida (Polzin et al., 2002).

### SISTEMA EMOPOIETICO

La principale alterazione ematologica che colpisce i soggetti affetti da IRC è rappresentata da un'anemia arigenativa microcitica ipocromica progressiva. Questa si manifesta con pallore delle mucose, affaticamento, letargia, debolezza, stanchezza, apatia, inappetenza e intolleranza al freddo (Polzin et al., 1999).

Tale alterazione è dovuta principalmente alla ridotta sintesi di eritropoietina da parte del rene, ma è anche aggravata da altri fattori come le carenze nutrizionali, la presenza di inibitori diretti dell'eritropoiesi di origine uremica, la fibrosi del midollo osseo e le perdite ematiche dovute ai sanguinamenti gastroenterici (Cowgill et al., 1999). L'uremia può infatti causare tendenza all'emorragia, che si manifesta con ecchimosi, emorragie gastroenteriche, ematemesi, melena e sanguinamento gengivale. Queste manifestazioni sono dovute ad una ridotta funzionalità delle piastrine e ad anomalie nell'interazione di queste con le pareti vascolari, probabilmente riconducibili all'aumentata sintesi di ossido nitrico (NO) indotta dal plasma uremico (Polzin et al., 1999).

### SISTEMA IMMUNITARIO

Un'altra complicazione che spesso colpisce i soggetti con danno renale cronico è caratterizzata dal deficit del sistema immunitario. Si verifica infatti non soltanto una riduzione del numero di cellule immunitarie circolanti, ma anche una loro sostanziale alterazione funzionale. Questo rende il paziente particolarmente suscettibile alle infezioni batteriche che possono aggravarne ulteriormente il quadro clinico e metterne a rischio la vita (Polzin et al., 1999).

---

## Diagnosi

La diagnosi di insufficienza renale cronica viene emessa sulla base delle seguenti valutazioni:

- 
- Anamnesi medica;
  - Esame clinico;
  - Esame emocromocitometrico;
  - Esame biochimico, profilo elettrolitico e acido-base;
  - Esame completo delle urine e del sedimento urinario;
  - Misurazione della pressione arteriosa per escludere l'ipertensione sistemica;
  - Diagnostica per immagini: esame radiografico, esame ecografico con e senza l'utilizzo del mezzo di contrasto, scintigrafia renale, esame TC e RM con e senza l'utilizzo del mezzo di contrasto;
  - Biopsia renale, indicata se i reni appaiono di dimensioni normali o leggermente ingranditi. L'esame istologico può risultare utile per emettere una diagnosi eziologica;
  - Determinazione della VFG quando il deterioramento della funzione renale è inferiore al 60-70% e la creatininemia risulta ancora nella norma (Polzin et al., 2002; Guidi et al., 2006).
- 

## Reperti di laboratorio

I soggetti affetti da insufficienza renale cronica presentano delle alterazioni dei parametri emato-biochimici di entità variabile, in relazione al grado di malattia renale. Tali alterazioni sono rappresentate da: iperazotemia, acidosi metabolica, anemia, iperfosfatemia associata a iperparatiroidismo secondario, ipo/ipercalcemia, ipermagnesiemia, ipopotassiemia, anomalie del metabolismo dell'insulina, iperamilasemia, iperlipasemia, anomalie dei lipidi. Oltre a questi rilievi è possibile anche riscontrare delle alterazioni dell'esame chimico-fisico delle urine. In corso di IRC, infatti, è possibile evidenziare una variazione del peso specifico urinario e la presenza di proteinuria (Polzin et al., 2002).

---

## **Iperazotemia**

Con il termine iperazotemia si definisce l'incremento anomalo di composti azotati nel sangue, soprattutto di urea e creatinina. Dal momento che queste sostanze vengono fisiologicamente prodotte dall'organismo, le loro elevate concentrazioni sieriche possono derivare o da un incremento della produzione (epatica per l'urea, muscolare per la creatinina) o da una riduzione della velocità di eliminazione, che avviene principalmente a livello renale. In questo caso, l'iperazotemia è provocata da una ridotta filtrazione glomerulare che rappresenta la principale via di rimozione dell'urea e della creatinina dai fluidi extracellulari. L'efficienza di questo meccanismo dipende da fattori prerenali (volemia, pressione ematica, pressione colloidale-osmotica), renali (pervietà delle arterie renali e dei capillari glomerulari, pressione interstiziale, pressione intratubulare) e postrenali (pervietà e integrità degli ureteri, della vescica e dell'uretra). Da ciò si può dedurre che una sua diminuzione si associa ad un'iperazotemia rispettivamente di tipo prerenale, da aumentata sintesi di cataboliti azotati o da compromissioni della perfusione renale; renale, da lesioni al parenchima renale, e postrenale, da ostruzioni o rotture delle vie urinarie (Polzin et al., 2002).

La classificazione dell'iperazotemia è fondamentale per le notevoli implicazioni cliniche di carattere patogenetico, prognostico e terapeutico. Bisogna comunque tenere presente che l'insufficienza renale cronica è una sindrome complessa e progressiva nella quale il danno renale primario si estende e si aggrava nel tempo, per questo motivo non è insolito riscontrare la presenza di diverse forme di iperazotemia. (Polzin et al., 1999; Lees et al., 1999) I parametri di riferimento per la determinazione dell'azotemia e, dunque, per la valutazione della funzionalità renale sono rappresentati dalla concentrazione plasmatica di urea o BUN (Blood Urea Nitrogen) e di creatinina sierica (SC). Poiché la sintesi di quest'ultima risulta essere pressoché costante, un aumento della sua concentrazione ematica è indice di una ridotta escrezione renale. Per tale ragione la concentrazione di creatinina sierica è uno dei principali marker di danno renale utilizzati nella pratica clinica (Grauer et al., 2010). Inoltre, la concentrazione ematica di azoto ureico e di creatinina forniscono una stima approssimativa del tasso di filtrazione glomerulare.

---

## **Velocità di filtrazione glomerulare**

La misurazione della velocità di filtrazione glomerulare è un parametro molto importante nella valutazione del danno renale poiché questa risulta essere direttamente proporzionale alla massa renale funzionante e, di conseguenza, si riduce progressivamente con il peggioramento del danno parenchimale. La riduzione della VFG determina una riduzione del processo di filtrazione e dell'escrezione delle sostanze azotate con conseguente aumento dell'azotemia. (Sparkes et al., 2016; Brawn et al., 2003)

In medicina veterinaria la stima di questo parametro viene effettuato valutando la clearance plasmatica dell'inulina, di radioisotopi o utilizzando la scintigrafia renale. Questi metodi, tuttavia, vengono usati raramente poiché risultano essere indaginosi e di difficile applicazione nella pratica clinica (Finch et al., 2018; Pocar et al., 2019).

## **SDMA**

La dimetilarginina simmetrica (SDMA) è stata recentemente proposta dall'IRIS (International Renal Interest Society) come mezzo di valutazione della funzionalità renale nel cane e nel gatto. Questo composto viene rilasciato in circolo a velocità costante durante il fisiologico metabolismo cellulare delle proteine ed è escreto, come la creatinina, prevalentemente a livello renale (Schowedhelm et al., 2011; Fleck et al., 2003).

La concentrazione sierica dell'SDMA, a differenza di quella della creatinina, non sembra essere influenzata dalla massa corporea o da altri fattori di variabilità biologica, ma pare sia correlata soltanto alla velocità di filtrazione glomerulare (Hall et al., 2014; Schowedhelm et al., 2011). Diversi lavori hanno inoltre dimostrato che l'incremento di questo parametro a livello ematico preceda quello della creatinina, evidenziando precocemente la riduzione della VFG e anticipando quindi la diagnosi di danno renale cronico. Per queste caratteristiche l'SDMA è considerato un marker precoce di malattia renale ed è stata inserita come parametro di valutazione per la stadiazione dei pazienti affetti da IRC (Hall et al., 2014; Kopke et al., 2018).

---

## **Acidosi metabolica**

Una condizione patologica caratteristica dell'IRC è l'acidosi metabolica dovuta principalmente alla limitata capacità di escrezione degli ioni idrogeno ( $H^+$ ) e di rigenerazione dei bicarbonati ( $HCO_3^-$ ) da parte dei reni alterati.

Altri fattori che concorrono a determinare e aggravare l'acidosi metabolica nell'insufficienza renale sono: la perdita gastrointestinale di idrogenioni, provocata dal vomito; la dieta ipoproteica o caratterizzata da inadeguata composizione amminoacidica delle proteine che, contribuendo alla riduzione dell'ammoniogenesi, riduce la disponibilità di glutamina. Questa molecola è necessaria alle cellule tubulari per la sintesi di  $NH_3$  che, legandosi a ioni  $H^+$ , generano ioni ammonio utilizzati dall'organismo come sistemi tampone (Guidi et al., 2006).

L'acidosi metabolica, inoltre, contribuisce allo sviluppo e all'aggravamento di svariati effetti clinici tipici dell'insufficienza renale. A causa di questa condizione metabolica, infatti, si genera un bilancio negativo del calcio che determina la demineralizzazione dell'osso. Questa depauperazione ossea di carbonato di calcio esercita un'azione tampone sull'acidemia, ma favorisce, d'altro canto, l'osteodistrofia renale e l'iperfosfatemia (Guidi et al., 2006).

Lo stato acidotico promuove anche la fuoriuscita del potassio intracellulare e l'aumento della potassiuria con conseguente ipokaliemia (Guidi et al., 2006). Questa condizione metabolica si manifesta con una sintomatologia che include anoressia, letargia, nausea, vomito, debolezza muscolare e perdita di peso. Tale condizione, associata agli squilibri ormonali, alle alterazioni del metabolismo energetico e al ridotto introito dietetico determinano un eccessivo catabolismo proteico che genera, a sua volta, composti azotati che aggravano ulteriormente la condizione di acidosi e di uremia del paziente (Polzin et al., 1999).

## **Iperfosfatemia ed iperparatiroidismo secondario**

L'iperparatiroidismo secondario renale è una sindrome clinica caratterizzata da un aumento della secrezione di Paratormone (PTH), l'ormone ipercalcemizzante prodotto dalle ghiandole paratiroidi. L'incremento della secrezione di questo ormone in corso di IRC è provocato principalmente dalla ridotta escrezione di fosforo a livello renale. Questa condizione si manifesta negli stadi più avanzati della patologia, quando la VFG

scende al di sotto del 20% (Guidi et al., 2006; Polzin et al., 2002). La ritenzione di fosfati e l'iperfosfatemia che ne consegue funge da stimolo per le paratiroidi che incrementano la secrezione di paratormone al fine di promuovere l'escrezione di fosfati a livello renale. Questo meccanismo compensatorio genera però delle ripercussioni fisiopatologiche dovute all'iperparatiroidismo secondario renale. Il Paratormone, ad elevate concentrazioni, agisce infatti come una potente tossina uremica e determina inoltre importanti alterazioni a livello del tessuto osseo che si manifestano con la presenza di osteodistrofia renale, soprattutto in animali in accrescimento in cui il tessuto scheletrico si mostra più sensibile ai suoi effetti; calcificazione dei tessuti molli, soprattutto a livello di polmoni, reni, arterie, stomaco e miocardio, demineralizzazione scheletrica, lesioni ossee cistiche, dolore osseo e ritardo della crescita. Per ragioni tuttora sconosciute risultano più colpite le ossa del cranio e della mandibola, che può essere piegata o ritorta senza fratturarsi (mandibola di gomma o rubber jaw), mentre i denti diventano mobili. La calcificazione renale, inoltre, promuove l'infiammazione interstiziale, la fibrosi e dunque la progressione della IRC (Polzin et al., 2002).

### **Ipo/ipercalcemia e ipermagnesiemia**

Un altro riscontro frequente nei pazienti affetti da IRC è l'ipocalcemia. Questa alterazione è dovuta prevalentemente alla diminuzione dell'assorbimento intestinale del calcio legato ai bassi livelli sierici di calcitriolo, derivanti dall'iperfosfatemia e dalla ridotta capacità di sintesi da parte del rene.

Bisogna precisare che il rilievo di tale riduzione riguarda il calcio ionizzato ( $\text{Ca}^{2+}$ ); mentre per quanto riguarda il dosaggio del calcio totale, in corso di insufficienza renale, spesso si registra un'ipercalcemia. Tale discrepanza è probabilmente correlata ad un aumento del calcio complesso, che trattiene anioni organici e inorganici come i citrati, i fosfati ed i solfati (Polzin et al., 2002).

Nei pazienti che presentano ipercalcemia è importante capire se questa rappresenta la causa o la conseguenza della IRC. A tal proposito è utile determinare i valori ematici di  $\text{Ca}^{2+}$ , poichè solo un'ipercalcemia ionizzata è in grado di promuovere l'insufficienza renale (Polzin et al., 2002).

Infine, essendo i reni i principali responsabili dell'escrezione del magnesio, anche l'ipermagnesiemia costituisce un'alterazione elettrolitica ricorrente nei soggetti con IRC (Polzin et al., 2002).

---

## **Ipopotassiemia**

L'ipokaliemia è una delle alterazioni biochimiche più frequenti riscontrate nel gatto con insufficienza renale. È stato ipotizzato che la deplezione cronica di potassio possa essere la causa e non la conseguenza della IRC in quanto, oltre a promuovere il danno renale accentuando l'ammoniogenesi, essa può compromettere la funzionalità dell'organo inducendo un declino reversibile della velocità di filtrazione glomerulare. Nel cane tale rilievo risulta essere invece meno frequente. (Polzin et al., 2002).

Il potassio è escreto principalmente dai reni, solo piccole quantità sono eliminate con le feci o con il sudore. Nei pazienti con insufficienza renale cronica i nefroni residui mantengono l'equilibrio incrementando, proporzionalmente al declino della VFG, la secrezione tubulare del potassio. Anche l'eliminazione gastroenterica di questo ione sembra aumentare nella IRC; questo meccanismo gioca un ruolo importante nel controllo della kaliemia in questi soggetti (Polzin et al., 2002).

Il meccanismo responsabile dello sviluppo dell'ipopotassiemia nei gatti risulta poco chiaro ma potrebbe essere causato dall'eccessiva perdita di potassio attraverso l'urina e dall'inadeguata assunzione di questo stesso elemento con l'alimentazione.

A causa del ruolo che il potassio svolge a livello dei meccanismi di neurotrasmissione, una sua carenza determina dal punto di vista clinico tipiche disfunzioni neuromuscolari come debolezza muscolare generalizzata, dolore e miopatia ipokaliemica, che si presentano sotto forma di ventroflexione del capo e andatura rigida. I bassi livelli ematici di potassio provocano inoltre inibizione della sintesi proteica, perdita di peso, mantello scadente ed intensificazione della poliuria, riducendo la sensibilità renale all'ADH (Polzin et al., 1999).

## **Alterazioni del peso specifico urinario**

Il danno renale cronico determina una progressiva e irreversibile perdita della capacità di concentrare le urine. Nelle fasi iniziali della IRC è possibile riscontrare la produzione di urine isostenuriche. Successivamente, con la progressiva perdita dei nefroni funzionanti, l'organo perde completamente la capacità di modificare il filtrato glomerulare determinando la formazione di urine con peso specifico simile a quello del filtrato (1007-1029 nel cane e 1007-1034 nel gatto). Questo segno clinico, associato a

disidratazione e/o iperazotemia è fortemente indicativo di insufficienza renale (Osborne et al., 1999).

## **Proteinuria**

Sebbene il termine proteinuria si riferisca semplicemente alla presenza di proteine nelle urine, esso è generalmente impiegato per indicare un'anomala concentrazione proteica urinaria ( $> 20$  mg/Kg/die). (Osborne et al., 1999). Il riscontro e la persistenza di tale segno clinico costituiscono significativi elementi caratterizzanti l'insufficienza renale cronica (Hokamp et al., 2018).

In condizioni fisiologiche le urine dei cani e dei gatti contengono solo una piccola quantità di proteine. La permeabilità selettiva dei capillari glomerulari, infatti, limita la filtrazione della maggior parte delle proteine plasmatiche sulla base del peso molecolare (PM = 60-65 kDa) e della carica elettrica. Le proteine di dimensioni minori e con carica positiva, capaci di oltrepassare la membrana glomerulare, sono per la maggior parte riassorbite a livello del tubulo prossimale (Hokamp et al., 2018)

La comparsa di proteinuria può riscontrarsi sia in condizioni fisiologiche che patologiche. La proteinuria fisiologica è in genere transitoria e si riscontra in seguito ad un'estenuante attività fisica, convulsioni, febbre, esposizione a temperature molto elevate o basse e situazioni di stress (Hokamp et al., 2018).

La proteinuria patologica può essere determinata invece da anomalie a carico delle vie urinarie o extra-urinarie. In caso di anomalie extra-urinarie è possibile riscontrare nelle urine proteine a basso peso molecolare che vengono filtrate a livello glomerulare, ma non riassorbite dai tubuli prossimali (come, ad esempio, le proteine di Bence-Jones), oppure proteine derivanti da processi flogistici a carico del tratto genitale o, ancora, da congestione renale secondaria a insufficienza cardiaca congestizia (Piech et al., 2019). La proteinuria patologica di origine urinaria è distinta, a sua volta, in renale e non renale. Quest'ultima è generalmente provocata dalla presenza fenomeni flogistici o emorragie delle basse vie urinarie (urolitiasi, neoplasie, traumi, cistiti) (Hokamp et al., 2018).

La proteinuria renale invece si manifesta in seguito a lesioni di una o più componenti del nefrone. La glomerulonefrite e l'amiloidosi, ad esempio, alterano la permeabilità dei capillari glomerulari e determinano il passaggio di ingenti quantità di proteine nell'ultrafiltrato, provocando una proteinuria persistente ( $> 50$  mg/Kg/die) con



sedimento urinario normale o associata alla presenza di cilindri ialini. Anche nefropatie di tipo infiammatorio o infiltrativo, come neoplasie e pielonefrite o anomalie tubulari, che provocano una diminuzione del riassorbimento del filtrato proteico possono dare luogo ad una proteinuria renale duratura ma, spesso, di entità minore rispetto a quella evidenziata in caso di danni glomerulari (Hokamp et al., 2018).

Il riscontro di proteinuria deve comunque essere sempre interpretato in relazione al peso specifico e al sedimento urinario. Una proteinuria consistente potrebbe passare inosservata in presenza di urina diluita; mentre un aumento della concentrazione proteica urinaria, causata da infiammazioni o emorragie delle basse vie urinarie, potrebbe risultare fuorviante se non esaminata in relazione alle alterazioni caratteristiche del sedimento (batteriuria, piuria, riscontro di eritrociti e di cellule epiteliali) (Grauer et al., 2010).

Se procedendo con l'esame chimico-fisico delle urine si evidenzia una proteinuria significativa, associata ad esame del sedimento normale, è opportuno quantificare le proteine eliminate con l'urina al fine di valutare la gravità delle lesioni renali e di monitorare la progressione della malattia o la risposta al trattamento. Per effettuare tale quantificazione viene utilizzato il rapporto proteine/creatinina urinaria (UPCR). Questo parametro identifica in modo accurato la quantità di proteine escrete nelle 24 ore poiché non appare influenzato dal volume e dalla concentrazione dell'urina ma si mantiene costante durante la giornata, permettendo di quantificare la proteinuria senza dover raccogliere campioni urinari in tempi stabiliti. Nel cane e nel gatto, è considerato normale un UPr: UCr inferiore, rispettivamente, a 0,4 e 0,5 (Grauer et al., 2010; Vaden et al., 2016).

## **Diagnostica per immagini**

La diagnostica per immagini ha un ruolo molto importante nell'iter di valutazione, di monitoraggio e di gestione clinica del paziente nefropatico. Attualmente, sia in medicina umana che in medicina veterinaria è possibile avvalersi di molte tecniche diagnostiche che risultano fondamentali per il corretto inquadramento dei soggetti con danno renale. Tra queste le più utilizzate nella pratica clinica sono l'esame radiografico, esame ecografico, la tomografia computerizzata, la risonanza magnetica e la scintigrafia renale.

---

## **Radiologia**

L'esame radiografico fornisce delle importanti informazioni sulla localizzazione, sulla dimensione, sulla morfologia e sulla densità dei reni e dell'apparato urinario. Questa tecnica diagnostica viene anche utilizzata per mettere in evidenza eventuali lesioni cistiche e nodulari presenti a livello del parenchima renale o, ancora, la presenza di uroliti posizionati nel lume di ureteri, vescica o uretra. La valutazione radiografica dell'apparato urinario prevede l'esecuzione di due radiogrammi, uno in proiezione latero-laterale ed un altro in proiezione ventro-dorsale. Nel caso in cui si sospettino lesioni traumatiche renali o uretrali, idronefrosi, presenza di masse parenchimali o uroliti può essere utile eseguire uno studio radiografico di questo apparato utilizzando la tecnica contrastografica. Questa prevede l'utilizzo di mezzi di contrasto iodati, controindicati in caso di IRC o ipoperfusione renale, (Kirberger et al., 2012) o non iodati che vengono somministrati per via parenterale o per via percutanea (Sailer et al., 2013; Meomartino et al., 2014).

L'urografia venosa o escretoria prevede l'esecuzione di due proiezioni di routine e, successivamente, l'iniezione del mezzo di contrasto per via endovenosa che darà luogo a due fasi distinte, studiate attraverso l'esecuzione di ulteriori proiezioni radiografiche. La prima, fase nefrogenica, inizia dieci secondi dopo la somministrazione e si conclude in 20-25 minuti. Durante questa fase il mezzo di contrasto si distribuisce a livello parenchimale e nel lume tubulare, il rene apparirà dunque uniformemente opaco. Un rallentamento di questa fase è indice di insufficienza renale. La seconda fase, detta pielouretrografica, inizia tre minuti dopo l'iniezione del mezzo di contrasto e perdura per circa un'ora. Durante questa fase gli ureteri appariranno come due sottili bande radiopache che, partendo dal bacinetto renale, terminano a livello del trigono vescicale. I tempi di questa fase possono variare in base alla funzionalità e alla pervietà dell'apparato escretore, alla pressione sanguigna, allo stato di idratazione del paziente e alla dose del mezzo di contrasto iniettato (Hudson et al., 2002; Meomartino et al., 2014).

La pielouretrografia discendente percutanea è una tecnica che prevede l'introduzione del mezzo di contrasto, utilizzando un ago spinale sottile, direttamente a livello del bacinetto renale, attraverso la via trascutanea e trans parenchimale ecoguidata. La pielouretrografia è indicata nei casi in cui si sospetti l'occlusione o la rottura degli ureteri o quando è necessario determinare con precisione il loro decorso. Prima di

introdurre il mezzo di contrasto a livello del bacinetto renale è necessario prelevare l'urina presente in questa sede, al fine di evitare una sovradistensione della struttura. Successivamente si procede con l'esecuzione di due radiogrammi, in proiezione dorso-ventrale e latero-laterale. Fisiologicamente il bacinetto renale appare radiopaco e lievemente dilatato; gli ureteri presentano delle variazioni di calibro lungo il loro decorso, a causa della peristalsi, e la vescica risulta radiopaca per la presenza del mezzo di contrasto. In seguito a questa procedura il paziente può presentare ematuria transitoria e parziale o, in alcuni casi, una transitoria occlusione ureterale causata dalla presenza di coaguli (Hudson et al., 2002; Meomartino et al., 2014).

## **Ecografia**

### Anatomia ecografica del rene

I reni sono due organi parenchimosi situati nella regione addominale craniale. Per la loro visualizzazione ecografica si procede posizionando il paziente in decubito laterale, destro e sinistro, o in decubito dorsale.

Il rene sinistro viene visualizzato attraverso un approccio ventro-dorsale, posizionando la sonda ecografica a livello della regione addominale, caudalmente all'arco costale e ventralmente alla prima costa. Il rene destro ha una localizzazione dorso-craniale, a contatto con il lobo caudato del fegato. Per la sua visualizzazione si può effettuare un approccio ventro-dorsale, ma spesso è necessaria una scansione intercostale, che può rendersi difficoltosa per la presenza di materiale fecale nel colon (D'Anjou et al., 2015).

I reni nel cane sono simmetrici, presentano una forma ovale o a fagiolo, in relazione alla scansione. La dimensione di questi organi è variabile in base al peso e alla conformazione del soggetto. Poiché esistono molte variazioni in relazione a questi parametri, per avere dei riferimenti sulle sue dimensioni fisiologiche, le dimensioni del rene sinistro vengono valutate in relazione al diametro dell'aorta o alla lunghezza della quinta e sesta vertebra lombare (D'Anjou et al., 2015).

Durante lo studio ecografico i reni devono essere visualizzati interamente, in senso cranio-caudale e medio-laterale, effettuando una scansione longitudinale e trasversale. In questo modo si otterrà un esame completo dell'organo attraverso il quale sarà possibile distinguere le seguenti strutture anatomiche (D'Anjou et al., 2015; Benvenuti et al., 2013).

---

- La capsula renale, visibile come una sottile interfaccia iperecogena quando il fascio di ultrasuoni la colpisce perpendicolarmente.
- La corticale renale, porzione periferica dell'organo, presenta una struttura omogenea e iperecogena rispetto al parenchima epatico.
- La midollare renale, porzione più interna, risulta divisa in lobuli da setti iperecogeni che rappresentano le pareti dei vasi e dei diverticoli renali. Presenta uno spessore avente rapporto 1:1 con la corticale dalla quale è nettamente separata attraverso la giunzione cortico-midollare. Questa porzione risulta essere ipoecogena rispetto alla corticale, ipo/isoecogena rispetto al fegato e ipoecogena rispetto alla milza.
- La cresta renale, prolungamento della midollare, ha un aspetto iperecogeno.
- Pelvi renale, situata al centro dell'organo in un'area iperecogena, detta sinus. È costituita prevalentemente da tessuto adiposo, in sezione trasversale misura meno di 2 mm e il suo lume è visibile solo in caso di pielectasia.

Durante lo studio ecografico del rene è importante procedere con la valutazione della posizione, della forma, delle dimensioni, dell'ecostruttura e dell'ecogenicità dell'organo e delle singole strutture sopracitate, valutando in particolar modo la distinzione e il rapporto cortico-midollare. Un altro aspetto molto importante da indagare, durante l'esame ecografico, è quello relativo all'emodinamica dell'organo e alla sua vascolarizzazione.

Il rene è irrorato da un ramo dell'aorta addominale. Questo vaso penetra attraverso l'ilo e si sfiocca, generando diverse ramificazioni (da 2 a 7) che andranno a formare le arterie interlobari. Ognuno di questi vasi decorre verso la corticale e, in corrispondenza della giunzione cortico-midollare, si piega costeggiando la base del diverticolo renale. A questo punto andrà a formare, attraverso delle anastomosi, l'arteria arciforme da cui originano le arterie interlobulari e le arterie rette vere.

Le arterie rette vere procedono verso la midollare del rene con andamento centripeto. Le arterie interloburari procedono con andamento centrifugo verso la corticale, dando origine alle arteriole afferenti. La maggior parte di queste andrà a formare la rete mirabile dei capillari, da cui origina il glomerulo vascolare, che confluirà poi con l'arteriola efferente. Da questa si staccheranno dei capillari che proseguiranno lungo le pareti del tubulo renale. Da questi vasi origina la circolazione venosa, satellite di quella arteriosa. Le restanti arteriole afferenti daranno origine alle arterie rette spurie che andranno a irrorare le porzioni di parenchima comprese tra i dotti collettori delle piramidi.

---

Dalle arterie interlobulari originano, inoltre, dei rami che vanno a irrorare le porzioni più periferiche della corticale e la capsula renale. Da questa regione il sangue viene drenato attraverso le vene sottocapulari (vene stellate) le quali fanno capo, a loro volta, alle vene interlobulari (Pelagalli et al., 1999; Waller et al., 2007).

