



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Agronomia, Animali, Risorse naturali e Ambientali

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

TESI DI LAUREA MAGISTRALE

***STUDIO DELLA TESSITURA ECOGENICA TESTICOLARE
NEGLI ALPACA (VICUGNA PACOS): EFFETTO DELLA
DEGENERAZIONE CISTICA E DELLA TEMPERATURA
AMBIENTALE***

Docente di riferimento:

Prof. Calogero Stelletta

Studente

Sara Bettella

Matricola n. 2027860

ANNO ACCADEMICO 2021-2022

INDICE

RIASSUNTO.....	6
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUZIONE.....	9
1.1. Caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'apparato riproduttivo.....	9
1.1.1. Scroto e testicoli.....	9
1.1.2. Epididimo e dotto deferente	10
1.1.3. Prepuzio e pene.....	11
1.1.4. Pubertà e maturazione sessuale.....	13
1.1.5. Spermatogenesi e produzione di sperma	13
1.1.6. Caratteristiche del seme.....	14
1.2. Breeding Soundness Evaluation.....	16
1.2.1. Anamnesi e valutazione fisica dell'animale.....	16
1.2.2. Valutazione dei genitali esterni.....	17
1.2.3. Valutazione dei genitali interni.....	18
1.2.4. Valutazione delle concentrazioni di testosterone.....	18
1.2.5. Valutazione del seme.....	19
1.3. Disturbi riproduttivi nel maschio di alpaca ed anomalie dei genitali esterni.....	22
1.3.1. Anomalie del pene e del prepuzio.....	22
1.3.2. Anomalie dell'epididimo.....	24
1.3.3. Anomalie dello scroto e dei testicoli.....	25
1.4. L'ecografia ed i suoi principi fondamentali.....	29

1.4.1. Interazione tra onde ultrasonore e la materia.....	30
1.4.2. Grandezze caratteristiche dell'onda ultrasonora.....	31
1.4.3. Interfaccia ed impedenza acustica.....	34
1.4.4. Diverse modalità di acquisizione del segnale ultrasonoro.....	37
1.4.5. Apparecchiature necessarie per la tecnica ad ultrasuoni.....	39
1.4.6. Terminologia ecografica e interpretazione delle immagini ecografiche.....	40
1.4.7. Artefatti ecografici.....	44
1.5. Esame ecografico nei maschi di alpaca.....	49
1.6. Termoregolazione testicolare e problemi collegati allo stress da caldo.....	51
2. OBIETTIVO DELLA RICERCA.....	54
3. MATERIALI E METODI.....	55
3.1. Selezione degli individui maschi, raccolta ed analisi delle immagini ecografiche.....	55
3.2. Metodi di utilizzo del programma ImageJ: nozioni base e comandi utili per l'analisi delle immagini ecografiche.....	59
3.2.1. Tipi di immagini.....	59
3.2.2. Barra degli strumenti.....	60
3.2.3. Comandi del menu.....	61
3.2.4. Miglioramento dell'immagine.....	62
3.2.5. Creazione dell'istogramma.....	63

3.2.6. Trascrizione e analisi statistica dei dati ottenuti.....	65
4. RISULTATI.....	66
4.1. Istogrammi legati alla degenerazione cistica testicolare.....	66
4.2. Istogrammi legati alla temperatura ambientale.....	87
5. DISCUSSIONE.....	92
5.1. Effetto della degenerazione cistica sulla tessitura ecogenica testicolare.....	92
5.2. Effetto della temperatura sulla tessitura ecogenica testicolare.....	93
6. CONCLUSIONI.....	96
BIBLIOGRAFIA.....	97

RIASSUNTO

L'alpaca (*Vicugna pacos*) è una specie zootecnica appartenente alla famiglia *Camelidae* che sta assumendo una crescente importanza a livello mondiale dal punto di vista economico.

Le caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'apparato riproduttivo maschile di questi esemplari possono influenzare la corretta valutazione andrologica (BSE, il cui acronimo sta ad indicare "Breeding Soundness Evaluation"), ossia la capacità di un soggetto maschio di accoppiarsi e riprodursi.

Questo perché talvolta la sola valutazione fisica non consente di prendere in considerazione ed escludere la presenza di condizioni patologiche in grado di influenzare direttamente la fertilità e la capacità di produzione spermatica, come per esempio la presenza di cisti dell'epididimo, degenerazioni cistiche del mediastino e la presenza di ectasia tubulare della rete testis che porta alla dilatazione anomala dei tubuli mediastinici testicolari.

Lo scopo di questo studio è quello di analizzare le strutture anatomiche del tratto riproduttivo di alcuni maschi di alpaca mediante l'effettuazione di ecografie, in modo tale da evidenziare l'eventuale presenza di anomalie patologiche e comprendere al meglio l'influenza che queste giocano sulla capacità riproduttiva dell'animale.

Per questo studio sono stati presi in considerazione 8 alpaca maschi di razza Huacaya ai quali era stata effettuata preventivamente una valutazione andrologica totale, completa di valutazione della quantità e della qualità del seme.

Questi soggetti sono stati poi sottoposti ad un esame ultrasonografico e le immagini ecografiche ottenute sono state analizzate e messe a confronto mediante l'utilizzo del software ImageJ, con lo scopo finale di studiare la tessitura ecogenica testicolare in condizioni diverse (ovvero in assenza di anomalie e in presenza di patologie testicolari, con temperature ambientali elevate o inferiori).

Nonostante lo studio in questione sia stata effettuato su esemplari di alpaca, tale protocollo potrebbe trovare un'applicazione in tutte le altre specie d'interesse zootecnico e potrebbe essere utilizzato all'interno della valutazione della solidità riproduttiva di soggetti maschi di elevato valore riproduttivo.

ABSTRACT

The alpaca (*Vicugna pacos*) is a livestock species belonging to the *Camelidae* family which is becoming increasingly important worldwide from an economic point of view.

The anatomical and physiological characteristics of the male reproductive system of these specimens can influence the correct andrological evaluation (BSE, whose acronym stands for "Breeding Soundness Evaluation"), that is the ability of a male subject to mate and reproduce.

This is because sometimes the physical evaluation alone does not allow to take into consideration and exclude the presence of pathological conditions capable of directly influencing fertility and sperm production capacity, such as the presence of epididymal cysts, cystic degenerations of the mediastinum and the presence of tubular ectasia of the rete testis which leads to