### Patologie renali in ecografia convenzionale

Nella pratica clinica veterinaria l'esame ecografico del rene viene spesso utilizzato per valutare la morfologia dell'organo e studiarne l'emodinamica. Questo tipo di esame risulta di fondamentale importanza per evidenziare alterazioni e lesioni, focali e diffuse, a carico del parenchima renale. Durante lo studio ecografico, utilizzando la metodica CEUS, è possibile inoltre ottenere delle informazioni più dettagliate riguardo le lesioni e, soprattutto, riguardo la vascolarizzazione dell'organo.

Le patologie riscontrabili attraverso l'esame ultrasonografico vengono distinte in patologie congenite, focali e diffuse.

### Patologie congenite

Tra le patologie congenite si possono riscontrare delle malformazioni renali che possono coinvolgere anche altre strutture dell'apparato urinario. Tra queste, relativamente frequente risulta essere la malattia del rene policistico. Più rare risultano essere l'agenesia/ipoplasia renale, che si accompagna quasi sempre ad una ipertrofia compensatoria del rene controlaterale, e la displasia. Quest'ultima è caratterizzata da un'alterazione nello sviluppo del parenchima renale con conseguente differenziazione tissutale anomala e alterazione funzionale variabile in base al grado di displasia. Questa patologia può colpire diverse razze e si manifesta in genere in pazienti giovani (dai 4 mesi ai 2-3 anni); può presentarsi in maniera focale o diffusa e, in genere, evolve con una progressiva fibrosi bilaterale e formazioni di cisti. A livello ecografico la displasia renale subclinica si manifesta con la presenza di una midollare iperecogena, o con aspetto maculato, e con perdita della giunzione cortico-midollare. Gli organi gravemente colpiti mostrano dimensioni ridotte, profilo irregolare e parenchima diffusamente iperecogeno (D'Anjou et al., 2015).

In letteratura sono stati riportati anche casi di ectopia renale e la presenza di reni sovranumerari (D'Anjou et al., 2015).

---

Un'altra patologia spesso riscontrata è la nefropatia giovanile, che colpisce soprattutto i cani di razza Boxer, associata molte volte ad un difetto dello sfintere ureterale. Questa patologia mostra delle caratteristiche cliniche ed ecografiche simili alla displasia renale e deve essere dunque considerata come diagnosi differenziale in soggetti giovani che manifestano insufficienza renale (D'Anjou et al., 2015).

### Patologie focali

L'esame ultrasonografico del rene possiede una buona sensibilità e specificità nella diagnosi e nella caratterizzazione delle diverse patologie focali che possono interessare quest'organo.

Tra queste le più comuni sono le cisti, i nefroliti, le mineralizzazioni distrofiche e gli infarti corticali; tuttavia, è possibile riscontrare anche neoplasie, primarie o metastatiche, granulomi e ascessi (D'Anjou et al., 2015).

Le cisti renali benigne possono essere singole o multiple, possono avere dimensioni variabili e spesso sono localizzate a livello della corticale o della giunzione cortico-midollare. Presentano tipicamente una forma circolare, hanno un contenuto anecogeno e una sottile rima iperecogena; se contengono frammenti necrotici o sono accompagnate da emorragia, il loro contenuto può presentarsi maggiormente ecogeno.

La loro presenza può essere dovuta all'espressione di un gene autosomico dominante che genera la malattia policistica (ADPKD), soprattutto nei cani di razza Terrier e nei gatti di razza persiana. Questa patologia si accompagna molto spesso alla nefrite interstiziale cronica che determina, a sua volta, la destrutturazione del parenchima renale e quindi delle importanti alterazioni della funzionalità d'organo (D'Anjou et al., 2015).

Le cisti solitarie presentano in genere delle dimensioni elevate e hanno una struttura complessa, formata da frammenti e setti che le conferiscono spesso un aspetto simile ad una massa solida o cavitaria. Al loro interno possono contenere siero, sangue o materiale purulento (D'Anjou et al., 2015).

Gli ascessi possono essere differenziati dalle cisti per la presenza di echi interni o di sedimento e per il loro contorno irregolare. Nonostante ciò, per una diagnosi differenziale precisa, è necessaria l'esecuzione di un fine-needle aspiration (FNA) (D'Anjou et al., 2015).

---

Le masse o i noduli renali (granulomi, piogranulomi e ascessi solidi), essendo delle patologie proliferative del parenchima renale, possono avere delle caratteristiche molto variabili. Esse possono presentarsi come strutture più o meno omogenee, ipo o iperecogene e con margini definiti o irregolari. Questa variabilità è principalmente dovuta al tipo di cellule che ha dato origine alla neoformazione, alla presenza e al tipo di vascolarizzazione, alla presenza di necrosi, di fibrosi, mineralizzazione o emorragie. A differenza delle lesioni cistiche, le masse solide o i noduli sono caratterizzati dalla presenza di echi interni statici, di solito non associati a rinforzo acustico. In presenza di necrosi, tali lesioni, possono però mostrare delle caratteristiche sovrapponibili alle lesioni cavitari. Questa situazione si riscontra frequentemente in caso di cistoadenocarcinoma renale, che colpisce in genere il Pastore Tedesco. Questa patologia è caratterizzata dalla presenza di una o più lesioni cistiche che mostrano, a livello ecografico, contenuto anaecogeno e tendenza a infiltrare il parenchima renale. Simili caratteristiche possono essere manifestarsi in corso di cistoadenoma renale e teleangectasia renale, riportata nel Welsh Terrier; in questi casi, infatti, le masse cavernose contenenti sangue presentano un aspetto simil neoplastico (D'Anjou et al., 2015).

A causa delle loro caratteristiche variabili, le lesioni nodulari e le neoplasie (primarie o metastatiche) sono difficili da caratterizzare attraverso l'esame ecografico tradizionale; risulta quindi necessario il supporto di altri mezzi diagnostici per poter effettuare una diagnosi definitiva. Altre condizioni patologiche, come le mineralizzazioni dei tessuti e la presenza di uroliti, assumono un aspetto caratteristico all'esame ecografico. Esse appaiono come neoformazioni iperecogene e generano un cono d'ombra posteriore di dimensione variabile (D'Anjou et al., 2015).

Anche gli infarti della corticale renale presentano degli aspetti caratteristici, possono apparire come formazioni iperecogene lineari o a forma di cuneo con apice rivolta verso la corticale. Gli infarti cronici determinano, inoltre, una tipica depressione focale della corticale con atrofia parenchimale. Gli infarti renali benigni possono avere un aspetto simili agli emboli settici, ma questi presentano un aspetto eterogeneo e sono, inoltre, molto rari. Altre lesioni focali possono essere rappresentate dalla presenza di aree di gas all'interno del parenchima, causate da infezioni ematogene o ascendenti (D'Anjou et al., 2015).

---

## Patologie diffuse

Le patologie renali diffuse si manifestano in genere, a livello ecografico, con un'alterazione dell'ecogenicità della corticale e della midollare e con un'alterazione della struttura del parenchima.

Malattie come la displasia renale, la nefropatia giovanile, la necrosi tubulare acuta, la fibrosi in fase iniziale, la nefrite interstiziale, la nefropatia ipercalcemica e l'insufficienza renale cronica sono caratterizzate da un tipico aumento dell'ecogenicità della corticale rispetto alla midollare. Questo fenomeno appare esacerbato soprattutto in corso di necrosi tubulare acuta, in corso di deposizione di cristalli di ossalato di calcio e in caso di intossicazioni da glicole etilenico (D'Anjou et al., 2015).

In corso di patologie renali acute si assiste spesso ad un aumento dell'ecogenicità della midollare. Questo aumento può essere omogeneo e diffuso, in corso di malattie infettive come la Leptospirosi, o può essere localizzato a formare una banda parallela alla giunzione cortico-midollare, come avviene in caso di congestione, edema, necrosi o emorragie. Questo ritrovamento ecografico viene definito "midullaryrimsign" ed è spesso associato a patologie renali acute ma poiché viene spesso rilevato anche in pazienti sani, non può essere considerato un segno patognomonico. In presenza di lesioni renali croniche si assiste invece ad un aumento dell'ecogenicità di tutto il parenchima renale, con perdita della distinzione della giunzione cortico-midollare. In questi casi il rene può presentare anche delle alterazioni della forma e una notevole riduzione del volume. Le neoplasie infiltrative, come ad esempio il linfoma o il mastocitoma, e la trombosi venosa renale sono spesso associate ad una riduzione dell'ecogenicità della corticale, spesso accompagnata ad un aumento del volume dell'organo (D'Anjou et al., 2015).

Lo studio ecografico del rene deve valutare, oltre alle variazioni di ecogenicità del parenchima, anche la forma, le dimensioni, i margini e la struttura interna dell'organo che possono risultare variamente alterate in corso di diverse patologie renali. In corso di nefrite interstiziale cronica i reni si presenteranno tipicamente di piccole dimensioni, di forma irregolare e diffusamente iperecogeni. La fibrosi renale determina invece un processo di rimodellamento a livello parenchimale che genera, a sua volta un'alterazione dell'architettura. Questa può manifestarsi anche con la formazione di aree di mineralizzazioni a livello del sistema collettore; queste si evidenziano ecograficamente come focolai iperecogeni, più o meno definiti, che generano un cono



d'ombra posteriore. Lesioni di questo tipo devono comunque essere differenziate dalla presenza di veri e propri uroliti, che spesso si rilevano in corso di malattia renale cronica (D'Anjou et al., 2015).

I reni affetti da disordini di diffusi, come l'amiloidosi renale, la malattia glomerulare proteino-disperdente e la glomerulonefrite si presentano ecograficamente iperecogeni e possono avere delle dimensioni variabili in base alla gravità e alla cronicità del processo. Queste patologie risultano infatti difficilmente differenziabili utilizzando esclusivamente l'esame ecografico. Anche le mineralizzazioni parenchimali (nefrocalinosi) possono causare una iperecogenicità diffusa, sia a livello della corticale che della midollare, e/o la presenza di focolai iperecogeni multipli (D'Anjou et al., 2015).

Le neoplasie renali causano in genere la formazione di lesioni nodulari, singole o multiple, ad eccezione del linfoma renale nel gatto. In questo caso i reni appariranno aumentati di dimensioni irregolari, iperecogenie spesso presento anche un tipico ispessimento sottocapsulare ipoecogeno. Anche altre neoplasie come il carcinoma squamocellulare o il nefroblastoma possono presentare un carattere infiltrativo e possono provocare alterazioni nell'architettura dell'organo (D'Anjou et al., 2015).

### Nefropatia cronica

L'esame ecografico rappresenta la tecnica diagnostica di prima scelta nella valutazione del paziente nefropatico in quanto consente di valutare la morfologia, la struttura e la vascolarizzazione dei reni e dell'apparato urinario. Utilizzando questa tecnica diagnostica è possibile studiare l'aspetto ecografico del parenchima renale, valutandone l'ecogenicità e mettendo in evidenza alterazioni strutturali e anatomiche della corticale, della midollare e del bacinetto renale. Attraverso l'ecografia è possibile, infatti, riscontrare diverse lesioni patologiche come, ad esempio, la presenza di strutture cistiche e nodulari a livello parenchimale, la presenza di calcoli presenti a livello della pelvi o la dilatazione patologica del bacinetto renale (idronefrosi). Oltre ai reni, l'ecografia consente di studiare la morfologia degli ureteri e della vescica, permettendo di evidenziare, anche in questo caso, lesioni strutturali e la presenza di calcoli e/o sedimento (Nyland et al., 2015).

L'ecografia assume un ruolo molto importante nella valutazione del paziente nefropatico. Diversi studi hanno infatti dimostrato come alcune alterazione ecografiche

siano correlate ai diversi stadi della malattia renale cronica. In particolare, un aumento dell'ecogenicità della corticale associato ad un'alterazione del rapporto cortico/midollare e ad una riduzione del volume dell'organo è stato correlato ad uno stadio avanzato di IRC con prognosi sfavorevole (Bragato et al., 2017; Perondi et al., 2020).

Nella diagnosi e nella stadiazione dei soggetti affetti da IRC, oltre alle alterazioni strutturali sopracitate, è importante studiare la vascolarizzazione dell'organo e valutarne la perfusione. È noto, infatti, che i meccanismi patogenetici che si innescano in seguito ad un insulto parenchimale provocano una serie di cambiamenti morfologici e strutturali. Questi determinano a loro volta la progressiva formazione di tessuto cicatriziale e fibrosi renale che, alterando la vascolarizzazione dell'organo, provocano una riduzione della perfusione (Nestola et al., 2018).

L'esame ecografico risulta essere un ottimo mezzo diagnostico per valutare l'emodinamica renale ed evidenziarne tali alterazioni. In medicina veterinaria, come in medicina umana, la valutazione della perfusione renale viene spesso effettuato utilizzando l'ecografia con mezzo di contrasto (CEUS- Contrast Enhanced Ultrasound). Questa metodica, poco invasiva e di facile applicazione, permette di valutare in modo efficace pazienti con funzionalità renale ridotta mediante l'analisi quantitativa e qualitativa della vascolarizzazione dell'organo (Girometti et al., 2017; Lee et al., 2017; Dong et al., 2017). La metodica CEUS viene ampiamente utilizzata anche per la diagnosi e la valutazione di lesioni nodulari e neoplasie, al fine di evidenziarne l'aspetto morfologico, la struttura e la vascolarizzazione (Haers et al., 2010).

L'esame ecografico, oltre ad essere un importante mezzo diagnostico, viene anche ampiamente utilizzato per effettuare manovre interventistiche ecoassistite e/o ecoguidate. Le procedure maggiormente effettuate sono: il campionamento di liquidi, che possono essere presenti in sede subcapsulare o all'interno di lesioni cistiche; drenaggi e inserimento di cateteri a livello del bacinetto renale; centesi vescicale; campionamenti da parenchima e prelievi biotici (Meomartino et al., 2014).

## **Scintigrafia renale**

La scintigrafia renale è una metodica diagnostica nucleare che consente di studiare la morfologia e la funzionalità renale attraverso l'utilizzo di radiofarmaci. Utilizzando

traccianti con caratteristiche differenti è possibile valutare la filtrazione glomerulare, la velocità di filtrazione glomerulare, la funzione tubulare e la velocità di eliminazione dell'urina a livello dell'apparato urinario. I radiofarmaci più utilizzati, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, sono quelli marcati con Tecnezio 99 metastabile (Volterrani et al., 2010). Queste sostanze, dopo iniezione endovenosa, decadono ed emettono un fotone che, rilevato da una gamma camera, permette l'acquisizione sia di immagini 2D, statiche o dinamiche, che immagini 3D (metodica SPECT-Photon Emission Computed Tomography) (Blaufox et al., 2018).

La scintigrafia renale statica viene eseguita somministrando al paziente il <sup>99</sup>Tc-DMSA. Questa metodica permette di evidenziare, con alta sensibilità e specificità, le porzioni del parenchima non vascolarizzate ed è soprattutto indicata per la ricerca di aree colpite da esiti cicatriziali, per la valutazione di masse occupanti spazio o per determinare la malattia del rene policistico (Buyukdereli et al., 2006).

La scintigrafia renale dinamica o sequenziale è la metodica più utilizzata per lo studio della funzione separata dei reni. Utilizzando diversi tipi di traccianti è infatti possibile creare delle curve radioattività-tempo, o renogrammi, che permettono di valutare gli indici di funzionalità renale sopra descritti e l'eliminazione dell'urina attraverso l'apparato urinario (Volterrani et al., 2010; Blaufox et al., 2018). I traccianti più utilizzati e le loro caratteristiche sono illustrati in tabella 6.

Radiofarmaco	Funzione studiata
99mTc-DTPA (acido dietilamminopentacetico)	Velocità di filtrazione glomerulare (VFG)
131I o 123I-Hippuran	Flusso plasmatico renale
99mTc-DMSA (acido dimetilcaptosuccinico)	Funzione tubulare, questo tracciante una volta escreto dal tubulo contorto prossimale si accumula nella corticale renale. Permettendo di stimare la massa totale di nefroni mediante immagini statiche
99mTc-MAG3 (mercaptoacetil-glicerina)	Questo tracciante è eliminato sia per filtrazione glomerulare sia per secrezione tubulare ed è rapidamente allontanato dal rene. Usando immagini dinamiche è possibile ottenere stime del tasso di filtrazione glomerulare

**Tabella 6.** Radiofarmaci più utilizzati. Caratteristiche e proprietà dei principali traccianti

L'indagine ha una durata complessiva che varia dai 15 ai 30 minuti. Le immagini acquisite dopo l'iniezione endovenosa del radiofarmaco vengono sottoposte ad un'analisi qualitativa, in cui viene valutata prevalentemente la perfusione generale dell'organo. Viene inoltre effettuata un'analisi semiquantitativa in cui vengono studiate precise aree del parenchima corticale e midollare di entrambi i reni, definite definite ROI. Utilizzando particolari algoritmi, l'analisi semiquantitativa permette di misurare la radioattività in funzione del tempo e di elaborare delle apposite curve, definite appunto renogrammi. (Blafox et al., 2018; Zheng et al., 2017). La scintigrafia viene anche utilizzata per diagnosticare e studiare la stasi urinaria e l'ipertensione nefrovascolare. La prima viene valutata somministrando un farmaco diuretico, la furosemide, per via endovenosa durante la fase di eliminazione della scintigrafia. Utilizzando questo test è possibile differenziare la stasi urinaria dovuta alla dilatazione delle vie escretrici, rispondente al diuretico, da quella causata da un'ostruzione del flusso, non rispondente al farmaco (Volterrani et al., 2010; Blafox et al., 2018).

La valutazione dell'ipertensione viene invece effettuata sfruttando l'effetto di un ACE-inibitore, il captopril, somministrato anch'esso per via endovenosa. Un'ora dopo l'inoculazione viene eseguita la scintigrafia e l'acquisizione delle immagini verrà sottoposta, anche in questo caso, ad analisi quantitativa e semiquantitativa. Attraverso lo studio dei due renogrammi ottenuti sarà possibile stimare il tempo di transito del radiofarmaco in entrambi gli organi ed evidenziarne la riduzione della velocità o, nelle forme più gravi, la sua scomparsa (Volterrani et al., 2010; Blafox et al., 2018).

## **Biopsia renale**

La biopsia renale è una procedura diagnostica utile per acquisire informazioni riguardanti la gestione di soggetti affetti da malattie glomerulari, tubulari e miste o che presentano malattie sistemiche. L'esecuzione della biopsia renale è indicata nei pazienti che manifestano proteinuria ingravescente non responsiva al trattamento terapeutico, sindrome nefrosica, insufficienza renale con rapida progressione e necrosi tubulare acuta (Littman et al., 2013; Zatelli et al., 2014).

---

In medicina umana sono stati effettuati diversi studi prospettici che hanno evidenziato come questa indagine fornisca dati utili per la diagnosi, la prognosi e la gestione terapeutica dei pazienti affetti da queste patologie (Bandar et al., 2016). Tale procedura risulta tuttavia controindicata nel caso in cui siano presenti disordini della coagulazione, grave ipoalbuminemia, ostruzione delle vie escretrici associata a idronefrosi, presenza di rene policistico o con danno cronico in fase terminale. È inoltre sconsigliata nel caso in cui il paziente presenti agenesia monolaterale o abbia subito una nefrectomia. Risulta essere, infine, di scarsa utilità nel caso in cui l'esame ecografico metta in evidenza la presenza di organi di dimensioni ridotte, iperecogeni e con riduzione del rapporto cortico-midollare. In questi casi, infatti, è probabile che l'esame istologico rilevi solamente la fibrosi e la sclerosi parenchimale e non dia informazioni utili per la prognosi e la terapia del paziente (Lees et al., 2011; Zatelli et al., 2014).

La biopsia renale può essere effettuata mediante tecnica percutanea incisionale, tecnica ecoguidata, mediante laparoscopia o chirurgia tradizionale. Il tessuto viene prelevato utilizzando aghi da biopsia o tru-cut, fissato in formalina e sottoposto successivamente a esame istologico, esame di immunofluorescenza o microscopia elettronica. È importante sottolineare che il campione bioptico deve essere costituito soltanto da porzioni di parenchima corticale, al fine di ridurre il rischio di sanguinamenti (Lees et al., 2011; Zatelli et al., 2014).

Bisogna inoltre ricordare che il valore delle informazioni ottenute attraverso questa procedura dipende dalle dimensioni del campione prelevato, dall'integrità del campione e dalla sua processazione. La corretta esecuzione di questa procedura permette, come detto in precedenza, di ottenere delle informazioni che riguardano la morfologia del tessuto; queste, correlate alla sintomatologia clinica e ai risultati delle analisi di laboratorio, possono rappresentare un valido strumento diagnostico (Aresu et al., 2017).

## **Stadiazione**

Nel 1998 venne fondata l'International Renal Interest Society; questa associazione aveva lo scopo di individuare i migliori metodi per diagnosticare precocemente la IRC nel cane e nel gatto e studiare nuovi protocolli terapeutici. L'IRIS ha infatti creato delle linee guida per la diagnosi, la stadiazione ed il trattamento della IRC che sono state riconosciute dalle Società di Nefrologia e Urologia sia americane che europee. Queste

linee guida, aggiornate nel 2019, si basano sulla valutazione della funzionalità renale, della proteinuria e della pressione arteriosa, e classificano i pazienti affetti da IRC in 4 stadi. L'utilità di questa stadiazione risiede soprattutto nella possibilità di emettere una prognosi quanto più precisa per i pazienti nefropatici e di migliorarne la gestione terapeutica (<http://www.iris-kdney.com/>).

La valutazione della funzionalità renale viene effettuata tramite la misurazione della creatinina sierica, dell'azotemia e dell'SDMA come riportato nella tabella 7 (Fleck et al., 2003; Di Bartola et al., 2002).

Il dosaggio della creatinina deve essere effettuato con il paziente a digiuno e in buono stato di idratazione, in modo tale da accertare la stabilità della malattia renale cronica; inoltre, è sempre consigliabile eseguire una concomitante valutazione del peso specifico urinario e delle condizioni cliniche del soggetto (Fleck et al., 2003; Di Bartola et al., 2002).

Stadio	Creatininasierica (mg/dl)		Commenti
	Cane	Gatto	
A rischio	< 1,4mg/dL  SDMA<18 µg/dL	<1,6mg/dL  SDMA<18 µg/dL	L'anamnesi è suggestiva di un rischio maggiore in futuro di sviluppare CKD per svariati fattori (esposizione a nefrotossine, razza, età)
1	< 1,4 mg/dL  SDMA<18 µg/dL	< 1,6 mg/dL  SDMA<18 µg/dL	Nonazotemico. Possono essere presenti alter anomalie (peso specific urinario inadeguato, palpazione renale anomala, proteinuria di origine renale)
2	1,4 – 2,8 mg/dL	1,6 – 2,8 mg/dL	Lieve azotemia. Segni clinica lievi o assenti.

	SDMA 18-35 μg/dL	SDMA 18-25 μg/dL	
3	2,9 – 5,0 mg/dL	2,9 – 5,0 mg/dL	Azotemia moderata. Possono essere presenti segni clinici extra renali.
	SDMA 36-54 μg/dL	SDMA 26-38 μg/dL	
4	> 5,0 mg/dL	> 5,0 mg/dL	Aumentato rischio di segni clinici sistemici e crisi uremiche.
	SDMA>54 μg/dL	SDMA>38 μg/dL	

**Tabella 7.** Stadiazione dell'insufficienza renale cronica secondo il sistema IRIS ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com))

La stadiazione IRIS della IRC prevede anche una sottostadiazione, effettuata sulla base della valutazione della proteinuria (tabella 4) e della pressione arteriosa (tabella 8) ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com)).

Sottostadio	Valore di UPC	
	Cane	Gatto
Non proteinurico	< 0,2	< 0,2
<i>Borderline</i> proteinurico	0,2 – 0,5	0,2 – 0,4
Proteinurico	> 0,5	> 0,4

**Tabella 8.** Sottostadiazione dell'insufficienza renale cronica secondo il sistema IRIS ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com))

La proteinuria viene stimata tramite la valutazione dell'UPCR. In caso di alterazione di tale parametro è necessario escludere la presenza di infezioni delle vie urinarie, ematuria, o disprotidemia. Il valore di UPCR andrebbe valutato in tre campioni raccolti nell'arco di due settimane prima di poter determinare con certezza lo stadio. I pazienti che presentano proteinuria borderline dovrebbero essere rivalutati dopo due mesi per essere classificati correttamente (Fleck et al., 2003; Di Bartola et al., 2002).

Sottostadio	Pressionesistolica (mmHg)	Pressionediastolica (mmHg)
0	< 140	< 95
1	140 - 159	95 - 99
2	160 - 179	100 - 119
3	>180	>120

**Tabella 9.** Sottostadiazione dell'insufficienza renale cronica secondo il sistema IRIS ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com))

Anche la valutazione della pressione arteriosa deve essere effettuata su misurazioni multiple, eseguite nel corso di alcune settimane. Il rischio di target-organ damage è minimo nel sottostadio 0 e massimo nel sottostadio 3 ([www.iris-kidney.com](http://www.iris-kidney.com); Polzin et al., 2011).



# **Seconda parte: l'ecografia con mezzo di contrasto e la perfusione renale**

## **3 L'ecografia con mezzo di contrasto- CEUS**

L'ecografia con mezzo di contrasto, conosciuta anche come CEUS (Contrast-Enhancement Ultrasound), è una particolare tecnica ecografica che permette di studiare in modo approfondito la vascolarizzazione di organi e tessuti. Come affermato in precedenza, la metodica CEUS è una tecnica diagnostica poco costosa, sicura per il paziente e facilmente applicabile nella pratica clinica. Essa consente di acquisire importanti informazioni relative alla perfusione e alle lesioni parenchimali degli organi presi in esame, fornendo un valido ausilio nell'iter diagnostico di diverse patologie (Quaia et al., 2015).

La CEUS viene effettuata utilizzando particolari mezzi di contrasto endovenosi (MDC), costituiti da microbolle di gas inerti contenuti all'interno di un guscio di rivestimento. Per poter essere utilizzate durante un esame ecografico, queste sostanze, devono avere determinate caratteristiche di base: devono essere inerti, devono poter essere iniettati per via endovenosa (tramite bolo o infusione), devono essere stabili durante il passaggio a livello del circolo polmonare, devono permanere all'interno del torrente circolatorio o avere una distribuzione tissutale specifica e devono avere una durata d'effetto pari al tempo necessario per effettuare lo studio. Le microbolle devono inoltre avere un diametro costante e devono rispondere in un determinato modo al picco di pressione incidente degli ultrasuoni ecografici (Quaia et al., 2015).

I mezzi di contrasto utilizzati in medicina umana e in medicina veterinaria vengono classificati in base alle loro caratteristiche, composizione, utilità, diffusione e generazione.

I MDC di prima generazione sono costituiti da bolle di gas contenute all'interno di un guscio rigido costituito da acido palmitico e galattosio, che conferisce una notevole resistenza all'elevata pressione a cui è sottoposto nel circolo ematico (Quaia et al., 2005; Imperatore et al., 2004). A questa categoria di MDC appartiene il Levovist®, costituito da bolle di 2-3 micron, utilizzato soprattutto per lo studio della milza e del

fegato, poiché presenta una distribuzione organo specifica dopo la scomparsa dal torrente circolatorio (Burns et al., 2004). Questi mezzi di contrasto, rispetto agli altri, presentano delle bolle di diametro inferiore, caratteristica gli permette di attraversare il circolo polmonare, ma presentano anche una minore stabilità all'interno del circolo ematico. Utilizzando questi MDC infatti non è possibile eseguire un esame dinamico in tempo reale, ma soltanto un'immagine della durata di pochi millisecondi che riflette la vascolarizzazione dell'organo tramite mappatura visiva delle regioni vascolarizzate. Questa immagine viene ottenuta mediante l'utilizzo della tecnica Flash Echo Imaging o Emissione Acustica Stimolata (EAS), che prevede la massiccia rottura delle bolle provocata dall'erogazione di un'elevata potenza da parte dell'operatore (Quaia et al., 2005; Imperatore et al., 2004).

I MDC di seconda generazione sono costituiti da microbolle contenenti un gas con bassa capacità di diffusione e bassa solubilità; questo gas è contenuto all'interno di un guscio che possiede un grado di elasticità maggiore rispetto a quello dei MDC di prima generazione. Fanno parte di questa categoria: il SonoVue®, costituito da microbolle di 5-6 micron contenenti esafloruro di zolfo racchiuso in un guscio fosfolipidico; l'Optison®, registrato in Europa e il Definity® registrato negli USA e in Canada. Questi sono costituiti da microbolle contenenti perfluoruro-propano racchiuso in un guscio esterno formato da albumina umana (Quaia et al., 2005; Imperatore et al., 2004).

I MDC di terza generazione sono ancora in fase sperimentale, l'obiettivo principale è quello di creare un prodotto che abbia una maggiore stabilità all'interno del circolo ematico (Rossi, et al., 2004).

I MDC fin ora citati sono tutti registrati per l'utilizzo in medicina umana, ma, considerato che il loro utilizzo su un discreto numero di cani e gatti non ha riportato gravi effetti indesiderati, questi vengono adoperati in deroga in medicina veterinaria utilizzando i dosaggi riportati in tabella 10 (Ohlerth et al., 2007; Seiler et al., 2013).

Agente commerciale	Dosaggio per uso veterinario	Letteratura
Levovist® (Schering AG)	Cani e gatti: 80mg/kg	Scharz et al., 2005 Rademacher et al., 2005
Definity® (Bristol Myers Squibb)	Cani < 20 kg: 0,1mL Cani > 20 kg: 0,2mL	O'Brien et al., 2004 R. O'Brien (non

	Gatti: 0,1mL	pubblicato)
Optison® (AmershamHealth Inc.)	Cani: 0,5mL	Yamaya et al., 2002
SonoVue® (Bracco)	Cani: 0,04 0,06mL/kg (0,2 0,3mg/kg) Cani < 20kg: 0,5mL (2,5mg) Cani > 20kg: 1,0mL (5mg) Cani: 0,03mL/kg (0,15mg/kg)	Nyman et al., 2005 O'Brien et al., 2004 Ohlerth et al., 2005

**Tabella 10.** Dosaggi dei principali MDC riportati in letteratura per uso veterinario (Ohlerth et al., 2007)

## Meccanismo d'azione

### **PRINCIPI FISICI, TECNICHE CONTRASTO SPECIFICHE E MEZZI DI CONTRASTO**

L'ecografia con mezzo di contrasto consente di potenziare la visualizzazione del flusso sanguigno e la vascolarizzazione di organi e tessuti rispetto all'ecografia tradizionale. Questa condizione viene ottenuta aumentando l'impedenza acustica dei tessuti in cui si trova il contrasto e, di conseguenza, la loro capacità di riflessione del fascio ultrasonoro incidente. In questo modo si ottiene un aumento del rapporto segnale/rumore (SNR) e una migliore capacità di distinzione tissutale (Imperatore et al., 2004; Liu et al., 2005). Questa intensificazione del segnale di ritorno è resa possibile grazie alla capacità delle microbolle di diffondere in ogni direzione i raggi ultrasonori ricevuti (scattering) in modo direttamente proporzionale alla frequenza degli ultrasuoni emessi. L'amplificazione del riflesso rispetto alla frequenza di insonazione, ottenuto mediante la tecnica CEUS, si realizza in virtù del fatto che i tessuti esercitano uno scattering e generano un segnale inferiore rispetto a quello generato dalle microbolle del MDC. La differenza di enhancement delle microbolle e la semplice riflessione dei tessuti permette quindi una netta distinzione tra parenchima e MDC. Questa proprietà di amplificazione del segnale di ritorno della tecnica CEUS si verifica grazie alla capacità che possiedono

le microbolle di variare il loro diametro in relazione alla frequenza del fascio ultrasonoro (Imperatore et al., 2004; Liu et al., 2005).

È importante sottolineare che questo meccanismo di scattering si osserva utilizzando una specifica frequenza, definita fondamentale ( $f_0$ ). Utilizzando questa frequenza, infatti, le microbolle rispondono alla pressione positiva e negativa dell'onda sinusoidale, manifestando un comportamento oscillatorio e modificando il loro diametro (Ohlerth et al., 2007). In particolare, durante la fase di pressione acustica positiva queste si comprimono, diminuendo il loro raggio e il loro volume; al contrario, durante la fase negativa le particelle si allontanano dal mezzo di conduzione dell'onda, dunque si dilatano e aumentano le loro dimensioni. Ad ogni variazione di volume le microbolle liberano un certo grado di energia che andrà a sommarsi all'energia riflessa tramite lo scattering. Si otterrà così una frequenza di ritorno maggiore rispetto alla frequenza  $f_0$ , che conterrà delle frequenze armoniche con dei valori multipli rispetto alla frequenza fondamentale; questo fenomeno viene definito risonanza (Ohlerth et al., 2007).

Il fenomeno di risonanza è una caratteristica esclusiva delle particelle del MDC e non può essere prodotta dai tessuti. Inoltre, questo fenomeno non si realizza in caso di frequenze con valori più bassi o eccessivamente elevati rispetto a  $f_0$ ; infatti, in caso di frequenze con valori pari o inferiori a  $f_0$ , le microbolle del MDC non entrano in risonanza e manifesteranno un comportamento lineare (non oscillatorio) in cui il loro raggio rimane invariato sia nella fase di pressione acustica positiva che negativa. In questo caso il segnale di ritorno non sarà amplificato e si otterrà soltanto il riflesso di insonazione del sangue in cui è presente il MDC (Quaia et al., 2005). In caso di frequenze con valori eccessivamente alti si verifica un'enfaticizzazione del comportamento non lineare con conseguente implosione delle microbolle, dispersione del gas nel torrente circolatorio ed emissioni di un segnale non lineare ad ampia banda (Rossi et al., 2007; Quaia et al., 2005). Da questo si evince che per avere una buona risposta armonica delle microbolle è quindi importante che la frequenza fondamentale fornita sia più possibile vicina al valore di risonanza delle microbolle. In letteratura vengono riportati valori compresi tra 4MHz e 6 MHz per la maggior parte di mezzi di contrasto, per il SonoVue® vengono invece riportati valori compresi tra 1 MHz e 10 MHz (Quaia, 2005).

La potenza può essere regolata nell'apparecchio ecografico variando il valore dell'unità in kilo Pascal, modificando il settaggio dell'Indice Meccanico (MI). Attraverso questa funzione viene impostata la pressione acustica del fascio ultrasonoro sulle strutture

insonate (MDC e tessuti), che deve dunque essere sufficientemente alta in modo da produrre una buona risposta armonica (Rossi et al., 2008).

In letteratura si trovano tre valori soglia dell'indice meccanico per i quali il comportamento delle microbolle risulta diverso. Per valori di IM inferiori a 0.1 MPa avremo una risposta di semplice riflessione; per valori compresi tra 0.1 MPa e 0.5 MPa avremo la riflessione di onde armoniche; per valori maggiori di 0.5 MPa avremo la rottura delle particelle del MDC (Rossi et al., 2008).

Come detto precedentemente, i MDC utilizzati nella tecnica CEUS devono possedere determinate caratteristiche di struttura necessarie alla loro visualizzazione e ad un'adeguata persistenza all'interno del torrente circolatorio. Di fondamentale importanza risulta essere la dimensione e il numero delle microbolle che vengono introdotte nel circolo ematico, poiché l'intensità del segnale è il prodotto del numero delle microbolle moltiplicato per il coefficiente di ecogenicità di ogni singola bolla. Le particelle devono inoltre possedere un diametro che consenta il passaggio a livello del circolo polmonare ma che ne impedisca il passaggio attraverso l'endotelio vasale, garantendo in questo modo l'assenza di una fase interstiziale (Tang et al., 2011). Un'altra importante caratteristica è la membrana di rivestimento delle microbolle che deve avere una scarsa solubilità in acqua, garantita dalla presenza del galattosio, e deve presentare un grado di elasticità tale da permettere al guscio di modificare il suo diametro, consentendo così il comportamento definito "oscillatorio". Il guscio può inoltre essere rivestito dal surfactante, una sostanza che impedisce la diffusione del gas all'esterno del letto circolatorio e determina una riduzione della tensione superficiale delle microbolle (Liu et al., 2005).

Per quanto concerne il gas contenuto all'interno del guscio, questo deve essere comprimibile, deve avere un coefficiente di diffusione e una pressione osmotica interna tali da consentire il comportamento oscillatorio. Queste caratteristiche trovano conferma nella legge modificata di Laplace secondo cui il tempo di sopravvivenza (T) di una microbolla all'interno del circolo sanguigno è direttamente proporzionale alla sua dimensione ( $r^2$ ) e alla densità del gas, inversamente proporzionale alla capacità del gas di diffondere all'esterno attraverso la membrana (D) e alla costante di saturazione del gas stesso nel sangue ( $C_s$ ) (Quaia, 2005).

Per i motivi sopracitati è facile comprendere i vantaggi dell'utilizzo di un MDC costituito da microbolle di esafluoruro di zolfo racchiuse in una matrice fosfolipidica. Questi MDC, rispetto agli altri, presentano una stabilità prolungata all'interno della fiala

dopo la ricostituzione (6 ore) e all'interno del letto vascolare (6 minuti); presentano inoltre delle dimensioni uniformi, caratteristica che migliora la retrodiffusione e il comportamento armonico a basso potere acustico. L'esafluoruro di zolfo inoltre essendo un gas inerte e poco solubile in acqua crea un'interfaccia tra bolla di gas e il mezzo acquoso che agisce come riflettore del fascio, aumentando il contrasto tra sangue e tessuti (Quaia, 2005).

Per poter effettuare un esame ecografico con tecnica CEUS ed ottenere dei dati significativi è inoltre indispensabile possedere dei software particolari, che devono essere in grado di amplificare il segnale proveniente dal MDC rispetto a quello proveniente dai tessuti. I primi software sviluppati per l'utilizzo della tecnica CEUS utilizzavano il principio della filtrazione del segnale armonico sulla base della frequenza di ricezione. Utilizzando questo metodo si produceva però una parziale sovrapposizione dello spettro di frequenza prodotta dal tessuto e dal MDC, con conseguente perdita di importanti informazioni (Rossi et al., 2007).

Successivamente venne introdotto il Pulse Inversion Imaging. Questa tecnologia si basava sulla produzione di una sequenza di ultrasuoni, inviati da due impulsi speculari (in fase opposta a 180 gradi), in cui la componente fondamentale dello spettro di ritorno, sommandosi, si annulla. In questo modo il segnale prodotto dal tessuto di ritorno viene eliminato e rimane solamente la componente armonica delle microbolle che, grazie alla forma armonica, produce un segnale che può essere rilevato dal software. Uno svantaggio di questa tecnica è rappresentato da un certo grado di riduzione del frame rate. Questo punto critico venne superato grazie all'introduzione di un altro sistema, il Cadence Contrast Sequencing Technology (CPS, Simens). Questo sistema usa una complessa sequenza di impulsi, con fasi e intensità diverse, in grado di sfruttare sia le sequenze fondamentali sia le frequenze armoniche del segnale di ritorno (Rossi, 2007).

Di recente è stata elaborata una nuova tecnica di esecuzione, il Contrast Tuned Imaging (CnTI, Esaote Medmark), caratterizzato dall'emissione una stretta banda di ultrasuoni associata ad una selezione del segnale di seconda armonica di ritorno. Grazie a questa tecnologia è possibile visualizzare in modo efficace il mezzo di contrasto ottenendo una buona soppressione del segnale di fondo, emesso dal tessuto (Rossi, 2007).

---

---

---

## **Metodica d'esecuzione**

I mezzi di contrasto sono sostanze isotoniche rispetto al plasma, possono quindi essere somministrate sia nel circolo ematico sia all'interno di strutture cavitari al fine di intensificare il segnale ultrasonoro (Quaia, 2005).

L'iniezione endovenosa può essere effettuata attraverso bolo o tramite infusione lenta, previo posizionamento di un catetere endovenoso periferico a livello della vena cefalica. La somministrazione del mezzo di contrasto non genera dolore o fastidio, dunque la procedura può essere effettuata senza sedazione o anestesia con il paziente posto in decubito dorsale o laterale. Qualora si renda necessario, è comunque possibile eseguire la procedura in sedazione (Rossi, 2007).

La somministrazione in bolo del mezzo di contrasto attraverso il catetere endovenoso (è consigliato un catetere con dimensione uguale o superiore a 20 Gauge) deve essere seguita da un'iniezione di soluzione salina di 5-10 ml utilizzando un catetere a tre vie (Seiler et al., 2013), necessaria a rimuovere le microbolle che permangono all'interno del catetere e delle porzioni prossimali nel vaso (Rossi, 2007). L'intensificazione del segnale ultrasonoro, generata dal contrasto dopo iniezione in bolo, è direttamente proporzionale alla dose somministrata; infatti, è stato evidenziato che un inconveniente correlato all'utilizzo di questa metodica è proprio la creazione di artefatti nel momento di massima intensità. In virtù di queste osservazioni è possibile somministrare il MDC in maniera continua, utilizzando una pompa ad infusione o una pompa siringa. Questa metodica viene quindi prevalentemente utilizzata quando si vuole quantificare la perfusione parenchimale con un livello stazionario di microbolle (Quaia, 2005).

Indipendentemente dalla metodica che si intende utilizzare, prima di iniettare il MDC a livello del circolo ematico è necessario identificare con sistema ultrasonografico convenzionale la struttura o la lesione da esaminare. Successivamente si procede al settaggio del sistema dedicato alla visualizzazione del MDC, affinché il segnale proveniente dal tessuto venga soppresso. L'immagine generata prima dell'arrivo del mezzo di contrasto risulta quindi quasi totalmente anecoica, viene mantenuto soltanto un debole segnale da un'interfaccia o da una struttura che viene utilizzata come punto di riferimento. La maggior parte dei sistemi oggi utilizzati è provvista di un sistema *dual screen*, questo permette all'operatore di osservare l'immagine convenzionale, in scala di grigi e l'immagine rivelatrice del MDC. Una volta settato il sistema si procede

all'iniezione del MDC e contemporaneamente viene attivato il timer; il flusso all'interno dell'organo o della struttura da esaminare viene visualizzato in tempo reale e contestualmente registrato su un supporto digitale, al fine di poter effettuare valutazioni successive (Quaia, 2005).

Bisogna ricordare che un importante punto critico di questa procedura è rappresentato proprio dal settaggio dell'apparecchiatura. Per ottenere dei risultati soddisfacenti e una diagnosi precisa è necessario ottimizzare i parametri fondamentali dell'apparecchio quali, ad esempio, l'IM, il gain totale, il Time Gain Compensation o CGC, il numero o la posizione dei fuochi. È necessario, dunque, che gli operatori acquisiscano una formazione specifica e delle competenze adeguate, proprio per questo motivo l'EFSUMB ha definito tre livelli di formazione (Piscaglia e al., 2012).

Come accennato in precedenza, durante l'esecuzione della metodica CEUS, possono presentarsi degli artefatti causati principalmente da errori nel settaggio dell'apparecchiatura o da somministrazioni di dosi errate di MDC. In particolare, questi artefatti possono essere provocati da una errata impostazione dell'IM, che determina la distruzione delle bolle; dalla ricezione di falsi segnali di contrasto positivo in aree che non sono vascolarizzate; da un'attenuazione causata da una dose elevata di MDC; da un mal posizionamento dei fuochi durante lo studio o dall'influenza del frame rate sulla risoluzione spaziale (Dietrich et al., 2012).

### **Metodologia di analisi**

La CEUS gioca un ruolo molto importante anche nella caratterizzazione di lesioni focali o multifocali; queste possono essere rilevate attraverso l'esame ecografico tradizionale, ma poiché presentano in genere caratteristiche di ecogenicità simili a quelle del tessuto circostante risultano spesso difficili da identificare. Questa metodica permette non soltanto di identificare ma anche di realizzare una classificazione diagnostica di tali lesioni attraverso l'acquisizione di importanti informazioni riguardanti il numero, la posizione, le dimensioni ed il loro grado di vascolarizzazione. Queste indicazioni risultano essere molto utili nella pratica clinica per poter differenziare lesioni a neoplastico, sia di origine primaria che secondaria, e per poter effettuare una stadiazione ecografica in pazienti oncologici che presentano metastasi in organi come fegato, milza e linfonodi drenanti.

---



Durante l'esame ecografico con mezzo di contrasto si verifica una fase iniziale di enhancement del tessuto, generata dal passaggio delle microbolle contenute nel circolo ematico; successivamente si assiste ad una fase di massima riflessione dei vasi, che corrisponde alla massima intensità di luminescenza. A questa segue una fase di progressiva diminuzione dell'enhancement, che corrisponde al periodo di allontanamento delle microbolle veicolate dal circolo venoso del tessuto preso in esame. Queste tre fasi, definite rispettivamente *fase di wash in*, *plateau* e *wash out*, presentano caratteristiche differenti proprie per ogni organo, tessuto o lesione presa in esame. L'analisi dello studio e l'interpretazione dei risultati ottenuti attraverso la metodica CEUS viene effettuata attraverso un'analisi qualitativa e quantitativa delle immagini acquisite (Rossi, 2007; Quaia, 2005).

L'analisi qualitativa della distribuzione del MDC, nell'unità di tempo, è soggettiva. La valutazione della perfusione tissutale, ottenuta attraverso l'acquisizione delle immagini, è inoltre soggetta a potenziali fonti di variabilità che dipendono dal settaggio dello strumento, dalla fisiologia del paziente, dalla capacità dei tessuti di assorbire gli ultrasuoni, dalle caratteristiche e quantità del MDC utilizzato ed infine da fattori operatore- dipendente quali, ad esempio, il metodo di preparazione e inoculazione del MDC. (Tang et al., 2011).

Nel contesto dell'analisi dello studio e dell'interpretazione dei risultati va anche tenuto in considerazione l'effetto che potrebbero determinare alcuni agenti farmacologici utilizzati per la sedazione del paziente.

Sono diversi gli studi effettuati per rilevare le eventuali variazioni della perfusione renale dopo somministrazione di farmaci anestetici. In particolare, uno studio sulla valutazione di questo parametro ha evidenziato come la somministrazione di Propofol e Butorfanolo non influenza la diffusione del mezzo di contrasto (Stock et al., 2016) ed un altro ha confermato che l'uso della tiletamina-zolazepam non produce alterazioni della perfusione e della diffusione delle microbolle (Choi et al., 2016). Un gruppo di studio (Restitutti et al., 2013) ha invece messo in evidenza come l'utilizzo della dexmedetomidina determini una riduzione del PI della corticale renale, ma non della milza, del fegato e dell'intestino. Tuttavia, in un lavoro successivo (Rossi, et al., 2016) tale parametro risultava ridotto anche nella milza.

Nonostante la soggettività e la sua variabilità nell'esecuzione, questa tipologia di analisi si è comunque rivelata molto utile nella caratterizzazione di diversi tipi di patologie. Il MDC, tramite l'emissione di un segnale luminoso, è infatti in grado di evidenziare

perfettamente la vascolarizzazione degli organi presi in esame permettendo di mostrare eventuali deficit di perfusione, sia diffusi che localizzati, o aree in cui la perfusione è del tutto assente, come ad esempio aree di necrosi o infarti. L'analisi di tipo quantitativo viene effettuata attraverso l'utilizzo di particolari software dedicati che quantificano la presenza del MDC in una determinata regione d'interesse selezionata manualmente. Questa regione viene definita Region Of Interest (ROI) e l'analisi quantitativa viene effettuata convertendo l'immagine in un grafico di curva di intensità/ tempo (TIC) (Haers et al., 2009; Quaia et al., 2005).

Anche questo tipo di analisi, come quella qualitativa, viene molto utilizzata nella diagnostica differenziale delle lesioni focali degli organi parenchimatosi. Infatti, utilizzando questa analisi è possibile analizzare, oltre alla morfologia e alla perfusione, anche l'indice di vascolarizzazione di una determinata ROI presa in esame. Questa valutazione viene effettuata analizzando il segnale Doppler trasmesso e indica quanta area all'interno del ROI è occupata da vasi sanguigni, rivelando una stima del volume ematico e della perfusione.

L'analisi quantitativa applicata su un sistema Doppler consente di visualizzare il flusso sanguigno, all'interno del ROI, sia in Power che in Color. Utilizzando i software presenti nei macchinari si possono, quindi, costruire delle mappe cromatiche in 3D che mettono in evidenza l'intensità del flusso preso in esame, fornendo un indice di vascolarizzazione del ROI. Nel metodo armonico, dopo l'iniezione del MDC, si ottiene una curva di immagine che mette in relazione l'intensità con il tempo (curva intensità-tempo o TIC), che può essere impostata per ogni pixel o regione nel contesto dell'immagine. Le curve così ottenute presentano delle caratteristiche proprie per ogni organo, lesione e deficit vascolare presente all'interno del ROI esaminato (Haers et al., 2009; Quaia et al., 2005).

La curva intensità tempo ottenuta dopo la somministrazione del MDC risulterà formata da due fasi. La prima è la fase di wash in (Win), in cui si assiste ad una rapida crescita con un forte aumento di intensità in un tempo breve. Questa fase corrisponde al passaggio del MDC nel circolo arterioso ed è quindi dipendente dalla gittata cardiaca. Successivamente si assiste ad una fase di picco (plateau) a cui segue la seconda fase, definita di wash out (Wout), in cui si verifica una lenta discesa che corrisponde all'allontanamento del MDC attraverso il circolo venoso. Questa seconda fase è molto più duratura rispetto alla prima e avrà un valore di intensità pari a quello di partenza impiegando un tempo maggiore. Se la somministrazione di MDC viene effettuata in

infusione, attraverso l'uso di una pompa o di una siringa a infusione, la fase di plateau che si verifica tra Win e Wout avrà una durata maggiore rispetto a quella ottenuta utilizzando la metodica di iniezione in bolo (Haers et al., 2009; Quaia et al., 2005).

Dalle TIC ottenute attraverso l'analisi quantitativa vengono estrapolati i seguenti parametri, utili per la valutazione e la descrizione delle alterazioni emodinamiche presenti nell'area presa in esame:

- Intensità basale (BI), valutabile per pochi secondi dopo l'iniezione del MDC
- Tempo di arrivo (T0 o AT), ovvero il tempo che intercorre tra l'iniezione e l'arrivo del MDC. Esso rappresenta il primo punto della curva ed è superiore alla media dell'intensità basale.
- Intensità di enhancement al picco (PI). Questo rappresenta il valore di intensità massima, raggiunto durante lo studio, rispetto al valore della media dell'intensità basale e viene misurato in MPV (Mean Pixel Value) o in Decibels (dB)
- Tempo al picco, che indica l'intervallo di tempo compreso tra l'iniezione del MDC e il picco di enhancement (TT0), o il tempo compreso tra la comparsa dell'enhancement a T0 e il picco (TTP)
- Pendenza della curva. Viene misurata durante la fase di Win e Wout ed è definita come l'aumento o la diminuzione dell'intensità divisa per il tempo necessario a effettuare tale aumento o riduzione. Questo parametro indica la velocità del bolo e si misura in MPV/sec o in dB al secondo. La pendenza della curva, in fase di wash in (upslope) è un indice calcolato come la media dei punti della curva con un valore compreso tra il 10% e il 90%. in fase di wash out (downslope) questo indice viene calcolato prendendo in considerazione i valori successivi al picco di enhancement a partire da quello con valore inferiore al 90%.
- Area sotto la curva (AUC). Questo valore viene calcolato considerando la media delle intensità basale come valore di riferimento sull'asse delle ordinate (Haers et al., 2013) e risulta essere direttamente proporzionale al volume di sangue presente nella regione presa in esame.

Utilizzando l'analisi quantitativa è possibile ottenere dei dati di base relativi alla perfusione di organi normali o alterati da processi patologici. È importante ricordare che le curve ottenute attraverso questo tipo di analisi sono soggette ad un certo grado di variabilità dipendente da diversi fattori. Tra questi ricordiamo la forma e la posizione delle ROI e i diversi settaggi dei macchinari ecografici utilizzati dagli operatori nel corso degli studi. Tuttavia, in un recente studio sulla perfusione del rene, è stato

dimostrato come la scelta della dimensione della ROI non influenzi negativamente i dati ottenuti dall'analisi quantitativa relativa alla perfusione dell'organo (Macrì et al., 2015). Va inoltre considerato che, durante lo studio, può verificarsi la creazione di artefatti della curva provocati dai movimenti di escursione respiratoria del paziente con conseguente rottura delle bolle che determina l'alterazione del tempo di picco e la riduzione del wash in (Ohlerth et al., 2007).

## **Applicazioni cliniche**

L'ecografia con mezzo di contrasto viene utilizzata in medicina umana e in medicina veterinaria per la valutazione della struttura, della vascolarizzazione e di eventuali lesioni o processi patologici presenti in diversi organi. L'organo maggiormente studiato mediante questa tecnica è il fegato (Albrecht et al., 2004). Negli anni sono stati eseguiti molti lavori in cui sono state studiate le varie applicazioni cliniche della CEUS per diversi organi. (Claudon et al., 2008; Piscaglia et al., 2008; Cantisani et al., 2012; Cantisani et al., 2015).

La CEUS è stata utilizzata per la valutazione del parenchima splenico, sia dal punto di vista fisiologico (Nakamura et al., 2009; Ohlerth et al., 2007) sia per la caratterizzazione e stadiazione di lesioni parenchimali maligne e benigne. Questi studi sono stati condotti in medicina umana (Piscaglia et al., 2012) e in medicina veterinaria (Nakamura et al., 2010; Ohlerth et al., 2008; Rossi et al., 2008; Ivančić et al., 2009; Taeymans et Penninck, 2011). Uno dei più recenti è stato condotto su venti cani e aveva come obiettivo la valutazione e la caratterizzazione delle lesioni nodulari benigne in relazione al comportamento del mezzo di contrasto e alla valutazione qualitativa e quantitativa di tali strutture (Mangano et al., 2019). Attraverso questa metodica è stata anche valutata le alterazioni strutturali e della perfusione splenica in soggetti affetti da Leishmaniosi (De Majo et al., 2021).

Sono stati portati a termine anche diversi lavori volti a caratterizzare le alterazioni della parete vescicale, mediante la tecnica CEUS, soprattutto in pazienti affetti da carcinomi a cellule di transizione. (Piscaglia et al., 2012; Caruso et al., 2010; Wang et al., 2011;

Nicolau et al., 2011; Drudi et al., 2012; Drudi et al., 2014; Pollard et al., 2017; Macrì et al., 2018).

Particolare rilevanza è stata data anche allo studio delle neoplasie testicolari, sia in medicina umana (Piscaglia et al., 2012; Cantisani et al., 2015) che in medicina veterinaria (Volta et al., 2014; Quartuccio et al., 2017).

Uno dei principali campi di applicazione della CEUS riguarda lo studio del parenchima epatico (Albrecht et al., 2004). Questo è finalizzato a valutare sia la perfusione dell'organo (Ziegler et al., 2003) che le lesioni a carico del parenchima, al fine di poter effettuare una distinzione tra lesioni benigne e maligne (Jang, et al., 2009; O'Brien et al., 2004; Nyman et al., 2005; Trillaud et al., 2009; Nakamura et al., 2010; Yang et al., 2015; Banzato et al., 2019)). Tuttavia, un recente studio ha dimostrato come l'esclusivo utilizzo dell'ecografia con mezzo di contrasto non sia sufficiente a differenziare le lesioni per via della variabilità dei risultati ottenuti (Burti et al., 2020). Nel 2018 è stato pubblicato uno studio condotto su diciassette cani in cui è stato utilizzato il MDC (Sonazoid®) per effettuare la diagnosi di shunt porto sistemici congeniti (Tamura et al., 2018). Un altro lavoro, pubblicato nel 2016, ha invece valutato, attraverso la CEUS, le variazioni emodinamiche che si verificano a livello della vena porta in caso di ipertensione portale indotta chirurgicamente (Morishita et al., 2016). Nello stesso anno, un altro gruppo di studio ha dimostrato l'utilità di questa tecnica nel valutare il grado di fibrosi in soggetti affetti da cirrosi epatica (Liu et al., 2016).

La metodica CEUS è stata inoltre utilizzata per la pianificazione chirurgica in cani con sospetta necrosi/rottura della cistifellea (Bargellini et al., 2016) o ancora, tale metodica è usata al fine di rilevare lesioni a carico della parete dell'organo (Wanget al., 2016; Tsuji et al., 2012) e per effettuare diagnosi di litiasi biliare, polipo della cistifellea e tumori. (Liu et al., 2015; Si et al., 2013; Tang et al., 2013; Spârchez et Radu, 2012; Liu et al., 2012).

La metodica CEUS è stata utilizzata in medicina umana per studiare e valutare le ghiandole surrenali (Piscaglia et al., 2012). In pazienti affetti da neoplasia l'uso della CEUS è stato considerato un grande strumento per la differenziazione delle lesioni maligne (Friedrich-Rust et al., 2011). Bargellini et al. (2013) hanno studiato le caratteristiche della CEUS delle ghiandole surrenalica affetti da iperadrenocorticismo, dando un importante contributo alla letteratura (Bargellini et al., 2013). Successivamente sono stati effettuati importanti studi sull'uso della CEUS in soggetti con masse surrenali (Bargellini, et al., 2016). Nel 2020 è stato pubblicato un lavoro in

cui l'analisi qualitative e quantitative della CEUS ha permesso di elaborare dei parametri utili che permettono di differenziare le neoplasie surrenaliche di origine corticale da quelle di origine midollare (Nagumo et al., 2020)

Per lo studio del tratto gastroenterico sono state pubblicate le linee guida soltanto in medicina umana e in medicina veterinaria (Piscaglia et al., 2012; Cantisani et al., 2015; Linta e al., 2019)). In medicina veterinaria è stato condotto uno studio per valutare la perfusione duodenale in otto beagle (Nisa et al., 2017). Studi più recenti hanno invece analizzato la perfusione del duodeno di cani affetti da enteropatia cronica e linfoma intestinale (Nisa et al., 2019; Salavati et al., 2021). Un altro gruppo di lavoro ha invece valutato le alterazioni della mucosa gastrica di cani e gatti affetti da patologie infiammatorie e neoplastiche (Simeoni et al., 2020; Simeoni et al., 2021).

In un altro studio la tecnica CEUS è stata anche utilizzata per valutare la vascolarizzazione ovarica durante la fase estrale (Barbosa et al., 2013; Polisca et al., 2013); In medicina umana questa tecnica veniva usata dal 2010 per il rilevamento di lesioni ovariche (Sconfienza et al., 2010; Wang et al., 2011; Qiao et al., 2015). Questa metodica è stata anche recentemente utilizzata per valutare le alterazioni emodinamiche della vascolarizzazione endometriale in soggetti affetti da piometra o mucometra (Quartuccio et al., 2020).

In letteratura umana esistono diversi lavori, relativi all'applicazione della metodica CEUS, per lo studio dei tessuti molli (Piscaglia et al., 2012; Coran et al., 2015). Le lesioni pancreatiche focali, ad esempio, possono essere identificate utilizzando la tecnica ecografica tradizionale, ma possono essere valutate in maniera più approfondita utilizzando il MDC. Utilizzando questa tecnica è, infatti, possibile caratterizzare l'adenocarcinoma duttale, effettuare diagnosi differenziale tra pseudocisti e tumori cistici, differenziare le componenti vascolari (solide) da quelle avascolari (liquide/necrotiche) di una lesione, definire le dimensioni e i margini di una lesione, valutare i suoi rapporti con i vasi adiacenti, caratterizzare la lesione ed infine distinguere lesioni solide da quelle cistiche. L'acquisizione di queste informazioni rappresenta un grande vantaggio nella pratica clinica e nella gestione delle patologie, sia dal punto di vista diagnostico che dal punto di vista terapeutico (Piscaglia et al., 2012; Recaldini et al., 2008; D'Onofrio et al., 2010).

In medicina veterinaria esistono diversi lavori relativi all'applicazione della CEUS per la valutazione di lesioni pancreatiche. Nel 2013 è stata studiata la perfusione di pancreas e duodeno utilizzando la tecnica in bolo e di infusione continua del MDC (Lim et al.,

2013). Altri studi hanno rilevato come l'analisi quantitativa risulta utile per rilevare cambiamenti perfusionali pancreatici in corso di pancreatite acute (Lim et al., 2014). Utilizzando l'ecografia con mezzo di contrasto sono state ottenute diverse immagini di insulinooma (Nakamura et al., 2015)

Recentemente sono stati eseguiti degli studi sulla valutazione della perfusione del corpo pancreatico e del lobo sinistro di dieci gatti clinicamente sani, utilizzando SonoVue®. Questi risultati possono essere considerati dei modelli di valutazione della perfusione del parenchima pancreatico normale e può essere utile per caratterizzare i gatti con disturbi pancreatici esocrini (Diana et al., 2015).

Un altro gruppo di studio ha valutato otto cani affetti da pancreatite. In questo studio, la metodica è stata utilizzata sia per la diagnosi della pancreatite e della necrosi pancreatica, ma anche per il monitoraggio della patologia dopo la terapia. (Rademacher et al., 2016)

Recentemente la CEUS è stata utilizzata in medicina veterinaria per valutare i parametri perfusionale dell'occhio in cani sani. l'applicazione di questa metodica in tale sede potrebbe in essere utile per la diagnosi e la caratterizzazione delle lesioni oculari (Blohm et al., 2019).

In medicina umana, diversi studi hanno dimostrato la capacità della tecnica CEUS di identificare le neoplasie prostatiche. Le indagini preliminari mostrano che può essere utile anche nella valutazione dell'emodinamica prostatica in risposta al trattamento medico nei pazienti con IPB. Nei cani, attraverso parametri emodinamici quantitativi, si è dimostrata uno strumento utile per effettuare una distinzione tra prostata fisiologica e patologica (Cantisani et al., 2015; Yoon et al., 2020; Spada et al., 2021).

L'applicazione della CEUS è inoltre utile per la valutazione dei linfonodi; può essere utilizzato per il rilevamento dei linfonodi sentinella nei pazienti affetti da neoplasia maligne. Attraverso questa tecnica è possibile localizzare e distinguere i linfonodi che presentano alterazioni solo in particolari contesti clinici. (Piscaglia et al., 2012). In medicina veterinaria sono stati effettuati degli studi nel 2007 (Salwei et al., 2005; Ohlerth et O'Brien, 2007) e recentemente sono stati pubblicati dei lavori su soggetti affetti da mastocitoma, in cui il MDC viene utilizzato per la mappatura e la caratterizzazione dei linfonodi sentinella (Fournier et al., 2020). Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per ottenere dei dati più precisi.

Un'altra interessante applicazione della metodica CEUS riguarda la caratterizzazione delle masse polmonari, bronchiali e mediastiniche, anche se la diagnosi finale deve

sempre essere effettuata mediante esame citologico o istologico della lesione (Linta et al., 2017; Rick et al., 2018).

Un recente lavoro, pubblicato nel 2020, ha evidenziato l'utilità del MDC nel rilevamento e nella caratterizzazione dei trombi neoplastici a livello dei vasi sanguigni (Cordella et al., 2020).

Nuove prospettive includono l'uso della CEUS per valutare le alterazioni a carico delle articolazioni. Questa metodica può essere utilizzata per un'ulteriore valutazione del grado di vascolarizzazione delle articolazioni dei pazienti con artrite reumatoide e può fornire informazioni utili sulla risposta al trattamento, per guidare la strategia terapeutica. La tecnica ha il potenziale per essere utilizzata all'interno di centri dedicati che utilizzano una metodologia standardizzata. (Piscaglia et al., 2012; Löffler et al., 2016; Zhao et al., 2017); può essere inoltre utilizzata in traumatologia, considerando l'ampio spettro di scenari che si incontrano nella pratica clinica in medicina umana (Piscaglia et al., 2012; Miele et al., 2016) e anche in medicina veterinaria (Zhou et al., 2013; Macrì et al., 2021).

Come dimostrano diversi studi in medicina umana, la CEUS risulta avere inoltre un importante ruolo nella diagnosi, nella gestione e nella valutazione dei traumi. Questa metodica, associata ad altre tecniche diagnostiche, come la TC e l'RM, permette di evidenziare e valutare le lesioni vascolari determinate dal trauma, offrendo un valido supporto diagnostico e prognostico (Piccolo et al., 2018; Di Renzo et al., 2020; Trinci et al., 2019; Trinci et al., 2020).

L'esame ecografico tradizionale del rene rappresenta un buon mezzo diagnostico per la valutazione delle lesioni focali e diffuse. Tuttavia, diversi studi, in medicina umana e in medicina veterinaria, hanno dimostrato come l'utilizzo dell'ecografia con mezzo di contrasto permetta di rilevare la presenza di lesioni e di loro particolari aspetti che gli ultrasuoni tradizionali non sono in grado di evidenziare, fornendo così informazioni utili per la caratterizzazione delle lesioni renali. Questo aspetto è stato confermato da un lavoro, condotto in medicina umana nel 2014, sulla valutazione delle lesioni renali cistiche che ha rivelato come le immagini ottenute mediante la CEUS abbiano permesso di evidenziare delle strutture e delle componenti di tali lesioni che non erano state evidenziate all'esame ecografico tradizionale. In questo studio è stato inoltre evidenziato come la CEUS assuma un ruolo del tutto simile alla CETC (Contrast Enhancement Computed Tomography) sia nella diagnosi che nella valutazione di tali lesioni (Xeu et al., 2014). Un altro studio, condotto sempre in medicina umana, ha



invece confermato l'efficacia di questa tecnica nel differenziare le lesioni sulla base dei dati ottenuti dall'analisi quantitativa e qualitativa. In questo lavoro è stato dimostrato come l'ecografia con mezzo di contrasto permetta di effettuare una diagnosi differenziale tra il carcinoma renale e l'angiomiolipoma, riducendo la necessità di effettuare ulteriori indagini diagnostiche e fornendo un valido ausilio nella pianificazione del trattamento di questi pazienti (Oh et al., 2014).

Nell'ambito della diagnostica per immagini la CEUS occupa dunque un ruolo molto importante. Recenti e numerose pubblicazioni hanno inoltre dimostrato ed evidenziato che i dati ottenuti utilizzando questa metodica sono del tutto paragonabili a quelli ottenuti mediante altre tecniche diagnostiche, come la TC (Tomografia Computerizzata) e l'RM (Risonanza Magnetica) (Jin e.al., 2020; Lan et al., 2015). Altri studi, condotti in medicina umana, hanno anche messo in evidenza come l'utilizzo della CEUS associata ad altre tecniche diagnostiche, come la TC o l'RM, contribuisca ad aumentare la sensibilità e la specificità di questa metodica nella diagnosi, nella caratterizzazione e nella valutazione delle lesioni renali e di altri tessuti (Tian et al., 2017; Marcatelli et al., 2019; Schwarze et al., 2020; Mastrorosato et al., 2021).

In medicina veterinaria la prima pubblicazione riguardante l'utilizzo della tecnica CEUS per la valutazione e delle lesioni renali risale al 2010. In questo lavoro gli autori hanno utilizzato questa metodica in quindici cani, undici dei quali non presentavano segni clinici specifici. Tutti i soggetti sono stati sottoposti a un esame ecografico con mezzo di contrasto (SonoVue®) e i risultati ottenuti dall'analisi della CEUS sono stati confrontati con i dati presenti in letteratura. Da questo studio si evince che tutti i soggetti presentavano lesioni focali ad uno o ad entrambi i reni e, dopo l'analisi dei dati ottenuti, è stato possibile effettuare una caratterizzazione di tali lesioni. In modo particolare, per dieci soggetti è stato possibile emettere una diagnosi di lesioni maligne (neoplasie primarie o metastatiche), sulla base del loro aspetto e del comportamento nel MDC. Gli altri cinque soggetti che invece presentavano lesioni benigne (ascessi, ematomi, aree di necrosi) che sono state evidenziate e caratterizzate in modo specifico, mettendo in evidenza degli aspetti non rilevabili con l'esame ecografico convenzionale (Haers et al., 2010).

Un altro studio condotto in medicina veterinaria ha confermato l'utilità della tecnica CEUS nella diagnosi e nella valutazione di emorragia renale, conseguente a rottura spontanea dell'organo. Da questo lavoro si evince come l'ecografia con mezzo di

contrasto sia utile nella valutazione della vascolarizzazione dell'organo, oltre che nella valutazione e caratterizzazione delle patologie focali e diffuse (Gerboni et al., 2015).



## **4 L'ecografia con mezzo di contrasto CEUS applicata allo studio della perfusione renale**

La tecnica CEUS è stata ed è ancora oggi utilizzata per indagare le alterazioni della perfusione in vari organi e, in modo particolare, a livello renale poiché è in grado di fornire delle importanti informazioni riguardo questo parametro che risulta a sua volta strettamente correlato alla funzionalità dell'organo.

Sia in medicina umana che veterinaria, sono stati condotti diversi studi mirati a valutare la vascolarizzazione e perfusione renale sia in soggetti sani (Liu et al., 2018) che in soggetti affetti da patologie renali (Piscaglia et al., 2012; Cantisani et al., 2015; Oh et al., 2014; Xue et al., 2014; Schneider et al., 2014; Girometti et al., 2014; Girometti et al., 2017; Tsuruoka et al., 2010; Dong et al., 2013). Molti altri studi sono stati condotti per effettuare la valutazione e la caratterizzazione di

lesioni nodulari e neoplastiche (Haers et al., 2010; Kinns et al., 2010; Waller et al., 2007; Dong et al., 2013; Stock et al., 2014; Haers et al., 2013; Stock et al., 2016; Tsuruoka et al., 2010; Choi et al., 2016; Lee et al., 2017). Altri studi hanno anche evidenziato come i parametri analizzati dalla CEUS siano utili nella diagnosi e nella valutazione della perfusione renale in soggetti affetti da IRC, sottoposti a trapianto renale o con gravi lesioni vascolari ischemiche (Elec et al., 2020; Wang et al., 2020; Garesus et al., 2021; Han et al., 2021).

Studi condotti nel 2000 (Fine et al., 2000) hanno dimostrato come l'ipossia aumenti il danno ischemico cronico e conduca progressivamente allo stadio finale della malattia. Secondo questo studio l'ipossia indurrebbe un danno da stress ossidativo a livello delle cellule dei tubuli renali e delle cellule peritubulari. Il danno da stress ossidativo causa l'attivazione di meccanismi ossidativi intracellulari e l'attivazione di sostanze vasoattive che provocano l'accumulo di matrice extracellulare. (Nangaku, 2006). Questa determina un'alterazione morfologica dei tessuti con conseguente glomerulosclerosi e fibrosi tubulo-interstiziale.

La fibrosi tubulo-interstiziale rappresenta il miglior indicatore predittivo della progressione della malattia renale e determina, inoltre, alterazioni dei capillari peritubulari (Fine et Norman, 2008). A causa di questi processi patologici la vascolarizzazione dell'organo subisce delle progressive alterazioni, queste determinano

inevitabilmente una riduzione della sua perfusione e, di conseguenza, una riduzione della velocità di filtrazione glomerulare.

Diversi test possono essere utilizzati per valutare la perfusione renale. Il gold standard per lo studio della velocità di filtrazione glomerulare è rappresentato dalla determinazione della clearance dell'inulina, una sostanza endogena che non viene riassorbita a livello tubulare e viene escreta con le urine. Oltre a questa possono essere utilizzate anche altre sostanze, esogene o endogene, come la creatinina l'iohexolo o l'acido para-amino ippurico (PAH), per effettuare una stima della VFG. (Stock et al., 2016).

Tuttavia, queste indagini risultano essere estremamente laboriose e difficilmente applicabili nella pratica clinica, poiché richiedono tempi lunghi e risentono di diverse variabili correlate al soggetto e al metodo di analisi utilizzato. (Kampa et al., 2006; Von Hendy-Willson et al., 2011)

Attualmente, sia in medicina umana che in medicina veterinaria, la scintigrafia renale, la TC e la RM sono i test di imaging più comuni per lo studio morfologico e funzionale dell'apparato urinario. Utilizzando dei marker radioattivi, iniettati per via endovenosa, è infatti possibile effettuare uno studio dettagliato delle alterazioni morfologiche e strutturali del rene, permettendo di valutare e caratterizzare anche eventuali lesioni parenchimali (Jin et al., 2020; Lan et al., 2016; Tian et al., 2017).

Inoltre, sottoponendo le immagini ad un'analisi quantitativa e qualitativa è possibile valutare la perfusione di entrambi gli organi e la loro capacità di escrezione.

La scintigrafia renale, statica e sequenziale, viene utilizzata anche in medicina veterinaria per la valutazione della funzionalità renale (Tyson et al., 2014; Von Hendy-Willson et al., 2011). Negli ultimi anni sono stati pubblicati diversi lavori che dimostrano come la scintigrafia sequenziale sia in grado di valutare le alterazioni sia strutturali che funzionali del sistema vascolare del rene. In un recente lavoro, pubblicato nel 2018, è stato infatti dimostrato che, in soggetti affetti da IRC, le alterazioni morfologiche ecografiche, gravi e moderate, corrispondono ad una significativa riduzione della velocità di filtrazione glomerulare. In questo studio la VFG è stata valutata attraverso la scintigrafia renale sequenziale; questa tecnica ha mostrato, in associazione all'esame ecografico, un'alta sensibilità e una buona specificità nella valutazione del danno renale cronico (Mattei et al., 2018).

In medicina umana sono stati pubblicati diversi lavori in cui vengono confrontati i dati ottenuti utilizzando le diverse tecniche di diagnostica per immagini in pazienti affetti da

patologie renali. I risultati ottenuti hanno messo in evidenza come la scintigrafia renale, rispetto alla TC e alla RM, sia la metodica più indicata nella valutazione della perfusione renale e della vascolarizzazione dell'organo. Queste tecniche infatti non sembrano fornire informazioni aggiuntive rispetto a quelle ottenute attraverso la scintigrafia e richiedano, inoltre, dei tempi di elaborazione dei risultati molto più lunghi, oltre ad attrezzature e personale adeguato (Fiev et al., 2020; Demasio et al., 2020; Houboisa et al., 2018).

Nel 2016 è stato pubblicato uno studio in cui veniva paragonata la valutazione della perfusione renale attraverso la scintigrafia sequenziale, utilizzando il  $^{99m}\text{Tc}$ -Mercaptoacetyltriglicine, e l'ecografia con mezzo di contrasto, utilizzando il SonoVue® in bolo. I soggetti sottoposti a esame erano gatti affetti da IRC a cui venne somministrata Angiotensina II, prima di sottoporli ad entrambi gli esami diagnostici. La perfusione renale venne studiata effettuando un'analisi quantitativa e qualitativa di due ROI midollari e di tre ROI corticali in entrambi i reni; i dati ottenuti vennero paragonati con quelli ottenuti dal gruppo controllo. L'analisi dei risultati ha permesso di evidenziare come la scintigrafia non abbia rilevato delle variazioni significative nella perfusione corticale dell'organo in seguito all'iniezione di Angiotensina II. Utilizzando la metodica CEUS, invece, è stato possibile evidenziare delle alterazioni dei parametri perfusionali, provocati dalla somministrazione questo farmaco (Stock et al., 2016).

Questo studio, come molti altri sopracitati, dimostra come la scintigrafia renale, così come anche la TC e l'RM, siano delle tecniche diagnostiche molto utili nella diagnosi e nella valutazione dei pazienti affetti da danno renale cronico. Tuttavia presentano dei limiti significativi nella valutazione del flusso sanguigno renale, soprattutto in corso di malattie renali croniche in stadio avanzato. Inoltre, esse risultano invasive a causa dell'utilizzo dei MDC specifici e, nel caso della TC, delle radiazioni a cui il soggetto viene esposto. Richiedono strutture e apparecchi adatti, presenza di personale specializzato, tempi di analisi lunghi e costi maggiori rispetto ad altre tecniche diagnostiche (Stock et al., 2016).

È proprio in questo contesto che si inserisce l'utilizzo della metodica CEUS. Quest'analisi infatti rappresenta una tecnica diagnostica poco invasiva, rapida e facilmente applicabile nella pratica clinica. Il suo impiego permette di valutare in modo accurato sia la macro che la microcircolazione, dando una buona rappresentazione della perfusione in caso di diagnosi di disturbi renali diffusi o patologie focali e permette

inoltre di valutare precocemente le disfunzioni renali provocate da un danno ischemico (Dong et al., 2013).

Nel 2013 un gruppo di studio ha effettuato diversi studi su dei soggetti sani in cui il danno renale era stato indotto attraverso l'applicazione di restrittori ad anello Ameroid sulla porzione distale dell'arteria renale destra, attraverso intervento chirurgico. Dopo l'intervento è stato eseguito il monitoraggio CEUS della perfusione renale, con cadenza settimanale, utilizzando il SonoVue® come MDC. Con la progressione della malattia renale ischemica cronica, i cani hanno mostrato un ritardo del miglioramento e della perfusione nella curva CEUS renale. In precedenza, sono stati osservati cambiamenti significativi negli indici di perfusione nel sangue a partire da 4,7 settimane dopo l'intervento, ma i cambiamenti nella creatinina e nell'azotemia si sono verificati dopo 11 settimane. Come è stato descritto in letteratura, durante il periodo di scompenso della funzione renale, il verificarsi di un aumento caratteristico della creatinina e dell'azotemia diventa evidente solo quando la filtrazione renale risulta dimezzata. In questo studio viene dunque dimostrato come la metodica CEUS sia in grado di rilevare, in maniera precoce, le variazioni di perfusione in corso della malattia renale ischemica cronica (Dong et al., 2013).

Nel 2010 è stato effettuato uno studio finalizzato a valutare la perfusione renale in cani affetti da IRC e comparare i risultati con quelli ottenuti in soggetti sani. L'analisi dei risultati ha permesso di affermare che la metodica CEUS, utilizzando Sonazoid® come MDC, rappresenta una tecnica poco invasiva e molto utile nella valutazione della vascolarizzazione e della perfusione renale in soggetti affetti da danno renale cronico (Tsuruoka et al., 2010).

Successivamente sono stati effettuati ulteriori studi volti a valutare il comportamento nel MDC in soggetti con alterazione della vascolarizzazione renale indotta da patologie acute e croniche. In un recente lavoro, pubblicato nel 2017, sono stati valutati sei cani in cui è stato indotto in maniera sperimentale un danno renale ischemico. I risultati ottenuti dall'analisi qualitativa dell'ecografia con mezzo di contrasto sono stati paragonati alle informazioni ottenute dall'esame istopatologico. In questo modo è stato possibile correlare i dati ottenuti dalla CEUS al grado di necrosi e al grado di danno tubulare, responsabili delle alterazioni della perfusione dell'organo (Lee et al., 2017).

Un altro lavoro, pubblicato nel 2018, ha valutato la variazione dei parametri della perfusione renale in otto cani sani sottoposti ad esame ecografico con mezzo di contrasto in un periodo di tempo di 83 settimane, al fine di studiare la variabilità dei

parametri perfusionali nel lungo periodo. La valutazione di questi parametri è stata effettuata prendendo in esame due ROI corticali e midollari di entrambi gli organi. I risultati di questo lavoro hanno dimostrato, che nello studio della CEUS renale, i parametri legati alla velocità di flusso subiscono una variazione minore rispetto a quelli legati al volume di flusso. Inoltre, è stato visto che non esistono sostanziali differenze tra i parametri perfusionali rilevati nei due organi; l'analisi di un solo rene può quindi essere utile a identificare le alterazioni della perfusione del controlaterale (Liu, et al., 2018).

Nello stesso anno un altro gruppo di lavoro ha analizzato i parametri perfusionali del rene in una popolazione di gatti sani (Stock et al., 2018). Gli stessi parametri sono stati valutati anche in un campione di gatti affetti da IRC; i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dall'analisi del gruppo controllo ed è stato evidenziando come la CEUS sia in grado di rilevare le modificazioni della microvascolarizzazione indotte dal danno renale cronico (Stock et al., 2017).

Mentre per quanto concerne le caratteristiche delle ROI, da prendere in esame durante lo studio, è stato dimostrato come la loro localizzazione e la grandezza non provochi significative variazioni dei valori ottenuti, relativi alla perfusione dell'organo; anzi l'utilizzo di ROI più ampie attenuerebbe la variabilità tra aree troppo piccole (Macrì et al., 2015).

È necessario fare un'importante considerazione sull'utilizzo dei farmaci anestetici e sui loro effetti durante l'esecuzione dell'ecografia con mezzo di contrasto. In relazione ai protocolli utilizzabili è possibile fare riferimento ad uno studio condotto sui gatti, in cui sono stati adottati tre diversi protocolli anestesiológicos: (1) paziente sveglio, (2) Butorfanolo (0,4 mg/kg IM), e (3) Propofol (3,5-7,7 mg/kg IV boli a effetto). Dopo la somministrazione dei farmaci e l'esecuzione della CEUS, i dati acquisiti dalle due ROI corticali prese in esame sono stati sottoposti ad analisi quantitativa e qualitativa. Le curve ottenute sono state analizzate in relazione ai parametri del flusso sanguigno, rappresentati dal volume del sangue (intensità di base, intensità di picco, area sotto la curva) e dalla sua velocità (tempo di arrivo, tempo di picco, wash in / out). Da questo studio è emerso che l'utilizzo del Butorfanolo non ha prodotto alcun effetto significativo su nessuno dei parametri della perfusione ( $P > 0,05$ ) e che la somministrazione di Propofol non ha influenzato il parametro più importante della perfusione, l'area sotto la curva; il loro impiego risulta dunque adeguato durante lo studio ecografico con mezzo di contrasto (Stock et al., 2014).

---

Un altro studio effettuato da Choi et al. (2016), ha confrontato i parametri fisiologici di perfusione renale in cani coscienti e anestetizzati, utilizzando la metodica CEUS. Il protocollo anestesiológico prevedeva l'impiego di Tiletamina-Zolazepam e Medetomidina (gruppo TZM) o solo Medetomidina (gruppo M). Dai risultati ottenuti è stato possibile affermare che i valori di perfusione nella regione corticale dei soggetti sottoposti ad anestesia non mostravano significative differenze rispetto a quelli ottenuti nei cani coscienti, ad eccezione del valore di TTP (Time To Peak). Sono state invece registrate significative variazioni dei parametri di perfusione midollare all'interno del gruppo di soggetti a cui era stata somministrata la Tiletamina-Zolazepam come anestetico (gruppo TZM). Pertanto, la somministrazione di questo farmaco anestetico può essere utile per valutare soltanto la perfusione renale a livello corticale; i dati ottenuti in questo studio possono inoltre essere utilizzati come valori di riferimento per effettuare una stima della perfusione renale, utilizzando la metodica CEUS, nei cani sotto anestesia iniettabile.

---



# **Terza parte: Valutazione della perfusione renale tramite mezzo di contrasto (CEUS) in cani affetti da Leishmaniosi**

## **5 Lo studio clinico**

### **OBIETTIVO DELLO STUDIO**

Lo scopo di questo lavoro è quello di evidenziare le alterazioni ecografiche del rene nei cani affetti da *L. infantum*, valutare le modificazioni dei parametri perfusionali e della vascolarizzazione mediante un esame ultrasonografico bidimensionale e con mezzo di contrasto utilizzando la metodica CEUS (Contrast-Enhanced Ultrasound). I dati acquisiti attraverso questi esami strumentali sono stati messi in relazione con lo stadio clinico-patologico di malattia e lo stadio di insufficienza renale.

Per la realizzazione di questo lavoro sono stati inclusi pazienti visitati presso l'Ospedale Veterinario dell'Università degli Studi di Messina e presso la Clinica Veterinaria Camagna di Reggio Calabria. Tutte le prestazioni e le terapie a cui sono stati sottoposti i soggetti erano conformi alle direttive EU 2010/63/EU sulla protezione e il benessere animale utilizzati per scopi scientifici. Il protocollo dello studio è stato approvato dal Comitato etico del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Messina (20/2018). Per ciascun soggetto è stato richiesto ai proprietari di prendere visione e sottoscrivere un consenso informato prima dell'inclusione nello studio. I cani presi in considerazione erano tutti adulti, con anticorpi e/o PCR positiva a *L. infantum*. I cani con un'età inferiore ad un anno sono stati arruolati solo se nati prima del mese di aprile, poiché era necessario che fossero stati esposti ad almeno una stagione di trasmissione (Aprile - Ottobre) di *L. infantum*.

---

## METODOLOGIA

Ogni soggetto incluso nello studio è stato sottoposto ad un'accurata visita clinica e ad analisi emato-biochimiche. La morfologia del rene e la sua vascolarizzazione sono state valutate mediante esame ultrasonografico in B-mode, Doppler e con mezzo di contrasto (CEUS).

Durante la visita clinica per ogni paziente è stato effettuato il segnalamento e raccolta l'anamnesi. Ogni soggetto è stato sottoposto ad un attento esame obiettivo generale. La pressione sanguigna, in accordo con le linee guida ACVIM 2018, è stata misurata in un luogo tranquillo, utilizzando un dispositivo oscillometrico ad alta definizione (Vet HDO Monitor, medVET, UK) (Acierno et al., 2018). La classificazione dei pazienti in base ai valori registrati è stata effettuata in accordo con le linee guida IRIS 2019 (<http://www.iris-kidney.com>).

Sono stati prelevati cinque millilitri di sangue da ogni soggetto. Un millilitro è stato posto in provette con K<sub>2</sub>EDTA e utilizzato, entro 24 ore, per effettuare un esame emocromocitometrico completo. Il campione è stato poi conservato a -20 °C per le successive indagini molecolari. I restanti quattro millilitri sono stati utilizzati per ottenere uno striscio ematico e il siero, dopo coagulazione e centrifuga del campione. Questo è stato utilizzato per effettuare le analisi biochimiche; un'aliquota è stata conservata a -20 °C ed usata per l'analisi sierologica. Un campione di urine di circa cinque millilitri è stato prelevato per cistocentesi o ottenuto per minzione spontanea ed analizzato entro due ore dal prelievo. Il surnatante, ottenuto centrifugando il campione, è stato utilizzato per la valutazione del rapporto UPCR entro 24 ore dal prelievo. Utilizzando dei tamponi sterili sono stati prelevati dei campioni da ogni lesione cutanea e delle mucose. Sono stati inoltre effettuati tamponi orali, oculari e auricolari. L'esame citologico dei linfonodi e della milza è stato effettuato utilizzando la tecnica FNA (fine needle aspiration) ed il preparato citologico è stato allestito immediatamente. Le siringhe e gli aghi utilizzati per questa indagine ed i tamponi sono stati conservati a -20 °C e sottoposti ad analisi per la ricerca di *L. infantum*.

---

## **STADIAZIONE**

Sulla base dei reperti clinici e clinico-patologici i soggetti inclusi nello studio sono stati stadiati utilizzando il sistema di classificazione (stadio I, IIa, IIb, III, IV) stabilito dalle linee guida LeishVet(<https://www.leishvet.org/fact-sheet/clinical-staging/>).

I cani con anticorpi e/o PCR positiva per *L. infantum* senza segni clinici o alterazioni clinico-patologiche sono stati considerati soggetti infetti clinicamente sani (ICH) (Solano-Gallego et al., 2009).

Il danno renale è stato stimato valutando, per ogni soggetto, il valore della pressione arteriosa media, il valore della BUN, della creatinina sierica, dell'SDMA, del peso specifico urinario e dell'UPCR. Per ogni cane è stato dunque valutato un grado di malattia renale secondo il sistema di classificazione IRIS 2019 (<http://www.iris-kidney.com>).

## **VALUTAZIONI CLINICO-PATOLOGICHE**

L'esame emocromocitometrico è stato effettuato utilizzando un analizzatore ematologico a laser (IDEXX Pro CyteDx® Hematology Analyzer, Idexx Laboratories, Westbrook, Maine, USA). I soggetti venivano considerati anemici se la concentrazione di emoglobina risultava al di sotto del valore di riferimento (<13.1 g/dL). Lo striscio ematico è stato allestito utilizzando la colorazione May-Grünwald Giemsa (MGG) e analizzato al fine di confermare la trombocitopenia e la formula leucocitaria (Piaton et al., 2016). L'analisi del profilo biochimico è stata effettuata presso il laboratorio Biogene (Catania, IT) e includeva la valutazione dei seguenti parametri: azoto uremico ematico (BUN), creatinina sierica (SC), proteine totali (TP), albumina (ALB), alanina aminotransferasi (ALT), aspartato aminotransferasi (AST).

L'esame chimico-fisico delle urine è stato effettuato utilizzando delle strisce reattive (Combur 9 Test strips, Roches Diagnosis, Indianapolis, Indiana, USA). La stima del peso specifico (PS) è stata valutata sul sedimento urinario utilizzando un refrattometro (Vet 360 refractometer, Reichert, Seefeld, Germany). Il sedimento urinario è stato esaminato al microscopio utilizzando degli appositi vetrini da lettura (Kova International, Garden Grove, CA, USA). Il valore dell'UPCR è stato ottenuto mediante analisi biochimica, presso il laboratorio Biogene (Catania, Italia), utilizzando come cut-

off per la proteinuria un valore pari a 0,5. Un valore compreso tra 0,2 e 0,5 è stato considerato borderline (IRIS, 2019).

## **RICERCA DI ANTICORPI ANTI-LEISHMANIA E ALTRI PATOGENI TRASMESSI DA VETTORI**

La ricerca degli anticorpi anti-*L. infantum* (IgG) è stata condotta utilizzando l'immunofluorescenza indiretta (IFAT) usando antigeni di *L. infantum* (variante MHOM/IT/80/IPT1) prodotti dal Centro di Referenza Nazionale Leishmaniosi (C.Re.Na.L., Palermo, Italia). Per la procedura sono stati utilizzati anticorpi di coniglio (anti-dog IgG-FITC, USA). Seguendo il protocollo del produttore è stato determinato il titolo end-point dei campioni positivi preparando delle diluizioni seriali di siero, partendo da una diluizione di 1:80. Il valore cut-off delle diluizioni considerato come positivo era di 1:80 (Solano-Gallego et al., 2009). I sieri dei singoli soggetti sono stati inoltre sottoposti ad analisi per la ricerca di immunoglobuline (IgG) contro gli antigeni di *Rickettsia conorii*, *Ehrlichia canis*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Coxiella burnetii*. A tale scopo sono stata effettuata l'immunofluorescenza indiretta utilizzando i kit presenti in commercio (Fuller Laboratories Fullerton, California, USA). Il protocollo del produttore prevedeva, per ogni test sierologico, un cut-off di diluizioni pari a 1:80 per *A. phagocytophilum*, 1:64 per *R. conorii* 1:50 per *E. canis* e 1:16 per *C. burnetii*.

## **ESTRAZIONE DEL DNA E REAL-TIME PCR**

L'estrazione del DNA dei soggetti è stata effettuata utilizzando 200 microlitri dal campione di sangue in K<sub>2</sub>EDTA, i tamponi orali, congiuntivali, auricolari e gli aspirati linfonodali utilizzando il kit Pure Link Genomic DNA (Invitrogen, California, USA). Al termine delle procedure di estrazione, il DNA è stato diluito con 100 µl di soluzione tampone fornita dalla casa produttrice e conservato a -20 °C. Su di esso è stata effettuata, per ogni cane arruolato, la *real-time* PCR (Vitale et al., 2004) per la ricerca di *L. infantum*.

*R. conorii*, *E. canis*, *A. phagocytophilum*, *A. platys*, *B. canis* e *C. burnetii* sono state indagate utilizzando AB Gene Amp PCR system 2700 Cycle Sequencing (Applied

Biosystem, Monza, Italia). La PCR è stata eseguita un volume finale di 25µL utilizzando 1 x 1,5 mM di GreenGoTaqReaction Buffer (5 X and Mm MgCl<sub>2</sub>), 10 mM dNTP Mix, 1.25 U GoTaq G2 DNA Polymerase (5 U/µL), 1 mM each primer, e 3 M di DNA. Il target amplificato per ogni agente patogeno, i primer utilizzati e la lunghezza del frammento sono riportati nella tabella 11.

AGENTE PATOGENO	REGIONE AMPLIFICATA	PRIMER (5'-3')	LUNGHEZZA DEL FRAMMENTO	RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI
<i>Rickettsia</i> spp.	17KDa antigen	TZ15-19 5'-TTC TCA ATT CGG TAA GGG C-3' TZ16-20 5'-ATA TTG ACC AGT GCT ATT TC-3' Rr190.70p ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	246	Tzianabos et al., 1989
<i>Rickettsia</i> spp.	Omp A	Rr190.701n GTTCCGTTAATGGCAGCATCT Rr190.602n AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT rompB OF GTAACCGGAAGTAATCGTTTC GTAA rompB OR GCTTTATAACCAGCTAAACCA CC	532	Oteo et al., 2006
<i>Rickettsia</i> spp.	Omp B	rompB SFG IF GTTTAATACGTGCTGCTAACCA A rompB SFG/TG IRGGTTTGGCCATATACCATA AG	511/425	Choi et al., 2005
<i>E. canis</i>	16SrRNA	ECC AGAACGAACGCTGGCGGCAAG CC ECB CGTATTACCGGGCTGCTGGC A	480/390	Siarkou et al., 2007

		<p>“canis”</p> <p>CAATTATTTATAGCCTCTGGCT ATAGGA HE3 TATAGGTACCGTCATTATCTTC CCTAT</p>		
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	msp4	<p>MSP4AP5 5'ATGAATTACAGAGAATTGCT TGTAGG-3'</p> <p>MSP4AP3 5'-TTAATTGAAAGCAAATCTTG CTCCTA TG-3'</p>	849	De la Fuente et al., 2005
<i>Anaplasma platys</i>	16SrRNA	<p>PLATY-F 5'-AAG TCG AAC GGA TTT TTG TC-3'</p> <p>PLATYS-R 5'-CTT TAA CTT ACC GAA CC-3'</p>	500	Inokuma et al., 2002
<i>Coxiella burnetii</i>	htpB	<p>Q5 (5'-GCG GGT GAT GGT ACC ACA ACA-3')</p> <p>Q3 (5'-GGC AAT CAC CAA TAA GGG CCG-3')</p> <p>Q6 (5'-TT GCT GGA ATG AAC CCC A-3')</p> <p>Q4 (5'-TC AAG CTC CGC ACT CAT G-3')</p>	50 325	To et al., 1996
<i>Babesia canis</i>	ssu-rDNA	<p>PIRO-A 5'AATACCCAATCCTGACACAG GG 3'</p> <p>PIRO-B 5'TTAAATACGAATGCCCCCAA C 3'</p>	400	Carret et al., 1999

**Tabella 11.** Regione amplificata, primer utilizzato per la ricerca dell'agente patogeno, lunghezza del frammento e riferimento bibliografico.

## **ESAME ECOGRAFICO IN B-MODE, COLOR DOPPLER E CEUS**

Tutti i cani reclutati sono stati sottoposti ad esame ultrasonografico bidimensionale di entrambi i reni. Per quanto concerne l'esecuzione della metodica CEUS, al fine di standardizzare la valutazione della perfusione del mezzo di contrasto, è stata valutata la porzione medio-caudale della sezione dorsale o longitudinale del rene sinistro.

L'esame ecografico in B-mode di ogni soggetto è stato seguito dallo stesso operatore utilizzando un ecografo Mindray M9 (Mindray Medical Italy, Trezzano sul Naviglio, Milano, Italia) ed una sonda microconvex (C11-3s).

Prima di iniziare la procedura è stata eseguita una tricotomia della regione addominale è stato applicato sulla cute una moderata quantità di alcol e gel. Lo strumento è stato settato in modo da ottenere la standardizzazione delle impostazioni relative alla profondità e l'ottimizzazione del guadagno complessivo, della gamma dinamica, della zona focale e della compensazione del guadagno temporale.

Utilizzando l'esame Color Power Doppler (CPD), è stata anche valutata la vascolarizzazione renale ed è stato visualizzato il percorso dei vasi sanguigni di ogni rene.

L'esame ecografico con mezzo di contrasto (CEUS) è stato eseguito utilizzando una sonda lineare (LM 14-6) con frequenza di 5,7 MHz, un indice meccanico (IM) da 0,06 a 0,09 con persistenza 0 e un'ampia gamma dinamica. È stata posizionata una singola zona focale a livello del margine distale del parenchima renale.

Per la realizzazione di questo studio è stata utilizzata una doppia funzione live, che permette la simultanea visualizzazione dell'immagine in B-mode e in modalità contrasto. Per l'esecuzione della metodica è stato utilizzato un mezzo di contrasto costituito da microbolle di esafluoruro di zolfo (*SonoVue*®, Bracco International, Milano, Italia), seguendo le indicazioni del produttore. Ogni fiala, contenente 25 mg di polvere liofilizzata, è stata ricostituita utilizzando 5 mL di cloruro di sodio 0.9% e agitata vigorosamente per 20 secondi. Ad ogni soggetto sono stati somministrati due boli (0.04 mL/kg di peso corporeo) per via endovenosa, utilizzando una valvola a tre vie collegata ad un catetere endovenoso da 20 Gauge posizionato a livello della vena cefalica. Ogni bolo era seguito dalla somministrazione di 5 mL di soluzione salina. La somministrazione delle due aliquote era separata da un intervallo di tempo di 7-8 minuti.

Tra il primo e il secondo bolo, le microbolle venivano distrutte con un impulso (flash) ad alto IM a livello dei grossi vasi addominali. Durante la prima somministrazione l'operatore poteva, se necessario, modificare le impostazioni dell'apparecchio, ottimizzando il guadagno totale e quello di profondità.

Durante l'esecuzione della metodica, la sonda veniva posizionata manualmente dall'operatore e mantenuta nella stessa posizione per tutta la durata dell'esame. Al momento dell'inoculo del mezzo di contrasto veniva azionato un timer e veniva registrato un video di due minuti. Le immagini registrate durante la somministrazione del secondo bolo sono state memorizzate e successivamente analizzate da due operatori. L'enhancement renale è stato giudicato normale se dopo un rapido picco di enhancement del contrasto nelle arterie interlobari si è verificava un enhancement omogeneo di tutta la corticale renale. Questo fenomeno risultava più evidente in questa regione rispetto alla midollare renale, il cui enhancement iniziava dopo la fase corticale. Sulla base dei dati acquisiti mediante questa metodica è stata effettuata un'analisi qualitativa ed un'analisi quantitativa prendendo in esame due ROI circolari disegnate manualmente, rispettivamente a livello della corticale e della midollare.

L'analisi qualitativa ha permesso di valutare il flusso ematico renale sia nella fase arteriosa (wash-in) che in quella venosa (wash-out). Lo studio di questi parametri è stato effettuato analizzando la tempistica dell'enhancement. È stata, inoltre, analizzata la distribuzione del mezzo di contrasto all'interno del parenchima renale, al fine di evidenziare la presenza di regioni poco vascolarizzate o non perfuse (aree di necrosi o lesioni a contenuto liquido). In queste aree il mezzo di contrasto si distribuisce in maniera non omogenea rispetto alle regioni con perfusione normale.

L'analisi quantitativa dei dati è stata effettuata utilizzando un software interno di analisi delle immagini di contrasto QA dell'ecografo M9. Per ogni cane sono state disegnate manualmente due ROI (una a livello della corticale e un'altra nella midollare) situate ad una profondità di circa 1-2 centimetri all'interno del parenchima renale, escludendo le arterie interlobari e arcuate.

Utilizzando il sistema QA è stata effettuata un'analisi della curva intensità-tempo al fine di ottenere informazioni quantitative relative al volume di perfusione e alla velocità del flusso sanguigno.

I parametri calcolati includevano: GOF (Goodness Of Fit), ovvero il grado di adattamento della curva alla spezzata originata dai dati grezzi in un range di 0-1, dove 1 indicava che la curva adattata si adatta perfettamente alla curva grezza; BI (Base



Intensity), l'intensità di base dello stato di non perfusione dell'agente di contrasto; AT (Arrival Time), il punto temporale in cui appare l'intensità del contrasto; TTP (Time to Peak), il tempo in cui l'intensità del contrasto raggiunge il valore di picco; PI (Peak Intensity) dell'intensità di picco del contrasto; AS (Ascending Slope), la pendenza ascendente del contrasto, ovvero, la pendenza tra il punto di inizio della perfusione del tessuto fino al picco; DT/2, il tempo in cui l'intensità è la metà del valore dell'intensità di picco; DS (pendenza discendente), la pendenza discendente della curva; e l'AUC (area sotto la curva), utilizzata per calcolare l'area sotto la curva tempo-intensità durante la perfusione di contrasto.

I dati acquisiti mediante la CEUS sono stati sottoposti ad analisi statistica ed elaborati in relazione allo stadio clinico di tutti i soggetti presi in esame (Tabella 12). L'elaborazione statistica dei dati grezzi è stata effettuata utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) tramite la procedura GLM del programma statistico SAS (vers. 8.1, 2001). L'analisi di tali dati è stata effettuata utilizzando due dataset prendendo in considerazione come variabile la Stadiazione (0, 1, 2, 3+4) e lo Stadio IRIS (0-1). Il livello di significatività scelto come valore soglia è stato di  $P < 0,05$ . Ciò significa che la probabilità ( $P$ ) che il risultato osservato si verifichi per caso è inferiore al 5%.

SOGGETTI	STADIO LEISHMANIA	STADIO IRIS
1	3	1
2	1	0
3	1	0
4	1	0
5	1	0
6	3	1
7	1	0

8	2b	1
9	2a	1
10	2a	1
11	2a	1
12	1	1
13	2a	1
14	4	1
15	4	1
16	NEGATIVO	0

**Tabella 12.** Stadiazione LeishVet e IRIS dei soggetti analizzati

## **6 I risultati**

In questo studio clinico è stato valutato un campione di 16 cani, 7 femmine e 9 maschi, di età compresa tra 7 mesi e 10 anni. La maggior parte dei soggetti arruolati erano di razza meticcia (9), tre erano di razza Bassotto Tedesco, due Bracco Italiano, uno di razza Barbone e uno di razza American Pitt Bull Terrier.

Tra questi un soggetto risultava positivo per *L. infantum* ma non manifestava segni clinici della malattia (ICH), uno di essi era negativo e 14 risultavano positivi per *L. infantum* e presentavano segni clinici compatibili. Il titolo anticorpale IFAT per *L. infantum* dei soggetti positivi era compreso in un range fra 80 e 20.480. Sulla base dei risultati di laboratorio ottenuti, della visita clinica e in base alla prognosi i soggetti sono suddivisi nelle 4 categorie LeishVet, come descritto in tabella 13.

CLASSIFICAZIONE	NUMERO DI SOGGETTI (%)
NEGATIVO	1 (6.25)

ICH	1 (6.25)
Stage I	4 (25)
StageIIa	5 (31.25)
Stage IIb	1 (6.25)
Stage III	2 (12.5)
Stage IV	2 (12.5)

**Tabella 13.** Stadiazione clinica dei soggetti affetti da *L. infantum* secondo le linee guida LeishVet. ICH (soggetto infetto clinicamente sano)

I tamponi, gli aspirati linfonodali e splenici, il sangue in K<sub>2</sub>EDTA e il pelo sono stati sottoposti ad analisi per la ricerca del DNA di *L. infantum*.

La positività dei campioni e la relativa carica parassitaria, stimata attraverso la PCR, sono riportati nella tabella 14.

CAMPIONE	N° CAMPIONI PROCESSATI	CAMPIONI POSITIVI (%)	CARICA PARASSITARIA
TAMPONI CONGIUNTIVALI	32	0	0
TAMPONI ORALI	16	1 (6.25)	115
TAMPONI AURICOLARI	10	1 (6.25)	15
CAMPIONI K <sub>2</sub> EDTA	16	3 (18.75)	30-70
ASPIRATI LINFONODALI	10	6 (37.5)	518-6400
ASPIRATI SPLENICI	20	5 (31.5)	15-1750
ASPIRATI NODULARI	2	1 (50)	130
PELO	16	0	0

**Tabella 14.** Positività molecolare e carica parassitaria di *L. infantum* nei campioni esaminati

Le condizioni cliniche della maggior parte dei soggetti risultavano essere buone. I segni clinici caratteristici, rilevati durante la visita clinica, sono stati riportati nella tabella 15.

SEGNI CLINICI	NUMERO SOGGETTI (%)
---------------	---------------------

RIDOTTA BCS (1-9)	8 (36.4)
RIDOTTA MCS (1-4)	3 (18.75)
ANORESSIA	0
LETARGIA	0
FEBBRE	0
LINFOADENOMEGALIA	11 (68.75)
-LOCALE	1 (6.25)
-GENERALIZZATA	2 (9.1)
LESIONI CUTANEE	10 (62.25)
DERMATITE NODULARE	3 (13.6)
DERMATITE ULCERATIVA	0
DERMATITE DESQUAMATIVA	3 (18.75)
ALOPECIA	4 (25)
SPLENOMAGALIA	6 (36.4)
EPISTASSI	0
LESIONI OCULARI	4 (37.5)
BLEFAROCONGIUNTIVITE	2 (12.5)
GRANULOMI CONGIUNTIVALI	0
CHERATOCONGIUNTIVITE	2 (12.5)

**Tabella 15.** Segni clinici rilevati in cani affetti da *L. infantum*

Le alterazioni ematologiche e biochimiche dei soggetti positivi rilevate in seguito all'analisi dei campioni di sangue sono riportate in tabella 16 e 17. L'anemia era il reperto più frequentemente riportato tra le alterazioni ematologiche nei cani affetti da *L. infantum* e, in molti di questi, risultava essere lieve (77.8%). Tuttavia, in due soggetti questa alterazione si manifestava in forma moderata e grave. L'anemia risultava essere rigenerativa in due soggetti. Con una frequenza inferiore è stata registrata anche una moderata piastrinopenia e lievi alterazioni della formula leucocitaria. Tali reperti patologici sono stati confermati e stimati mediante la valutazione dello striscio ematico. In nessun cane è stata evidenziata iperazotemia e i valori di SDMA erano normali. L'esame delle urine ha messo in evidenza la presenza di proteinuria in otto soggetti. Tre cani presentavano una proteinuria borderline, con valori di UPCR compresi tra 0.2 e 0.5; cinque di loro presentavano grave proteinuria con valori di UPCR superiori a 5. Per

tutti i campioni (16) è stato analizzato il sedimento urinario. In quattro campioni è stata riscontrata la presenza di sedimento attivo, con moderata presenza di cellule di sfaldamento dell'epitelio urinario e cilindri. Tale riscontro era verosimilmente compatibile con la presenza di una patologia di natura infiammatoria o infettiva. In nessun soggetto è stata riscontrata cristalluria.

<b>PARAMETRO</b>	<b>ELEVATO (%)</b>	<b>BASSO (%)</b>	<b>NORMALE (%)</b>	<b>INTERVALLO DI RIFERIMENTO</b>
<b>Emocromo</b>				
Globuli rossi (M/ $\mu$ L)	1(6.25)	4(25)	11(68.6)	5.65-8.87
Ematocrito (%)	0	5(31.25)	11(68.6)	37.3-61.7
Emoglobina (g/dL)	0	7(43.75)	9(56.25)	13.1-20.5
MCV (fL)	0	2(12.5)	14(87.5)	61.6-73.5
MCHC (g/dL)	0	4(25)	12(75)	32.0-37.9
RDW (%)	0	2(12.5)	14(87.5)	13.6-21.7
Reticolociti (K/ $\mu$ L)	2(12.5)	0	14(87.5)	10.0-110.0
Globuli bianchi (K/ $\mu$ L)	1 (6.25)	0	15(93.75)	5.05-16.67
Neutrofili(K/ $\mu$ L)	1 (4.5)	0	16(100)	2.95-11.64
Linfociti (K/ $\mu$ L)	0	0	16(100)	1.05-5.10
Monociti(K/ $\mu$ L)	0	0	16(100)	0.16-1.12
Eosinofili(K/ $\mu$ L)	0	0	16(100)	0.06-1.23
Basofili(K/ $\mu$ L)	0	0	16(100)	0.00-0.10
Piastrine(K/ $\mu$ L)	0	6 (37.5)	10(62.5)	148-484
<b>Biochimico</b>				
BUN (mg/dL)	1(6.25)	0	15(93.75)	12-25
Creatinina(mg/dL)	0	0	16(100)	<2
TP (mg/dL)	2(12.5)	1(6.25)	14(25)	5.5-7.8
Albumina(mg/dL)	0	3(18.75)	13(81.25)	2.5-3.5

ALT (mg/dL)	2(12.5)	0	14(25)	<100
AST (mg/dL)	0	0	16(100)	<90
SDMA(µg/dL)	0	0	16(100)	8-14
<b>Urine</b>				
PS	4 (25)	12 (75)	0	1012-1023
UPCR	0	8 (50)	8 (50)	<0.5

**Tabella 16.** Alterazioni ematologiche, biochimiche e urinarie in cani affetti da *L. infantum* (CanL). MCV (Volume corpuscolare medio), MCHC (Concentrazione di emoglobina corpuscolare media), RDW (Ampiezza di distribuzione dei globuli rossi), BUN (Azoto ureico ematico), TP (Proteine totali), ALT (alanina aminotransferasi), AST (aspartato aminotransferasi), UPCR (Rapporto Proteine urinarie: Creatinina urinaria), PS (peso specifico)

Per ogni soggetto (Tabella 16), è stato valutato il grado di malattia renale, in accordo con le linee guida IRIS 2019. Per nessun soggetto è stato registrato un aumento della creatinina sierica. Anche i valori di SDMA risultavano nella norma. Per tre pazienti non è stato possibile rilevare i valori della pressione sistolica che risultavano aumentati in forma lieve in sette cani e in forma grave in tre.

SOGGETTI (IFAT LEISH)	CREATININA SIERICA (1.2- 1.8mg/dL)	SDMA (8-14 µg/dL)	PRESSIONE SISTOLICAmmHg	UPCR (0.2- 0.5mg/dL)	P.S.	STADIO IRIS
1- POS 1:10240	0.6	14	151 PT	0.86 P	1036	1
2- NEG 1:80	0.8	14	150 PT	0.13 NP	1040	0
3- POS 1:160	1.2	13	-	0.09 NP	1035	0
4- POS 1:80	0.7	12	160 HT	0.37 BP	1040	0
5- POS: 1:160	1.2	8	85 NT	0.10 NP	1049	0
6- POS 1: 1280	0.8	14	138 NT	0.16 NP	1040	1
7- POS 1: 320	0.9	14	-	0.11 NP	1052	0

8- POS 1:2560	0.5	10	-	0.63 P	1006	1
9- POS 1: 2560	0.9	13	140 PT	0.010 NP	-	Non stadiabile
10- POS1:640	0.8	-	154 PT	0.37 BP	1020	1
11-POS 1:80	0.6	13	168 HT	0.16 NP	1005	1
12-POS 1:160	0.8	12	126 NT	0.14 NP	1025	1
13- POS1:20480	0.7	8	152 PT	0.22 BP	1019	1
14-POS 1:20480	0.6	8	164 HT	4.65 P	1013	1
15- POS 1:2560	0.6	10	155 PT	7.35 P	1019	1
16- NEG 1:80	1.2	13	141 PT	0.41 BP	1037	0

**Tabella 17.** Stadiazione IRIS. PS (Peso Specifico Urinario); PT (Preipertensivo); HT (Iperteso); NT(Normoteso). P (Proteinurico); NP (Non proteinurico); BP (Proteinuria borderline)

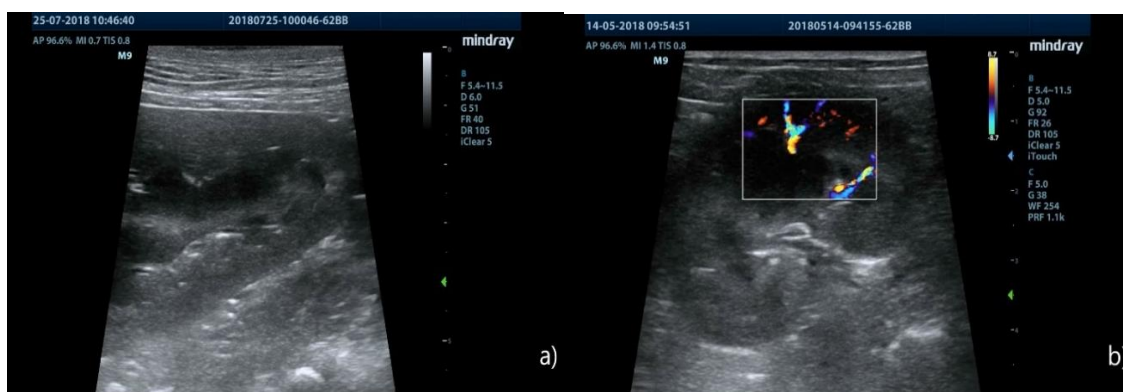
In nessun soggetto è stata riscontrata la positività per l'esame PCR-real time per la ricerca di materiale genetico di agenti patogeni trasmessi da vettore. Tuttavia, la ricerca sierologica di anticorpi diretti contro tali patogeni ha mostrato che molti cani presentavano una sieropositività per uno o più agenti eziologici (tabella 18).

AGENTI PATOGENI	SOGGETTI SIEROPOSITIVI (%)
<i>Erlichia canis</i>	2 (12.5)
<i>Rickettsia conorii</i>	11 (68.75)
<i>Anaplasma phagocytophilum</i>	4 (25)
<i>Coxiella burnetii</i>	1 (6.25)

**Tabella 18.** Prevalenza complessiva di anticorpi patogeni trasmessi da vettori (VBP) in cani affetti da *L. infantum*.

## RISULTATI ESAME ECOGRAFICO B-MODE E COLOR-DOPPLER

L'Esame ultrasonografico in B-mode e Doppler di tutti i soggetti esaminati non ha rilevato la presenza di alterazioni relative alla posizione, alla forma e ai margini dei reni. Non sono state evidenziate lesioni intraparenchimali, l'ecogenicità risultava normale e il rapporto cortico-midollare era mantenuto. Anche la vascolarizzazione, valutata mediante Doppler, risultava essere normale (Figura 1).

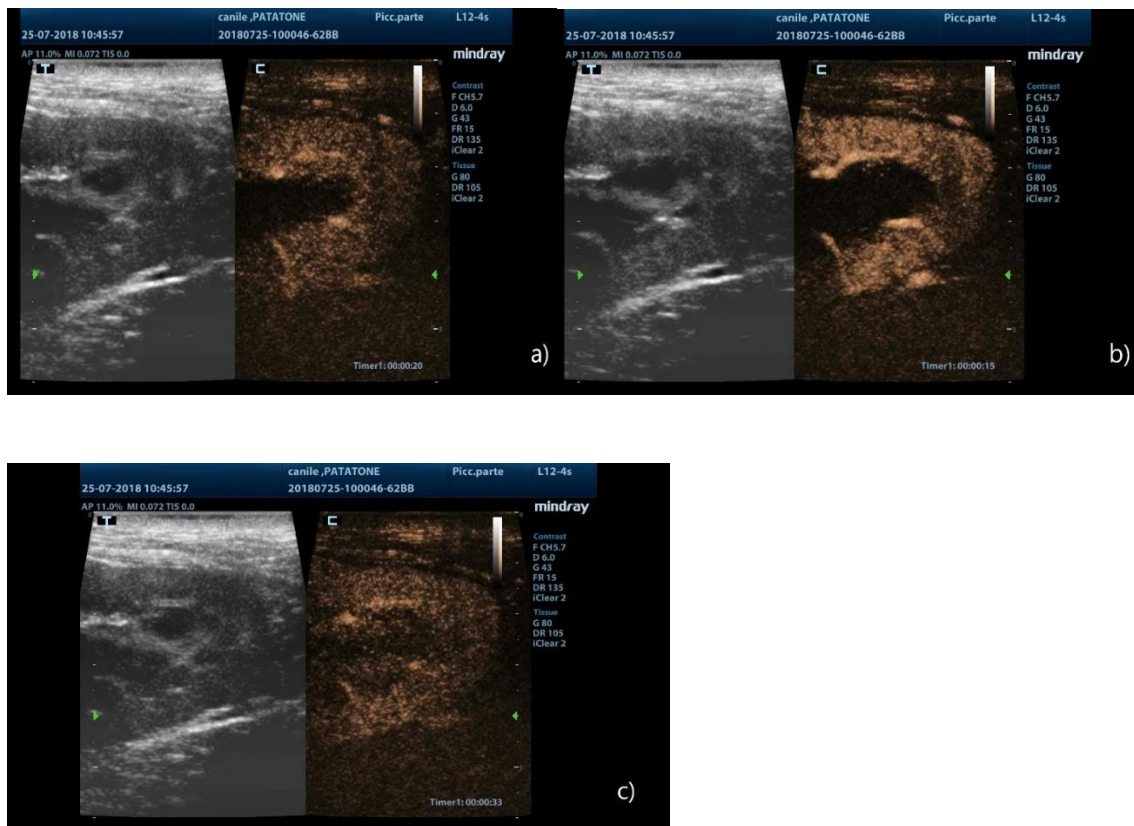


**Figura 1.** Esame ecografico del rene. a) Visualizzazione del parenchima renale in B-Mode. b) Valutazione della vascolarizzazione renale mediante Doppler

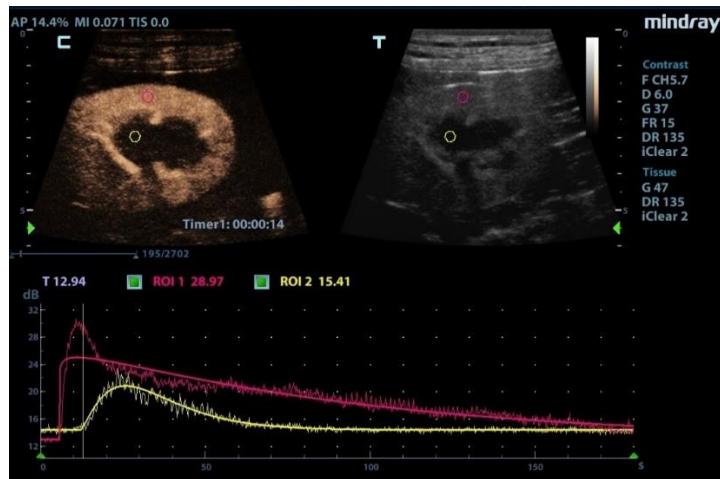


## RISULTATI CEUS QUALITATIVA

L'analisi qualitativa della CEUS ha permesso di evidenziare come la corticale renale mostrava un rapido afflusso iniziale del mezzo di contrasto, seguito da una fase di dissolvenza. Durante questa fase si verificava l'enhancement della midollare. L'aumento iniziale di contrasto della midollare era sempre ritardato rispetto a quello della corticale renale, rimanendo costantemente più grossolano e ipoecogeno. L'enhancement della corticale e della midollare renale sono raffigurati rispettivamente nella figura 2.



**Figura2.** CEUS qualitativa. Valutazione della perfusione renale mediante il picco di enhancement; **a)** Fase di arrivo del mezzo di contrasto; **b)** Enhancement della corticale renale; **c)** Enhancement della midollare renale.



**Figura 3.** Analisi CEUS quantitativa. Posizionamento della ROI corticale e midollare.



**Figura4.** Analisi CEUS quantitativa. Valutazione dei parametri perfusionali delle ROI corticale e midollare. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (Ascending Slope); DT/2 (Time from Peak to One-half); DS (Descending Slope); AUC (Area Under Curve); SEM (Standard Error of the Mean).

## RISULTATI CEUS QUANTITATIVA

I dati grezzi ricavati dall'analisi quantitativa sono stati riportati rispettivamente in tabella 19 e 20.

SOGGETTO	GOF	BI	AT	TTP	PI	AS	DT/2	DS	AUC
1	0,9	17,79	0,27	5,6	22,7	0,55	22,13	-0,15	1768,53
2	0,87	17,3	0,4	11,67	22,74	0,32	45,86	-0,08	2409,18
3	0,92	12,38	0,13	3,73	19,33	0,48	32,66	-0,12	1704,72
4	0,92	15,81	0,13	8,87	24,24	0,4	62,26	-0,08	3275,22
5	0,94	14,61	0,2	18,53	21,7	0,29	82,73	-0,06	3125,76
6	0,91	11,13	0,13	5,93	19,76	0,39	55,46	-0,09	2291,04
7	0,94	14,36	0,13	12,4	23,13	0,45	63,46	-0,09	3122,12
8	0,93	12,15	0,13	10,33	22,64	0,58	57,59	-0,11	2848,79
9	0,95	15,23	0,16	8,89	23,65	0,46	54,01	-0,09	3121,91
10	0,95	14,69	0,13	7,47	23,03	0,41	56,86	-0,08	3075,53
11	0,94	14,18	0,13	9,53	22,32	0,39	63,86	-0,08	3012,27
12	0,93	15,11	0,13	6,07	26,31	0,49	57,86	-0,11	3385,03
13	0,89	14,97	0,2	7,13	19,97	0,49	28,73	-0,12	1498,34
14	0,95	17,04	0,13	13	25,26	0,4	68,06	-0,07	3564,83
15	0,86	15,44	0,13	10,13	19,67	0,19	67,06	-0,04	2963,67
16	0,87	15,64	4,93	5,87	21,66	0,17	38,06	-0,08	2128,01

**Tabella 19:** Dati grezzi dell'analisi quantitativa relativa alla corticale renale dei soggetti analizzati. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (Ascending Slope); DT/2 (Time from Peak to One-half); DS (Descending Slope); AUC (Area Under Curve)

SOGGETTI	GOF	AT	TTP	PI	AS	DT/2	DS	AUC
1	0,83	2,13	8,87	20,66	0,41	20,33	-0,19	1555,6
2	0,7	0,33	6,73	19,99	0,11	48,6	-0,03	2256,49
3	0,94	3,87	13,4	18,3	0,41	25,86	-0,21	1488,51

4	0,88	0,13	14,6	22,33	0,42	60,19	-0,08	2982,62
5	0,93	0,6	10,33	17,68	0,42	31,46	-0,13	2241,35
6	0,94	0,47	14,87	18,78	0,44	45,4	-0,12	2072,39
7	0,91	0,13	7,87	20,04	0,66	35	-0,14	2416,59
8	0,93	0,13	16,6	21,43	0,53	64,59	-0,11	2655,94
9	0,94	0,9	10,52	18,6	0,34	31,82	-0,11	2462,71
10	0,93	0,13	11	20,66	0,31	61,59	-0,06	2871,89
11	0,89	0,6	17,2	18,3	0,17	67,79	-0,04	2619,62
12	0,96	2,8	14,07	19,82	0,37	31,2	-0,16	2567,22
13	0,87	0,47	9,93	18,53	0,32	36,2	-0,09	1388,47
14	0,96	0,13	11,53	22,97	0,41	60,46	-0,08	3120,06
15	0,81	5,33	26,66	18,55	0,08	72,59	-0,04	2790,3
16	0,95	7,53	23,06	21,37	0,31	56,33	-0,1	2065,51

**Tabella 20:** Dati grezzi relativi all'analisi quantitativa della midollare renale dei soggetti analizzati. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (Ascending Slope); DT/2 (Time from Peak to One-half); DS (Descending Slope); AUC (Area Under Curve)

L'analisi statistica relativa alla valutazione quantitativa della perfusione corticale renale ha evidenziato tempi di raggiungimento del picco di enhancement (TTP), di velocità di ingresso (AS) e di uscita (DT/2) significativamente più elevati nei soggetti leishmaniotici, di qualsiasi stadio clinico, rispetto al soggetto non infetto (rispettivamente: P .003, P.005, P.026). Il picco di enhancement (PI) e l'area sotto la curva (AUC) sono risultate essere maggiori rispetto al controllo solo negli stadi 1 e 2 (rispettivamente: P .012 e P .039). I dati registrati sono stati riportati in tabella 21.

Stadio	GOF	BI	AT	TTP	PI	AS	DT/2	DS	AUC
<b>0</b>								-	
_____	0.86 <sup>a</sup>	15.64 <sup>a</sup>	4.93 <sup>A</sup>	5.87 <sup>A</sup>	21.66 <sup>a</sup>	0.17 <sup>A</sup>	38.06 <sup>a</sup>	0.081 <sup>a</sup>	2128.1 <sup>a</sup>
<b>1</b>								-	
_____	0.92 <sup>b</sup>	14.89 <sup>a</sup>	0.21 <sup>B</sup>	11.04 <sup>B</sup>	22.23 <sup>a</sup>	0.39 <sup>B</sup>	57.39 <sup>b</sup>	0.086 <sup>a</sup>	2727.4 <sup>b</sup>
<b>2</b>								-	
_____	0.93 <sup>b</sup>	14.39 <sup>b</sup>	0.15 <sup>B</sup>	8.24 <sup>B</sup>	22.99 <sup>b</sup>	0.47 <sup>B</sup>	53.15 <sup>b</sup>	0.098 <sup>b</sup>	2823.6 <sup>b</sup>

<b>3+4</b>								-	
	0.90 <sup>b</sup>	15.33 <sup>a</sup>	0.17 <sup>B</sup>	8.66 <sup>B</sup>	21.85 <sup>a</sup>	0.38 <sup>B</sup>	53.17 <sup>b</sup>	0.087 <sup>a</sup>	2646.9 <sup>a</sup>
<b>SEM</b>	0.021	1.877	0.052	3.13	1.624	0.111	17.08	0.037	677.25
<b>P-value</b>	0.013	0.009	0.006	0.003	0.012	0.005	0.026	0.036	0.039

**Tabella 21** Analisi statistica della valutazione quantitativa della corticale renale. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (Ascending Slope); DT/2 (Time from Feak to One-hal); DS (Descending Slope); AUC (Area Uder Curve); SEM (Standard Error of the Mean).

L'analisi statistica relativa alla valutazione quantitativa della perfusione midollare renale ha evidenziato velocità di raggiungimento del picco di enhancement e di dimezzamento più rapidi, quantomeno nei soggetti di stadio 1 e 2, rispetto al soggetto non infetto (rispettivamente P .053 e P .028). Non ci sono state differenze significative nella entità dell'enhancement nei soggetti leishmaniotici. I dati registrati sono stati riportati in tabella 22.

<b>Stadio</b>	<b>GOF</b>	<b>AT</b>	<b>TTP</b>	<b>PI</b>	<b>AS</b>	<b>DT/2</b>	<b>DS</b>	<b>AUC</b>
<b>0</b>	0.95 <sup>a</sup>	7.40 <sup>A</sup>	23.06 <sup>a</sup>	21.37 <sup>a</sup>	0.31 <sup>a</sup>	56.33 <sup>a</sup>	-0.101 <sup>a</sup>	2065.51 <sup>a</sup>
<b>1</b>	0.87 <sup>a</sup>	1.01 <sup>B</sup>	10.59 <sup>b</sup>	19.67 <sup>a</sup>	0.40 <sup>a</sup>	40.22 <sup>b</sup>	-0.118 <sup>a</sup>	2277.11 <sup>a</sup>
<b>2</b>	0.92 <sup>a</sup>	0.92 <sup>B</sup>	13.22 <sup>b</sup>	19.56 <sup>a</sup>	0.34 <sup>a</sup>	48.86 <sup>a</sup>	-0.095 <sup>a</sup>	2427.64 <sup>a</sup>
<b>3+4</b>	0.89 <sup>a</sup>	2.01 <sup>BC</sup>	15.48 <sup>a</sup>	20.24 <sup>a</sup>	0.35 <sup>a</sup>	49.69 <sup>a</sup>	-0.107 <sup>a</sup>	2384.59 <sup>a</sup>
<b>SEM</b>	0.294	1.609	3.194	2.050	0.105	12.483	0.047	534.03
<b>P-value</b>	0.081	0.006	0.053	0.180	0.312	0.028	0.307	0.107

**Tabella 22.** Analisi statistica della valutazione quantitative della corticale renale in soggetti appartenenti a diversi stadi clinici. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (Ascending Slope); DT/2 (Time from Feak to One-hal); DS (Descending Slope); AUC (Area Uder Curve); SEM (Standard Error of the Mean).

Dall'analisi dei risultati è inoltre emerso che non vi sono state differenze significative nei parametri di perfusione vascolare sia della corticale che della midollare renale tra i soggetti in stadio IRIS 0 e 1.

<b>IRIS</b>	<b>GOF</b>	<b>BI</b>	<b>AT</b>	<b>TTP</b>	<b>PI</b>	<b>AS</b>	<b>DT/2</b>	<b>DS</b>	<b>AUC</b>
<b>0</b>								-	
	0.918	14.89	0.198	11.041	22.228	0.388	57.394	0.086	2727.4
<b>1</b>								-	
	0.863	13.23	0.164	7.620	20.455	0.414	46.822	0.074	2417.22
<b>SEM</b>	0.02	13.23	0.052	2.603	2.265	0.075	16.603	0.026	751.54
<b>P-value</b>	0.316	0.415	0.195	0.106	0.337	0.060	0.277	0.152	0.455

**Tabella 23.** Analisi statistica della valutazione quantitativa della midollare renale in relazione allo stadio IRIS. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (Ascending Slope); DT/2 (Time from Feak to One-hal); DS (Descending Slope); AUC (Area Uder Curve); SEM (Standard Error of the Mean).

<b>IRIS</b>	<b>GOF</b>	<b>AT</b>	<b>TTP</b>	<b>PI</b>	<b>AS</b>	<b>DT/2</b>	<b>DS</b>	<b>AUC</b>
<b>0</b>	0.872	0.41	10.58	19.66	0.40	<b>40.22</b>	-0.118	2277.11
<b>1</b>	0.913	0.85	13.08	20.14	0.37	48.44	-0.106	2356.39
<b>SEM</b>	0.09	0.32	3.40	1,81	0.19	13.95	0.06	534.03
<b>P-value</b>	0.159	0.186	0.107	0.315	0.344	0.199	0.362	0.409

**Tabella 24.** Analisi statistica della valutazione quantitativa della midollare renale in relazione allo stadio IRIS. GOF (Goodness of Fit); BI (Base Intensity); AT (Arrival Time) TTP (Time to Peak); PI (Peak Intensity) AS (AscendingSlope); DT/2 (Time from Feak to One-hal); DS (DescendingSlope); AUC (Area Uder Curve); SEM (Standard Error of the Mean).

## **7 Discussione e Conclusione**

L'ecografia con mezzo di contrasto è una tecnica diagnostica particolarmente adatta alla valutazione della perfusione renale nella pratica clinica. In letteratura sono presenti diversi lavori che dimostrano la fattibilità e l'accuratezza di questa metodica (Tsuruoka et al., 2010; Donget al., 2013; Haers et al., 2013; Stock et al., 2016; Stoke et al., 2017; Liu et al., 2018; Garessus et al., 2021).

Il danno renale è una delle principali manifestazioni cliniche della Leishmaniosi, questo insorge generalmente con una lieve proteinuria, evolve in una sindrome nefrosica grave ed esita, nello stadio terminale, in un'insufficienza renale cronica (Solano-Gallego et al., 2011; Costa et al., 2003; Zatelli et al., 2003).

La malattia renale cronica è una condizione patologica grave, progressiva e irreversibile. L'elevato indice di morbilità e mortalità richiede interventi terapeutici precoci, mirati a rallentare la progressiva perdita della funzionalità renale (Wouters et al., 2015; Graueret al., 2005).

Tuttavia, la diagnosi precoce di questa patologia risulta essere particolarmente indaginosa e complessa, soprattutto a causa della sua insorgenza asintomatica e della sua progressione rapida e irreversibile (Hill et al., 2016).

In questo contesto, la valutazione della perfusione renale effettuata mediante la metodica CEUS può essere utile per evidenziare precocemente alterazioni e disfunzioni della microvascolarizzazione renale, poiché tali modificazioni insorgono prima rispetto alla variazione dei parametri renali emato-biochimici (Dong et al., 2013).

In medicina veterinaria, così come in medicina umana, l'utilizzo dei diversi metodi di valutazione della perfusione e della funzionalità renale sono soggetti ad un'ampia gamma di variabili. Uno studio ha infatti evidenziato come nel cane la misurazione della velocità di filtrazione glomerulare, effettuata attraverso la scintigrafia renale utilizzando l'acido  $^{99m}\text{Tc}$ -DTPA (acido dietilamminopentacetico), subisce una variazione giornaliera dell'8,45% in un periodo di tempo variabile (3-26 giorni) (Kampa et al., 2003).

Un altro gruppo di studio ha invece analizzato la variazione del flusso ematico renale in pazienti umani sani mediante risonanza magnetica a contrasto di fase. Tale parametro variava del 23% per le misurazioni effettuata nella stessa giornata e del 20% per

misurazioni effettuate in un intervallo di tempo compreso tra 7 e 21 giorni (Bax et al., 2005).

Allo stesso modo anche i parametri di perfusione renale misurati mediante l'ecografia con mezzo di contrasto, in intervalli di tempo prolungati, possono essere soggetti a notevoli variazioni. Uno studio prospettico condotto su un campione di 8 cani ha evidenziato che i valori legati al tempo di perfusione subivano una variazione minore rispetto a quelli legati all'intensità; questi presentavano un coefficiente di variazione maggiore del 45% in un intervallo di tempo di 83 settimane. Dallo stesso studio si evince inoltre che esiste una minima variazione dei parametri perfusionali misurati nei reni dello stesso soggetto (Liu et al., 2018).

Tali variazioni possono essere giustificate dal fatto che diversi parametri dell'apparecchio (indice meccanico, profondità focale, frequenza del trasduttore) possono essere impostati e mantenuti costanti durante tutto lo studio in modo da ridurre il loro impatto sulla quantificazione della perfusione. Al contrario, i fattori legati al paziente, al mezzo di contrasto e all'esecuzione della metodica non possono essere standardizzati. L'intensità dell'immagine, ad esempio, viene frequentemente influenzata dalla pressione sanguigna del soggetto, dalla sua frequenza cardiaca, dalla filtrazione polmonare delle microbolle e dalla loro fagocitosi da parte delle cellule del sistema reticolo-endoteliale. Tutti questi fattori possono inoltre influenzare le caratteristiche e la concentrazione delle microbolle (Tang et al., 2011).

La variazione relativa alle microbolle del mezzo di contrasto può essere ulteriormente influenzata dalla loro stabilità, dalla loro dimensione e dalla metodica di somministrazione. Inoltre, variazioni più o meno significative possono derivare da aggiustamenti omeostatici fisiologici del rene in relazione alla variazione di pressione sanguigna, frequenza cardiaca e stato di idratazione del soggetto (Tang et al., 2011).

Nonostante ciò, l'ecografia con mezzo di contrasto, come la scintigrafia renale, è in grado di rilevare precocemente le alterazioni della microvascolarizzazione renale di uno o di entrambi gli organi. Questa caratteristica risulta essere particolarmente utile nella diagnosi precoce di malattia renale rispetto alla misurazione della creatinina sierica. Inoltre, la metodica CEUS, a differenza della scintigrafia, non utilizza traccianti radioattivi. Questo rende tale tecnica agevole, facilmente applicabile nella pratica clinica e poco invasiva per il paziente (Bertelli et al., 2019; Schwarze et al., 2020; Mastrorosato et al., 2021).

---



In questo studio sono stati analizzati i parametri perfusionali di 16 cani affetti da danno renale cronico lieve (stadio IRIS 0-1). In tutti i soggetti analizzati i livelli di creatinina sierica e di azotemia non presentavano alterazioni rilevanti. Solo in un soggetto è stata rilevato un lieve incremento della creatininemia. Anche l'esame ecografico in B-mode e Doppler non ha evidenziato alterazioni del parenchima renale e della sua vascolarizzazione. Tuttavia, l'analisi dei dati ottenuti mediante l'esame CEUS ha permesso di rilevare l'alterazione di determinati parametri perfusionali che si riscontrano tipicamente nelle forme lievi o iniziale di insufficienza renale cronica (Stoke et al., 2017; Liuet al., 2018; Garesus et al., 2021). La variazione di questi parametri è direttamente correlata ad un'alterazione della microvascolarizzazione renale causata, in questi soggetti, dalla Leishmaniosi (Solano-Gallego et al., 2009; Solano-Gallego et al., 2011; Geisweid et al., 2012; Roura et al., 2021).

L'analisi qualitativa delle immagini acquisite durante la CEUS mostra che la corticale renale presentava un rapido aumento del contrasto, seguito da una fase di dissolvenza. L'aumento iniziale della midollare invece si verificava in ritardo rispetto a quello della corticale in tutti i soggetti.

L'analisi quantitativa dei parametri di perfusione della corticale ha evidenziato un incremento significativo del tempo di raggiungimento del picco di enhancement (TTP), della velocità di ingresso (AS) e di quella uscita (DT/2) in tutti i soggetti leishmaniotici rispetto al soggetto non infetto. Inoltre, è stato visto che il picco di enhancement (PI) e l'area sotto la curva (AUC) sono risultate essere maggiori rispetto al controllo soltanto nei soggetti in stadio 1 e 2. L'analisi dei parametri relativi alla perfusione della midollare renale ha evidenziato velocità di raggiungimento del picco di enhancement e di dimezzamento più rapidi nei soggetti di stadio 1 e 2, rispetto al soggetto non infetto. Non sono state invece rilevate differenze significative nella entità dell'enhancement nei soggetti leishmaniotici e nei parametri perfusionali cortico-midollari dei soggetti di stadio IRIS 0 e 1. I risultati ottenuti, in accordo con quelli presenti in letteratura, hanno permesso di stimare il danno renale e di metterlo in relazione allo stadio clinico di malattia in cui si trovavano i pazienti presi in esame. Tuttavia, al fine di ottenere dati più indicativi e precisi occorre effettuare una valutazione di tali parametri su un numero maggiore di soggetti, e in pazienti in stadio IRIS maggiore.

Come detto in precedenza la diagnosi precoce di questa patologia risulta essere fondamentale ai fini terapeutici e prognostici, soprattutto in condizioni patologiche particolarmente diffuse come la Leishmaniosi. In questo scenario la metodica CEUS

risulta essere una tecnica diagnostica particolarmente utile, poiché consente di rilevare precocemente le alterazioni dei parametri perfusionali che, in accordo con i dati presenti in letteratura, possono essere utilizzati come marker di valutazione della microvascolarizzazione renale e quindi della funzionalità dell'organo stesso (Liu et al., 2018; Garessus et al., 2021).

---

## BIBLIOGRAFIA

Abbate, M., Zoja, C., Remuzzi, G. (2006)

How does proteinuria cause progressive renal damage

*Journal of the American Society of Nephrology*, 17, 2974-2984

Acierno, M. J., Brown, S., Coleman, A. E., Jepson, R. E., Papich, M., Stepien, R. L., & Syme, H. M. (2018)

ACVIM consensus statement: Guidelines for the identification, evaluation, and management of systemic hypertension in dogs and cats

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(6), 1803-1822

Albrecht, T., Blomley, M., Bolondi, L., Claudon, M., Correas, J., Cosgrove, D., Greiner, L., Jager, K., de Jong, N., Leen, E., Lencioni, R., Lindsell, D., Martegani, A., Solbiati, L., Thorelius, L., Tranquart, F., Weskott, H.P., Whittinghamet, T. (2004)

Guidelines for the use of contrast agents in ultrasound

*Ultraschall in der Medizin*, 25, 249–256

Aresu, L., Martini, V., Benali, S. L., Brovida, C., Cianciolo, R. E., Dalla Riva, R., Zini, E. (2017) European Veterinary Renal Pathology Service: A Survey Over a 7-Year Period (2008-2015)

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 31(5), 1459–1468

Bandari, J., Fuller, T.W., Turner, R.M., D'Agostino, L.A. (2016)

Renal biopsy for medical renal disease: indications and contraindications

*Can J Urol*, 23(1), 8121-6

Banzato, T., Rubini, G., Orlandi, R., Bargellini, P., Bonsembiante, F., & Zotti, A. (2019)

Contrast-enhanced ultrasound features of hepatocellular carcinoma in dogs

*Veterinary Record*, 15, 186(6), 187

Barbosa, C., Souza, M., Scalercio, S., Silva, T., Domingues, S., Silva, L. (2013)

---

Ovarian and uterine periovulatory Doppler ultrasonography in bitches

*Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(9), 1144-1150

Bargellini, P., Orlandi, R., Dentini, A., Paloni, C., Rubini, G., Fonti, P., Diana, A.; Peterson, M.E., Boiti, B. (2016)

Use of Contrast-Enhanced Ultrasound in the Differential Diagnosis of Adrenal Tumors in Dogs

*Journal of the American Animal Hospital Association*, 52, 132–143

Bargellini, P., Orlandi, R., Paloni, C., Rubini, G., Fonti, P., Peterson, M.E., Boiti, C. (2013)

Contrast-Enhanced Ultrasonographic characteristics of adrenal glands in dogs with pituitary dependent hyperadrenocorticism

*Veterinary Radiology and Ultrasound*, 54(3), 283-292

Bax, L., Bakker, C.J.G., Klein, W.M., Blanken, N., Beutler, J.J., Mali, W.P.T.R.M. (2005)

Misurazioni del flusso sanguigno renale con l'uso di fase-contrasto magnetico risonanza magnetica: Valori normali e riproducibilità

*J Vasc Interv Radiol*, 16, 807-814

Bertelli, E., Mercatelli, L., Savi, E., Pili, A., Verna, S., Palombella, A., Miele, V. (2019)

Surgical margin follow-up after nephron-sparing surgery: the possible role of CEUS

*Journal of Ultrasound*, 23(4), 515-520

Blafox, M.D., DePalma, D., Taylor, A., Szabo, Z., Prigent, A., Samal, M., Li, Y., Santos, A., Testanera, G., Tulchinsky, M. (2018)

The SNMMI and EANM practice guideline for renal scintigraphy in adults

*European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 45(12), 2218-2228

Blohm, K.O., Hittmail, K.M., Tichy, A., Nell, B. (2019)

Qualitative, noninvasive assessment of intra- and extraocular perfusion by contrast-enhanced ultrasonography and its clinical applicability in healthy dogs

---

*Vet Ophthalmol*,22(6),767-777

Bragato, N.; Borges, N.C.; Fioravanti, M.C.S. (2017)

B-mode and Doppler ultrasound of chronic kidney disease in dogs and cats

*Vet. Res. Commun*, 41, pp.307–315

Braun, J. P., Lefebvre, H. P., & Watson, A. D. J. (2016)

Creatinine in the Dog: A Review

*Veterinary Clinical Pathology*, 53(2), 309-326

Boyd, L.M., Langston, C., Thompson, K., Zivin, K., Imanishi, M. (2008)

Survival in cats with naturally occurring chronic kidney disease (2000–2002)

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 22, 1111-1117

Brown CA, Elliott J, Schmiedt CW, et al. (2016)

Chronic kidney disease in aged cats: Clinical features, morphology, and proposed pathogeneses

*Vet Pathol*,53:309–326

Brown, S.A. Elliott, J., Grauer, G.F. (2007)

BSAVA Manual of Canine and Feline Nephrology and Urology

2nd edition. Gloucester, England: British Small Animal Veterinary Association, pp. 223-230

Buyukdereli, G., Burak, Guney, I. (2006)

Role of Technetium-99m N,N-Ethylenedicysteine Renal Scintigraphy in the Evaluation of Differential Renal Function and Cortical Defects

*Clinical Nuclear Medicine*, 31, 3

Burti, S., Zotti, A., Rubini, G., Orlandi, R., Bargellini, P., Bonsembiante F., Banzato T. (2020)

Contrast-enhanced ultrasound features of malignant focal liver masses in dogs

*Scientific report*, 10:6076

---

Cantisani, V., Bertolotto, M., Weskott, H. P., Romanind, L., Grazhdani, H., Passamonti, M., Drudi, F.M., Malpassini, F., Isidori, A., Meloni, F.M., Calliada, F., D'Ambrosio, F. (2015)

Growing indications for CEUS: The kidney, testis, lymph nodes, thyroid, prostate, and small bowel.

*European Journal of Radiology*, 84, 1675–1684

Carret, C.; Walas, F.; Carcy, B.; Grande, N.; Précigout, E.; Moubri, K.; Schetters, T.P.; Gorenflot, A. (1999)

*Babesia canis canis*, *Babesia canis vogeli*, *Babesia canis rossi*: Differentiation of the three subspecies by a restriction fragment length polymorphis manalysis on amplified small subunitribosomal RNA genes

*J. EukaryotMicrobiol*,46, 298–303

Caruso, G., Salvaggio, G., Campisi, A., Melloni, D., Midiri, M., Bertolotto, M., Lagalla, R. (2010)

Bladder Tumor Staging: Comparison of Contrast-Enhanced and Gray-Scale Ultrasound  
*American Journal of Roentgenology*, 96, 151-156

Choi, Y.J.; Jang, W.J.; Kim, J.H.; Ryu, J.S.; Lee, S.H.; Park, K.H.; Paik, H.S.; Koh, Y.S.; Choi, M.S.; Kim, I.S. (2005)

Spotted fever group and typhus group rickettsioses in humans, South Korea

*EmergInfect. Dis.*, 11, 237–244

Choi, S., Jeong, W., Lee, Y., & Choi, H. (2016)

Contrast enhanced ultrasonography of kidney in conscious and anesthetized beagle dogs

*The Journal of Veterinary Medicine Science*, 78(2), 239-244

Claudon, M., Cosgrove, D., Albrecht, T., Bolondi, L., Bosio, M., Calliada F., Correias, J.M., Darge, K., Dietrich, C., D'Onofrio, M., Evans, D.H., Filice, C., Greiner, L., Jäger, K., Jong, N., Leen, E., Lencioni, R., Lindsell, D., Martegani, A., Meairs, S., Nolsøe, C., Piscaglia, F., Ricci, P., Seidel, G., Skjoldbye, B., Solbiati, L., Thorelius, L., Tranquart, F., Weskott, H.P., Whittingham, T.

---

Guidelines and good clinical practice recommendations for contrast enhanced ultrasound (CEUS) - update 2008

*Ultraschall in derMedizine,29(1),28-44*

Coran, A., Di Maggio, A., Rastrelli, M., Alberioli, E., Attar, S., Ortolan, P., Bortolanza, C., Tosi, A., Montesco, M.C., Bezzon, E., Rossi, C.R., Stramare, R. (2015)

Core needle biopsy of soft tissue tumors, CEUS vs US guided: a pilot study

*Journal of Ultrasound, 18(4), 335-342*

Cordella, A., Pey, P., Linta N., Quinci, M., Baron Toaldo M., Pisoni, L., Bettini, G., Diana, A. (2020)

Use of Contrast-Enhanced Ultrasonography for the Characterization of Tumor Thrombi in Seven Dogs

*Animals, 10, 1613*

Costa, H., Goto, F., Saldanha, L., Silva, S., Sinhorini, I., Silva, T., Guerra, J.L. (2003)

Histopathologic Patterns of Nephropathy in Naturally Acquired Canine Visceral Leishmaniasis

*Veterinary Pathology,40, 677-684*

Cowgill, L.D., Elliot, D.A. (2002)

Insufficienzarenaleacuta, in: TRATTATO DI MEDICINA VETERINARIA MALATTIE DEL CANE E DEL GATTO

Ettinger, S.J., Feldman, E.C.

*Antonio Delfino Editore: Roma, Italia.Vol II, pp. 1615-1617*

Cowgill, L.D. (1999)

Trattamento medico dell'anemia da IRC, in NEFROLOGIA E UROLOGIA DEL CANE E DEL GATTO

Osborne, C.A., Finco, D.R.,

*UTET: Torino, Italia.pp. 559-562*

D'Amico, G. (1999)

Tubulointerstitium as predictor of progression of glomerular diseases

---

*Nephron*, 83, 289-295

D'Onofrio, M., Gallotti, A., Principe, F., & Pozzi Mucelli, R. (2010)

Contrast-enhanced ultrasound of the pancreas

*World Journal of Radiology*, 2(3), 97-102

Damasio, B.M., Bodria, M., Dolores, M., Durand, E., Sertorio, F., Wong, M.C.Y., Dacher, J.N., Hassani, A., Mattioli, G., Magnano, G., Pierre, Vivier, H. (2019)

Comparative Study Between Functional MR Urography and Renal Scintigraphy to Evaluate Drainage Curves and Split Renal Function in Children With Congenital Anomalies of Kidney and Urinary Tract (CAKUT)

*Front. Pediatr*, 7, 527

De la Fuente, J.; Massung, R.F.; Wong, S.J.; Chu, F.K.; Lutz, H.; Meli, M.; von Loewenich, F.D.; Grzeszczuk, A.; Torina, A.; Caracappa, S. (2005)

Sequence analysis of the msp4 gene of *Anaplasma phagocytophilum* strains

*J. Clin. Microbiol*, 43, 1309–1317

De Majo, .M, Donato, G., Masucci, M., Mangano, C., Persichetti, M.F., Liotta, L., Mazzullo, G., Visalli, R., Quartuccio, M., Iannelli, N.M., Cristarella, S., Pennisi, M.G. (2021)

Bidimensional and Contrast-Enhanced Ultrasonography of the Spleen in Dogs Affected by Leishmaniosis

*Animals (Basel)*, 11(5), 1437

Di Bartola, S.P., Ettinger, S.J., Feldman, E.C. (2002)

Approccio clinico e valutazioni di laboratorio della malattia renale, in: TRATTATO DIMEDICINA VETERINARIA MALATTIE DEL CANE EDEL GATTO.

*Antonio Delfino Editore: Roma, Italia. Vol II, p. 1600*

Di Renzo, D., Persico, A., Lisi, G., Miscia, M. E., Lauriti, G., Sassano, G., Lelli Chiesa, P. (2020)

Contrast-enhanced ultrasonography (CEUS) in the follow-up of pediatric abdominal injuries: value and timing

---



*Journal of Ultrasound*,23(2),151-155

Diana, A., Linta, N., Cipone, M., Fedone, V., Steiner, J., Fracassi, F., Grandis, A., BaronToaldo, M., (2015). Contrast-enhanced ultrasonography of the pancreas in healthy cats.

*BioMedical Central Veterinary Research*, 11:64

Dietrich, C., Ignee, A., Hocke, M., Schreiber-Dietrich, D., & Greis, C. (2011)

Pitfalls and artefacts using contrast enhanced ultrasound.

*Zeitschrift Fur Gastroenterologie*, 49, 350-356.

Dong, Y., Wang, C. W., Fan, P., & Lin, X. (2013).

Quantitative Evaluation of Contrast-Enhanced Ultrasonography in the Diagnosis of Chronic Ischemic Renal Disease in a Dog Model

*Plos One* 8(8)

Dong, L., Hong-Chen Q., Ning, L., Xing-Wang, Z., Yi-Li L., Chun-Lai L. (2016)

The Value of Contrast-Enhanced Ultrasonography and Contrast-Enhanced CT in the Diagnosis of Malignant Renal Cystic Lesions: A Meta-Analysis

*PolseOne*, (11)5,0155857

Drudi, F., Di Leo, N., Maghella, F., Malpassini, F., Iera, J., Rubini, A., Orsogna, N., D'Ambrosio, F. (2014)

CEUS in the study of bladder, method, administration and evaluation, a technical note

*Journal of Ultrasound*, 17, 57-63

Drudi, F., Di Leo, N., Malpassini, F., Antonini, F., Corongiu, E., & Iori, F. (2012)

CEUS in the differentiation between low and high-grade bladder carcinoma.

*Journal of Ultrasound*, 15, 247-251

Elac, F.I., Elac, A.D., Bolboaca, S., Socaciu, M.A., Muntean, A.M., Iacob, G., Moisoiu, T., Zaro, R., Andries, A.I., Badulescu, M.R., Ignat, R.M., Badea, R.I. (2020)

Contrast-enhanced ultrasonography in the initial evaluation of the kidney graft function: a pilot study

---

*Med Ultrason*,22(3), 272-278

Esch, K.J.; Juelsgaard, R.; Martinez, P.A.; Jones, D.E.; Petersen, C.A. (2013)  
Program med death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs  
phagocyte function  
*J. Immunol*, 191, 5542–5550

Evans, H. E., & De Lahunta, A. (2013)  
Miller's anatomy of the dog  
*Elsevier Saunder*

Fiev,D.,Proskuraa,A.,Khokhlacheva,S.,Taratkina,M.,Borisovd,V.,Chernenkiya,M.,Gabd  
ulinae,S.,Leonarde,S.P,Alyaeva,Y.,Gomez Rivasf,J.,Enikeeva,D.,Glybochkoa,P. (2020)  
A prospective study of novel mathematical analysis of the contrast-enhanced computed  
tomography vs renal scintigraphy in renal function evaluation  
*European Journal of Radiology*, 130,109-169

Finch NC, Syme HM, Elliott J. (2018)  
Development of an estimated glomerular filtration rate formula in cats  
*J Vet Intern Med*,32,1970–1976

Finco, D., Brown, S., Crowell, W., et al. (1992)  
Effects of dietary phosphorus and protein in dogs with chronic renal failure.  
*American Journal of Veterinary Research*, 53, 2264-2271

Fine, L., & Norman, J. (2008).  
Chronic hypoxia as mechanism of progression of chronic kidney diseases: from  
hypothesis to novel therapeutics.  
*Kidney International*, 74(7), 867-872

Fine, L., Bandyopadhyay, D., Norman, J. (2000)  
Is there a common mechanism for the progression of different types of renal diseases  
other than proteinuria? Towards the unifying theme of chronic hypoxia.  
*Kidney International*, 75, 22-26

---

Fleck, C., Schweitzer, F., Karge, E., Busch, M., & Stein, G. (2003)  
Serum concentrations of asymmetric (ADMA) and symmetric (SDMA)  
dimethylarginine in patients with chronic kidney diseases  
*Clinica Chimica Acta*, 336(1-2), 1–12

Friedrich-Rust, M., Glasemann, T., Polta, A., Eichler, K., Holzer, K., Kriener, S.,  
Herrmann, E., Nierhoff, J., Bon, D., Bechstein, W.O., Vogl, T., Zeuzem, S., Bojunga, J.  
(2011)  
Differentiation between Benign and Malignant Adrenal Mass using Contrast-Enhanced  
Ultrasound  
*Ultraschall in der Medizin*, 32, 460-471

Fournier, Q., Thierry, F., Longo, M., Malbon, A., Cazzini, A., Bisson, J., Woods, S.,  
Liuti, T., Bavcar, S. (2020)  
Contrast-enhanced ultrasound for sentinel lymph node mapping in the routine staging of  
canine mast cell tumors: A feasibility study  
*Veterinary and Comparative Oncology*, 1–12

Garessus, J., Brito, W., Loncle, N., Vanelli, A., Hendriks-Balk, M., Wuerzner, G.,  
Schneider, A., Burnier, M., Pruijm, M. (2021)  
Cortical perfusion as assessed with contrast-enhanced ultrasound is lower in patients  
with chronic kidney disease than in healthy subjects but increases under low salt  
conditions  
*Nephrol Dial Transplant*, gfab001

Geisweid, K.; Mueller, R.; Sauter-Louis, C.; Hartmann, K. (2012)  
Prognostic analytes in dogs with *Leishmania infantum* infection living in a non-endemic  
area  
*Vet Rec*, 171, 399

Girometti, R., Stocca, T., Serena, E., Granata, A., Bertolotto, M. (2017)  
Impact of contrast-enhanced ultrasound in patients with renal function impairment  
*World J Radiol*, 28, 9(1): 10–16

---

Guidi, G. (2006)

Alterazioni dell'apparato urinario, in AILUROPATIE – DAL SINTOMO ALLA TERAPIA

*SEE: Firenze, Italia, Vol II, pp. 147-154*

Grauer, G.F. (2005)

Rilevamento precoce del danno renale e della malattia nei cani e nei gatti.

*Vet Clin North Am Small AnimPract,35:581-596.*

Grauer, G.F. (2010)

Indagini diagnostiche per l'apparato urinario In: Nelson R.W.; Couto C.G. MEDICINA INTERNA DEL CANE E DEL GATTO

*ELSEVIER: Milano, Italia. pp. 625-628*

Grauer, G.F., Nelson, R.W., Couto, C.G. (2010)

Insufficienza renale, in MEDICINA INTERNA DEL CANE E DEL GATTO

*pp. 655-658; ELSEVIER: Milano, Italia.*

Nelson, R.W., Couto, C.G.

*ELSEVIER: Milano, Italia. pp. 619-622*

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 & Ultrasound, 51(5), 516-522*

Haers, H., Daminet, S., Smets, P., Duchateau, L., Aresu, L., & Saunders, J. (2013)

Use of quantitative contrast-enhanced ultrasonography to detect diffuse renal changes in Beagles with iatrogenic hypercortisolism.

*American Journal of Veterinary Research, 74, 70-77.*

a.Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., & Jewell, D. E. (2014)

---

Comparison of Serum Concentrations of Symmetric Dimethylarginine and Creatinine as Kidney Function Biomarkers in Cats with Chronic Kidney Disease.

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28, 1676–1683

b.Hall, J. A., Yerramilli, M., Obare, E., Yerramilli, M., Yu, S., & Jewell, D. E. (2014)

Comparison of serum concentrations of symmetric dimethylarginine and creatinine as kidney function biomarkers in healthy geriatric cats fed reduced protein foods enriched with fish oil, L-carnitine, and medium-chain triglycerides.

*The Veterinary Journal*, 202(3), 588–596.

Han, B.H., Park, S.B. (2021)

Usefulness of Contrast-Enhanced Ultrasound in the Evaluation of Chronic Kidney Disease

*Curr Med Imaging*

Harris, R.C., Neilson, E.G. (2006)

Toward a unified theory of renal progression

*The Annual Review of Medicine* 57: 365-380

Hill, N.R., Fatoba, S.T., Oke, J.L. (2016)

Prevalenza globale della malattia renale cronica - revisione sistematica e meta-analisi

*PLoS One*, 11: e0158765

Hokamp, J.A., Leidy, S.L., Gaynanova, I., Cianciolo, R.E., Nabity, M.B. (2018)

Correlation of electrophoretic urine protein banding patterns with severity of renal damage in dogs with proteinuric chronic kidney disease

*Vet Clin Pathol*, 1–10

Houboisa, C., Hanedera, S., Merкта, M., Morellib, J.N., Schmidtc, M., Hellmichd, M., Muellere, R., Wahbaf, R., Maintza, D., Pueskena, M. (2018)

Can computed tomography volumetry of the renal cortex replace MAG3-scintigraphy in all patients for determining split renal function

*European Journal of Radiology*, 103, 105–111

---

Hostetter, T.H., Olson, J.L., Rennke, H.G., Venkatachalam, M.A., Brenner, B.M. (2011)  
Hyperfiltration in remnant nephrons: a potentially adverse response to renal ablation  
*Journal of the American Society of Nephrology*,12(6), 1315-25

Hudson, J.A., Brawner Jr. W.R., Holland M., et al. (2002)  
Abnominal radiology for the small animal practioners  
*Made Easy Series-Teton New Media. Ed., pp.106-140*

Inokuma, H.; Fujii, K.; Matsumoto, K.; Okuda, M.; Nakagome, K.; Kosugi, R.;  
Hirakawa, M.; Onishi, T. (2002)  
Demonstration of Anaplasma (Ehrlichia) platysinclusions in peripheral blood platelets of  
a dog in Japan  
*Vet. Parasitol*,110, 145–152

IRIS (International Renal Interest Society) (2019)  
IRIS Staging and treatment recommendations for CKD  
<http://www.iris-kidney.com>.

<https://www.leishvet.org/fact-sheet/clinical-staging/>

Jacob F., Polzin, D.J., Osborne, C.A. (2005)  
Evaluation of the association between initial proteinuria and morbidity rate or death in  
dogs with naturally occurring chronic renal failure  
*Journal of the American Veterinary Medical Association*, 226(3), 393-400

Jang, H., Yu, H., & Kim, T. (2009)  
Contrast-enhanced ultrasound in the detection and characterization of liver tumors.  
*Cancer Imaging*, 9, 96-103.

Jin, L., Xie, F. (2020)  
Untargeted Contrast-Enhanced Ultrasound Versus Contrast-Enhanced Computed  
Tomography: A Differential Diagnostic Performance (DDP) Study for Kidney Lesions  
*CLINICS* ,75, e1489

---

Kampa, N., Boström, I., Lord, P., Wennstrom, U., Ohagen, P., Maripuu, E. (2003)  
Variabilità giornaliera nella velocità di filtrazione glomerulare in cani normali mediante  
tecnica *scintigrafica*  
*J Vet Med Ser A*,50,37-41

Kampa, N., Lord, P., Maripuu, E. (2006)  
Effect of observer variability on glomerular filtration rate measurement by renal  
scintigraphy in dogs  
*Vet RadiolUltrasound*,47,212-221.

Kinns, K., Aronson, L., Hauptman, J., & Seiler, G. (2010)  
Contrast-Enhanced Ultrasound of The Feline Kidney  
*Veterinary Radiology & Ultrasound*, 51(2), 168-172

Kirberger, R. M., Cassel, N., Carstens, A., & Goddard, A. (2012)  
The effects of repeated intravenous iohexol administration on renal function in healthy  
beagles – a preliminary report  
*Acta Veterinaria Scandinavica*, 54(1), 47

Kopke, M. A., Burchell, R. K., Ruaux, C. G., Burton, S. E., Lopez-Villalobos, N.,  
& Gal, A. (2018)  
Variability of Symmetric Dimethylarginine in Apparently Healthy Dogs  
*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(2), 736–742.

Lee, G., Jeon, S., Lee, S., Cheon, B., Moon, S., Park, J-G., Cho, K., Choi, J. (2017)  
Quantitative evaluation of renal parenchymal perfusion using contrast-enhanced  
ultrasonography in renal ischemia-reperfusion injury in dogs  
*Journal of Veterinary Science*,18(4), 507-514

Lees, G.F., Osborne, C.A., Finco, D.R. (1999)  
Elementi di nefrologia ed urologia clinica. In: NEFROLOGIA E UROLOGIA DEL  
CANE E DEL GATTO  
*UTET: Torino, Italia. pp. 64-65,*

---

Lees, G.E. Elliot, J., Grauer, G. F. (2007)

Juvenile and familial nephropathies, in Manual of canine and feline nephrology and urology

*2nd ednBSAVA, pp 79-86*

Lees, G. E., Cianciolo, R. E., Clubb, F. J. (2011)

Renal Biopsy and Pathologic Evaluation of Glomerular Disease

*Topics in Companion Animal Medicine, 26(3), 143–153*

Liu, D. J. X., Hesta, M., Stock, E., Bogaerts, E., Broeckx, B. J. G., Saunders, J. H., &Vanderperren, K. (2018)

Renal perfusion parameters measured by contrast-enhanced ultrasound in healthy dogs demonstrate a wide range of variability in the long-term

*Veterinary Radiology & Ultrasound,60(2),201-209*

Lim, S., Nakamura, K., Morishita, K., Sasaki, N., Murakami, M., Osuga, T., Ohta, H., Yamasaki, M., Takiguchi, M. (2014)

Qualitative and Quantitative Contrast-Enhanced Ultrasonographic Assessment of Cerulein-Induced Acute Pancreatitis in Dogs.

*Journal of VeterinaryInternal Medicine, 28, 496-503*

Linta, N., Baron Toaldo, M., Bettini, G., Cordella, A., Quinci, M., Pey, P., 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(1),141*

Linta, N., Baron Toaldo, M., Del Magno, S., Pey, P., Quinci, M., & Diana, A. (2019)

Two-dimensional and contrast-enhanced ultrasound of intestinal ischaemia in cats: four cases

*Journal of Feline Medicine and Surgery,22(4),384-390*

Ljutić, D., Kes, P. (2003)

The role of arterialhypertension in the progression of non-diabeticglomerular diseases.

---



*NephrologyDialysisTransplantation*, 18(5), 28-30

Liu, L.N., Xu, H.X., Lu, M.D., Xie, X.Y., Wang, W.P., Hu, B., Yan, K., Ding, H., Tang, S.S., Qian, L.X., Luo, B.M., Wen, Y.L. (2012)

Contrast-Enhanced Ultrasound in the Diagnosis of Gallbladder Diseases: A Multi-Center Experience.

*Plos One*,7(10): e 48371

Liu, L., Zhao, Y., Zhang, Y., &Liu, J. (2015)

Differential diagnosis between benign and malignant gallbladder diseases with contrast-enhanced ultrasound.

*Ultrasound in Medicine and Biology*, 41, 99-105

Liu, H., Liu, J., Zhang, Y., Liao, J., Tong, Q., Gao, F., Hu, Y., Wang, W. (2016)

Contrast-enhanced ultrasound and computerized tomography perfusion imaging of a liver fibrosis-early cirrhosis in dogs.

*J Gastroenterol Hepatol*,31(9),1604-10

Littman, M.P., Daminet, S., Grauer, G.F., Lees, G.E., van Dongen, A.M. (2013)

Consensus Recommendations for the Diagnostic Investigation of Dogs with Suspected Glomerular Disease

*J Vet Intern Med*,27: S19–S26

Löffler, C., Sattler, H., Uppenkamp, M., &Bergner, R. (2016)

Contrast-enhanced ultrasound in coxitis

*Joint Bone Spine*, 669-674

Macrì, F., Di Pietro, S., Liotta, L., & al., e. (2016)

Effects of size and location of regions of interest examined by use of contrast-enhanced ultrasonography on renal perfusion variables of dogs.

*American Journal of Veterinary Research*, 77(8), 869-876

Macrì, F., Angileri, V., Russo, T., Russo, M.T., Tabbì, M., Di Pietro, S. (2021)

---

Evaluation of Bone Healing Using Contrast-Enhanced Ultrasonography in Non-Operative Treatment of Tibial Fracture in a Puppy Dog

*Animals (Basel)*, 23,11(2),284

Mangano,C.,Macrì,F.,DiPietro,S.,Pugliese,M.,Santoro,S.,Iannelli,N.M.,Mazzullo,G.,Crupi,R.,De Majo,M. (2019)

Use of contrast-enhanced ultrasound for assessment of nodular lymphoid hyperplasia (NLH) in canine spleen

*BMC VeterinaryResearch*, 15:196

Mastrorosato, M., Bertelli, E., Bonini, M.C., Danti, G., Vannini, C., Agostini, S., Miele, V. (2019)

Correction to: Rare case of an upper urinary tract carcinoma (UTUC) in renal pelvis and ureter associated to renal vein thrombosis: diagnostic imaging with CECT, MRI and CEUS

*J Ultrasound*,22(3),371

Mattei, C., Pelander, L., Hansson, K., Uhlhorn, M., Olsson, U., Häggström, J., Ljungvall, I., Ley, C.J. (2019)

Renal ultrasonographic abnormalities are associated with low glomerular filtration rate calculated by scintigraphy in dogs

*VetRadiolUltrasound*,60:432–446

Meomartino, L., D'Ippolito, P., Zatelli, A. (2014)

Diagnostica per immagini In: Malattie renali del cane e del gatto. Manuale di diagnosi e terapia

*EDRA; 2014.pp. 56-76*

Miele, V., Piccolo, C., Galluzzo, M., Ianniello, S., Sessa, B., & Trinci, M. (2016)

Contrast-enhancedultrasound (CEUS) in bluntabdominal trauma.

*The British Journal of Radiology*, 89

Minkus, G., Reusch, C., Horauf, A. (1994)

---

Evaluation of renal biopsies in cats and dogs- histopathology in comparison with clinical data

*Journal of Small Animal Practice*, 35, 465- 472

Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Oliva, G.; Baneth, G. (2008)

Canine leishmaniosis—New concepts and insights on an expanding zoonosis: Part two

*Trends Parasitol*, 24, 371–377

Mitchell, S., Toald, R., Daniell, G., & Rohrbach, B. (1998)

Evaluation Of Renal Hemodynamics in Awake and Isoflurane-Anesthetized Cats with Pulsed-Wave Doppler and Quantitative Renal Scintigraphy

*Veterinary Radiology & Ultrasound*, 39(5), 451-458

Morishita, K., Hiramot, A., Michishita, A., Takagi, S., Hoshino, Y., Itami, T., Yee, Lim, S.Y., Osuga, T., Nakamura, S., dvm, Ochiai, K., Nakamura, K., Ohta, H., Yamasaki, M., Takiguchi, M. (2016)

Assessment of contrast-enhanced ultrasonography of the hepatic vein for detection of hemodynamic changes associated with experimentally induced portal

*Am J Vet Res*, 78, 465–471

Nagumo, T., Ishigaki, K., Yoshida, O., Iizuka, K., Tamura, K., Sakurai, N., Terai, K., Seki, M., Edamura, K., Asan, K. (2020)

Utility of contrast-enhancement ultrasound in differential diagnosis of adrenal tumors in dog

*J Vet Med Sci*, 20-0427

Nakamura, K., Sasaki, N., Murakami, M., Bandula Kumara, W. R., Ohta, H., Yamasaki, M., Takagi, S., Osaki, T., Takiguchi, M. (2010)

Contrast-Enhanced Ultrasonography for Characterization of Focal Splenic Lesions in Dogs

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 24, 1290–1297

---

Nakamura, K., Sasaki, N., Yoshikawa, M., Ohta, H., Hwang, S.J., Mimura, T., Yamasaki, M., Takiguchi, M. (2009).

Quantitative Contrast-Enhanced Ultrasonography Of Canine Spleen.

*Veterinary Radiology&Ultrasound*, 50(1), 104-108

Nangaku, M. (2006).

Chronic Hypoxia and Tubulointerstitial Injury: A Final Common Pathway to End-Stage Renal Failure.

*Journal of the American Society of Nephrology* 17, 17-25

Nath, K. (1998)

The tubulointerstitium in progressive renal disease

*Kidney International*, 54, 992- 994

Nestola, M., De Matthaeis, N., Ferraro, P.M., Fuso, P., Costanzi, S., Zannoni, G.F., Pizzolante, F., Vasquez Quadra, S., Gambaro, G., Rapaccini, G.L. (2018)

Contrast-enhanced ultrasonography in chronic glomerulonephritides: correlation with histological parameters of disease activity

*J Ultrasound*, 21(2), 81–87.

Nicolau, C., Bunesch, L., Peri, L., Salvador, R., Corral, J., Mallofre, C., Sebastia, C. (2011)

Accuracy of contrast-enhancedultrasound in the detection of bladdercancer

*The British Journal of Radiology*, 94, 1091–1099

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 OfVeterinaryMedical Science*,79(9),1585-1590

---

Nisa, K., Lim, S. Y., Shinohara, M., Osuga, T., Yokoyama, N., Tamura, M., Nagata, N., Sasaoka, K., Dermlim, A., Leela-  
Arporn, R., Morita, T., Sasaki, N., Morishita, K., Nakamura, K., Ohta, H., Takiguchi, M. (2019)  
Evaluation of duodenal perfusion by contrast-enhanced ultrasonography in dogs with  
chronic inflammatory enteropathy and intestinal lymphoma  
*J Vet Intern Med.*, 1–10

Nyland, T.G.; Widmer, W.R.; Mattoon, J.S., Mattoon, J., Nyland, T. (2015)  
Urinary Tract. In *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 3rd ed  
Eds.; Elsevier Saunders: St. Louis, MO, USA, pp. 557–607

Nyman, H., Kristensen, A., Kjelgaard-Hansen, M., & Mcevoy, F. (2005)  
Contrast-Enhanced Ultrasonography in Normal Canine Liver. Evaluation Of Imaging  
And Safety Parameters  
*Veterinary Radiology & Ultrasound*, 46(3), 243-250

O'Brien, R., Iani, M., Matheson, J., Delaney, F., & Young, K. (2004).  
Contrast Harmonic Ultrasound of Spontaneous Liver Nodules In 32 Dogs  
*Veterinary Radiology & Ultrasound*, 45(6), 547-553

Oh, T., Lee, Y., Seo, I. (2014)  
Diagnostic Efficacy of Contrast-Enhanced Ultrasound for Small Renal Masses  
*Korean Journal of Urology*, 55(9), 587-92

Ohlerth, S., & O'Brien, R. (2007)  
Contrast ultrasound: General principles and veterinary clinical applications  
*The Veterinary Journal*, 174, 501-512

Osborne, C.A., Stevens, J.B., Lulich, J.P., Ulrich, L.K., Bird, K.A., Koehler, L.A.,  
Swanson, L.L. (1999)  
Valutazione clinica dell'analisi delle urine in NEFROLOGIA E UROLOGIA DEL  
CANE E DEL GATTO  
Osborne, C.A., Finco, D.R.  
pp. 150-158, *UTET: Torino, Italia*

---

Oteo, J.A.; Portillo, A.; Santibáñez, S.; Blanco, J.R.; Pérez-Martínez, L.; Ibarra, V. (2006)

Cluster of cases of human *Rickettsia felis* infection from Southern Europe (Spain) diagnosed by PCR

*J. Clin. Microbiol.*, 44, 2669–22671

Paepe, D., Daminet, S. (2013)

Feline CKD: Diagnosis, staging and screening – what is recommended?

*Journal of Feline Medicine and Surgery*, 15(1), 15-27

Paltrinieri, S., Solano-Gallego, L., Fondati, A. (2010)

Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs

*Journal of the American Veterinary Medical Association* 236, 1184-1191

Penninck, D., & D'Anjou, M. (2015)

Atlas of Small Animal Ultrasonography (Second ed.).

*John Wiley & Sons.*

Pennisi, M.G. (2015)

Leishmaniosis of companion animals in Europe: An update

*Vet Parasitol*, 208, 35–47

Perondi, F., Ilaria Lippi, I., Marchetti, V., Bruno, B., Borrelli, A., Citi, S. (2020)

How Ultrasound Can Be Useful for Staging Chronic Kidney Disease in Dogs: Ultrasound Findings in 855 Cases

*Vet Sci*, 7, 147

Piaton, E.; Fabre, M.; Goubin-Versini, I.; Bretz-Grenier, M.F.; Courtade-Saïdi, M.; Vincent, S.; Belleannée, G.; Thivolet, F.; Boutonnat, J., Debaque, H., Cochand-Priollet, B. (2016)

Guidelines for May-Grünwald-Giemsastaining in haematology and non- gynaecological cytopathology: Recommendations of the French Society of Clinical Cytology (SFCC)

and of the French Association for Quality Assurance in Anatomic and Cytologic Pathology (AFAQAP)

*Cytopathology*, 27, 359–368

Piccolo, C. L., Trinci, M., Pinto, A., Brunese, L., & Miele, V. (2018)

Role of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in the diagnosis and management of traumatic splenic injuries

*Journal of Ultrasound*, 21(4), 315–327

Piech T.L., Wycislo, K.L. (2019)

Importance of Urinalysis

*VetClin Small Anim*, 49, 233–245

Piscaglia, F., & Bolondi, L. (2006)

The safety of Sonovue in abdominal applications: retrospective analysis of 23188 investigations.

*Ultrasound in Medicine and Biology*, 32, 1369–1375

Piscaglia, F., Nolsøe, C., Dietrich, C., Cosgrove, D., Gilja, O., Bachmann Nielsen, M., Albrecht, T., Barozzi, L., Bertolotto, M., Catalano, O., Claudon, M., Clevert, D.A., Correas, J. M., D’Onofrio, M., Drudi, F. M., Eyding, J., Giovannini, M., Hocke, M., Ignee, A., Jung, E.M., Klausner, A.S., Lassau, N., Leen, E., Mathis, G., Saftoiu, A., Seidel, G., Sidhu, P.S., ter Haar, G., Timmerman, D., Weskott H.P. (2012).

The EFSUMB Guidelines and Recommendations on the Clinical Practice of Contrast Enhanced Ultrasound (CEUS): Update 2011 on non-hepatic applications

*Ultraschall in der Medizin*, 33, 33–59

Pocar, P., Scarpa, P., Berrini, A., Cagnardi, P., Rizzi, R., Borromeo, V. (2019)

Diagnostic potential of simplified methods for measuring glomerular filtration rate to detect chronic kidney disease in dogs

*J Vet Intern Med*, 33, 2105–2116

Polisca, A., Zelli, R., Troisi, A., Orlandi, R., Brecchia, G., & Boiti, C. (2013)

---

Power and pulsed Doppler evaluation of ovarian hemodynamic changes during diestrus in pregnant and non pregnant bitches

*Theriogenology*, 79, 219–224

Pollard, R., Watson, K., Hu, X., Ingham, E., & Ferrara, K. (2017)

Feasibility of quantitative contrast ultrasound imaging of bladder tumors in dogs

*Canadian Veterinary Journal*, 58, 70-72

Polzin, D.J., Osborne, C.A., Osborne, C.A., Finco, D.R. (1999)

Fisiopatologia dell'Insufficienza renale e dell'uremia. In NEFROLOGIA E UROLOGIA DEL CANE E DEL GATTO

*UTET: Torino, Italia*, pp. 342-370

Polzin, D.J., Osborne, C.A., Jacob, F., Rossi, S., Ettinger, S.J., Feldman E.C. (2002)

Insufficienza renale cronica, in TRATTATO DI MEDICINA VETERINARIA MALATTIE DEL CANE EDEL GATTO

*Antonio Delfino Editore: Roma, Italia, Vol II*, pp. 1634-1644

Polzin, D.J. (2011)

Chronic kidney disease, in Nephrology and urology of small animals.

Bartges, J., Polzin, D.J.

*Ames (IA): Wiley-Blackwell*, pp. 433-71

Qiao, J., Yu, J., Yu, Z., Li, N., Song, C., & Li, M. (2015)

Contrast-Enhanced Ultrasonography in Differential Diagnosis of Benign and Malignant Ovarian Tumors

*Plos One*, 10(3), e0118872

Quaia, E. (2005)

Contrast Media in ultrasonography. Basic Principles and Clinical Applications

*Springer*

---



Quartuccio, M., Liotta, L., Cristarella, S., Lanteri, G., Ieni, A., D'Arrigo, T., & De Majo, M. (2020) Contrast-Enhanced Ultrasound in Cystic Endometrial Hyperplasia–Pyometra Complex in the Bitch: A Preliminary Study

*Animals, 10(8), 1368*

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(1), 58-64*

Recaldini, C., Carrafiello, G., Bertolotti, E., Angeretti, M., & Fugazzola, C. (2008) Contrast-Enhanced Ultrasonographic Findings In Pancreatic Tumors.

*International Journal of Medical Science, 5, 203-208.*

Rennke, H.G., Denker, B.M., Rose, B.D. (2007)

Renalpathophysiology: the essentials.

*Seconda edizione. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins*

Restitutti, F., Laitinen, M., Raekallio, M., Vainionp, M., O'Brien, R., Kuusela, E., Vainio, O.M (2013)

Effect of K-467 on organ blood flow parameters detected by contrast-enhanced ultrasound in dogs treated with dexmedetomidine

*Veterinary Anaesthesia analgesia, 40(6), 48-56*

Rick, T., Kleiter, M., Schwendenwein, I., Ludewig, E., Reifinger, M., Hittmair, K. M. (2018)

Contrast-enhanced ultrasonography characteristics of intrathoracic mass lesions in 36 dogs and 24 cats

*Vet Radiol Ultrasound., 1–9*

Rossi, F., Fina, C., Stock, E., Vanderperren, K., Duchateau, L., & Saunders, J. (2016)

Effect of sedation on contrast-enhanced ultrasonography of the spleen in healthy dogs

*Veterinary Radiology and Ultrasound, 57(3), 276-81*

---

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

Roura, X., Cortadellas, O., DayM.J., Benali, S.L., Canine  
LeishmaniosisWorkingGroupa and Zatelli, A. (2020)  
Canine leishmaniosis and kidney disease: Q&A for an overall management in clinical  
practice  
*Journal of Small Animal Practice*, 1–19

Roura, X.; Cortadellas, O.; Day, M.J.; Benali, S.L., Zatelli, A. (2021)  
Canine leishmaniosis and kidney disease: Q&A for an overall management in clinical  
practice  
*J Small AnimPract*, 62, 1–19

Salavati, M., Pèrez-Accino, J., Tan, Y.L., Liuti, T., Smith, S., Morrison, L., Salavati  
Schmitz, S. (2021)  
Correlation of minimally invasive imaging techniques to assess intestinal mucosal  
perfusion with established markers of chronic inflammatory enteropathy  
*J VetInternMed*, 35(1), 162-171

Salwei, R., O'Brien, R., Matheson, J., (2005)  
Characterization of lymphomatous lymphnodes in dogs using contrast harmonicand  
Power Doppler ultrasound  
*VetRadiolUltrasound*, 46(5), 411-416.

Sailer, G.S., Tharall D.E. (2013)  
The kidney and ureters. In: textbook of veterinary diagnostic radiology 6 th ed  
*St. Louis (MO): Elsevier Saunders*, pp. 705-723

Seiler, G. S., Brown, J. C., Reetz, J. A., Taeymans, O., Bucknoff, M., Rossi, F.,  
Gaschen, L. (2013)  
Safety of contrast-enhanced ultrasonography in dogs and cats: 488 cases (2002–2011)

---

*Journal of the American Veterinary Medical Association, 242(9), 1255–1259*

Schneider, A., Goodwin, M., Schelleman, A., Michael Bailey, M., Johnson, L., & Bellomo, R. (2014).

Contrast-enhanced ultrasonography to evaluate changes in renal cortical microcirculation induced by noradrenaline: a pilot study

*Critical Care, 18(6), 653*

Schneider, S.M., Cianciolo, R.E., Nabity, M.B., Clubb, F.J. Jr, Brown, C.A., Lees, G.E. (2013)

Prevalence of immune-complex glomerulonephritides in dogs biopsied for suspected glomerular disease: 501 cases (2007-2012)

*Journal of Veterinary Internal Medicine, 27(1), S67-75*

Schwedhelm, E., Böger, R. H. (2011)

The role of asymmetric and symmetric dimethylarginines in renal disease

*Nature Reviews Nephrology, 7(5), 275–285*

Schwarze, V., Rübenthaler, J., Marschner, C., Fabritius, M.P., Rueckel, J., Fink, N., Pühr-Westerheide, D., Gresser, E., Froelich, M.F., Schnitzer, M.L., Hokamp, N.G., Afat, S., Staehler, M., Geyer, T., Clevert, D. (2020)

Advanced Fusion Imaging and Contrast-Enhanced Imaging (CT/MRI–CEUS)

*OncologyCancers, 12, 28-21*

Sconfienza, L., Perrone, N., Delnevo, A., Lacelli, F., Murolo, C., Gandolfo, N., Serafini, G. (2010)

Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasonography in the characterization of ovarian tumors

*Journal of Ultrasound, 13, 9-15*

Shelly, L., Vaden, J.E. (2016)

Management of Proteinuria in Dogs and Cats with Chronic Kidney Disease

*VetClin Small Anim, 46, 1115–1130*

---

Si, Q., Qian, X., Wang, F., & al, e. (2013)

Real-Time Grey Scale Contrast-Enhanced Ultrasonography in Diagnosis of Gallbladder Cancer

*Ultrasound in Medicine and Biology*, 39, 86-91

Siarkou, V.I., Mylonakis, M.E.; Bourtzi-Hatzopoulou, E.; Koutinas, A.F. (2007)

Sequence and phylogenetic analysis of the 16S rRNA gene of Ehrlichia canis strains in dogs with clinical monocytic ehrlichiosis

*Vet. Microbiol*, 125, 304–312

Simeoni, F., Terragni, R., Rubini, G., Tamburro, R., Del Signore, F., Falerno, I., Aste, G., Russo, M., Mastromatteo, G., Vignoli, M. (2020)

B-Mode and Contrast-Enhanced Ultrasonography Features of Gastric Inflammatory and Neoplastic Disease in Cats

*Animals (Basel)*, 10(8), 1444

Simeoni, F., Del Signore, F., Aste, G., Bargellini, P., Rubini, G., Terragni, R., Tamburro, R., Falerno, I., de Pasquale, F., Russo, M., Vignoli, M. (2021)

B-Mode and Contrast Enhanced Ultrasonography Features of Gastric Inflammatory and Neoplastic Diseases in Dogs

*Animals (Basel)*;11(3),670

Solano-Gallego, L.; Koutinas, A.; Miró, G.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. (2009)

Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis

*Vet. Parasitol*;165, 1–18

Solano-Gallego, L.; Miró, G.; Koutinas, A.; Cardoso, L.; Pennisi, M.G.; Ferrer, L.; Bourdeau, P.; Oliva, G.; Baneth, G. (2011)

Leish Vet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis

*Parasit Vectors*, 4, 86

Spârchez, Z., & Radu, P. (2012)

---

Role of CEUS in the diagnosis of gallbladder disease.

*Medical Ultrasonography*, 14(4), 326-330

Spada, S., England, G.C.W., Vignoli, M., Carluccio, A., Russo, M. (2021)

Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging of Prostate Gland in Neutered Dogs

*Animals (Basel)*, 11(2), 559

Sparkes, A.H., Caney, S., Chalhoub, S., Elliott, J., Finch, N., Gajanayake, I., Langston, C., Lefebvre, H.P., White, J., Quimby, J. (2016)

ISFM Consensus Guidelines on the Diagnosis and Management of Feline Chronic Kidney Disease

*J Feline MedSurg*, 18(3):219-39

Stock, E., Vanderperren, K., Van der Vekens, E., Hendrik Haers, H., Duchateau, L., Polis, I., Hesta, M., Saunders, J.H. (2014)

The effect of anesthesia with propofol and sedation with butorphanol on quantitative contrast enhanced ultrasonography of the healthy feline kidney

*The Veterinary Journal*, 637–639

Stock, E., Vanderperren, K., Bosmans, T., Dobbeleir, A., Duchateau, L., Hesta, M., Lybaert, L., Peremans, K., Vandermeulen, E., Saunders, J. (2016)

Evaluation of Feline Renal Perfusion with Contrast-Enhanced Ultrasonography and Scintigraphy

*Pols One*, (11)10, e0164488

Stock, E., Paepe, D., Daminet, S., Vandermeulen, E., Duchateau, L., Saunders, J. H., & Vanderperren, K. (2017)

Contrast-Enhanced Ultrasound Examination for the Assessment of Renal Perfusion in Cats with Chronic Kidney Disease

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), 260–266

Stock, E., Duchateau, L., Saunders, J. H., Volckaert, V., Polis, I., & Vanderperren, K. (2018)

Repeatability of Contrast-Enhanced Ultrasonography of the Kidneys in Healthy Cats

---

*Ultrasound in Medicine & Biology*, 44(2), 426–433

Syme, H.M., Markwell, P.J., Pfeiffer, D. (2006)

Survival of cats with naturally occurring chronic renal failure is related to severity of proteinuria

*Journal of Veterinary Internal Medicine*, 29 (3), 528-535

Taeymans, O., & Penninck, D. (2011)

Contrast Enhanced Sonographic Assessment Of Feeding Vessels as A Discriminator Between Malignant Vs. Benign Focal Splenic Lesions

*Veterinary Radiology & Ultrasound*, 52(4), 457-461

Tamura, M., Ohta, H., Nisa K., Osuga, T., Sasaki, N., Morishita, K., Takiguchi, M. (2018)

Contrast-enhanced ultrasonography is a feasible technique for quantifying hepatic microvascular perfusion in dogs with extrahepatic congenital portosystemic shunts

*Vet Radiol Ultrasound*, 1–9.

Tang, M. X., Mulvana, H., Gauthie, T., Lim, A. K., Cosgrove, D. O., Eckersley, R. J., Stride, E. (2011).

Quantitative contrast-enhanced ultrasound imaging: a review of sources of variability

*Interface Focus*, (1), 520-539

Tang, S., Wang, Y., & Wang, Y. (2013)

Contrast-enhanced ultrasonography to diagnose gallbladder perforation

*American Journal of Emergency Medicine*, 31, 1240-1243

Tian, W., Lu, J., Jiao, D., Cong, Z. (2018)

An evaluation of the clinical diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound combined with contrast-enhanced computed tomography in space-occupying lesions of the kidney

*OncoTargets and Therapy*, 11, 5513

To, H.; Kako, N.; Zhang, G.Q.; Otsuka, H.; Ogawa, M.; Ochiai, O.; Nguyen, S.V.; Yamaguchi, T.; Fukushi, H.; Nagaoka, N. (1996)

Q fever pneumonia in children in Japan

---

*J. Clin. Microbiol*; 34, 647–651

Tyson, R., Daniel, G.B. (2014)

Renal Scintigraphy in Veterinary Medicine

*Sem nucl med*,08,005

Tsuji, S., Sofuni, A., Moriyasu, F., Itokawa, F., Ishii, K., Kurihara, T., Tsuchiya, T., Ikeuchi, N., Umeda, J., Tanaka, R., Itoi, T. (2012)

Contrast-enhanced ultrasonography in the diagnosis of gallbladder disease.

*Hepatogastroenterology*, 59, 336-340

Tsuruoka, K., Yasuda, T., Koitabashi, K., Yazawa, M., Shimazaki, M., Sakurada, T., Shirai, S., Shibagaki, Y., Kimura, K., Tsujimoto, F. (2010)

Evaluation of renal microcirculation by contrast-enhanced ultrasound with Sonazoid as a contrast agent

*International Heart Journal*, 51(3), 176-82

Trillaud, H., Bruel, J., Valette, P., Vilgrain, V., Schmutz, G., Oyen, R., Jakubowski, W., Danes, J., Valek, V., Greis C. (2009)

Characterization of focalliverlesions with SonoVue®- enhanced sonography: International multicenter-study in comparison to CT and MRI

*World Journal of Gastroenterology*, 15(30), 3748-3756

Trinci, M., Piccolo, C. L., Ferrari, R., Galluzzo, M., Ianniello, S., & Miele, V. (2019)

Contrast-enhanced ultrasound (CEUS) in pediatric blunt abdominal trauma

*Journal of Ultrasound*,22(1),27-40

Trinci, M., Cirimele, V., Ferrari, R., Ianniello, S., Galluzzo, M., & Miele, V. (2020)

Diagnostic value of contrast-enhanced ultrasound (CEUS) and comparison with color Doppler ultrasound and magnetic resonance in a case of scrotal trauma

*Journal of Ultrasound*,23(2),189-194

Tzianabos, T.; Anderson, B.E.; McDade, J.E. (1989)

---

Detection of *Rickettsia rickettsii* DNA in clinical specimens by using polymerase chain reaction technology. *J. Clin. Microbiol*, 27, 2866–2868

Waller, K., O'Brien, R., & Zagzebski, J. (2007)

Quantitative Contrast Ultrasound Analysis of Renal Perfusion in Normal Dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, 48(4), 373-377

Wang, W., Fei, Y., & Wang, F. (2016)

Meta-analysis of contrast-enhanced ultrasonography for the detection of gallbladder carcinoma  
*Medical Ultrasonography*, 18(3), 281-287

Wang, J., Lv, F., Fei, X., Cui, Q., Wang, L., Gao, X., Yuan, Z., Lin, Q., Lv, Y., Liu, A. (2011)

Study on the Characteristics of Contrast-Enhanced Ultrasound and Its Utility in Assessing the Microvessel Density in Ovarian Tumors or Tumor-Like Lesions  
*International Journal of Biological Sciences*, 7, 600-606

Wang, X., Wang, S., Pang, Y.P., Jiang, T., Yu, C., Li, Y., Shi, B. (2020)

Contrast -Enhanced Ultrasound Assessment of Renal Parenchymal Perfusion in Patients with Atherosclerotic Renal Artery Stenosis to Predict Renal Function Improvement After Revascularization  
*Int J GenMed*, 13, 1713-1721

White, J.D., Norris, J.M., Baral, R.M., Malik, R. (2006)

Naturally occurring chronic renal disease in Australian cats: a prospective study of 184 cases  
*Australian Veterinary Journal*, 84, 188- 194

Wilson, T. M., Magalhaes, L. F., Souza, R. R., et al. (2017)

Renal lesions in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*  
*Bioscience Journal*, 33, 990-995

---



Wouters, O.J., O'Donoghue, D.J., Ritchie, J., Kanavos, P.G., Narva, A.S. (2015)  
Malattia renale cronica precoce: Diagnosi, gestione e modelli di cura  
*Nat Rev Nephrol*, 11, 491-502

Vaden, S.L. (2011)  
Glomerular disease  
*Topics in Companion Animal Medicine* 26: 128-134

Vitale, F.; Reale, S.; Vitale, M.; Petrotta, E.; Torina, A.; Caracappa, S. (2004)  
TaqMan-based detection of *Leishmania infantum* DNA using canine samples  
*Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 1026, 139–143

Volta, A., Manfredi, S., Vignoli, M., Russo, M., England, G., Rossi, F., Bigliardi, E., Di Ianni, F., Parmigiani, E., Bresciani, C., Gnudi, G. (2014). Use of Contrast-Enhanced Ultrasonography in Chronic Pathologic Canine Testes  
*Reproduction in Domestic Animals*, 49, 202-209

Volterrani, D., Erba, P.A., Mariano, G (2010)  
Fondamenti di medicina nucleare. Tecniche e applicazioni  
*Springer Verlag*, 2010

Von Hendy-Willson, V.E., M. Pressler, B.M. (2011)  
An overview of glomerular filtration rate testing in dogs and cats  
*Vet J*, 188(2): 156–165

Xue, L., Lu, Q., Huang, B., Ma, J., Yan, L., Wen, J., et al. (2014)  
Contrast-enhanced ultrasonography for evaluation of cystic renal mass: in comparison to contrast-enhanced CT and conventional ultrasound  
*Abdominal Imaging*, 39, 1274–1283

Yoon, S., Alfajaro, M. M., Cho, K.-O., Choi, U.-S., Je, H., Jung, J. Choi, J. (2020)  
Perfusion change in benign prostatic hyperplasia before and after castration in a canine model: Contrast enhanced ultrasonography and CT perfusion study

---

*Theriogenology*, 156, 97-106

Zatelli, A., Borgarelli, M., Santilli, R., Bonfanti, U., Nigrisoli, E., Zanatta, R. Guarraci, A. (2003)

Glomerular lesions in dogs infected with *Leishmania* organisms  
*American Journal of Veterinary Research*, 64(5), 558–561

Zatelli, A., Bogoni, P., Aresu, L. (2014)

Biopsia renale. In: Malattie renali del cane e del gatto. Manuale di diagnosi e terapia.  
*EDRA*. 2014, pp, 78-87

Zhao, C., Jiang, Y., Li, J., Xu, Z., Zhang, Q., Su, N., et al. (2017)

Role of Contrast-enhanced Ultrasound in the Evaluation of Inflammatory Arthritis.  
*Chinese Medical Journal (Engl)*, 130(14), 1722-1730

Zheng, X., Wei, W., Huang, Q., Song, S., Huang, G. (2019)

Automated Region of Interest Detection Method in Scintigraphic Glomerular Filtration Rate Estimation  
*Journal of Biomedical and Health Informatics*, 23(2), 787-794

Zhou, X., Chen, L., Feng, C., Li, B., Tang, J., Liu, A., Lv, F., Li, T. (2013).

Establishing an animal model of intracerebral hemorrhage under the guidance of ultrasound.  
*Ultrasound in Medicine and Biology*, 39(11), 2116-2122

Ziegler, L., O'Brien, R., Waller, K., & Zagzebski, J. (2003).

Quantitative Contrast Harmonic Ultrasound Imaging of Normal Canine Liver  
*Veterinary Radiology & Ultrasound*, 44(4), 451-454

---

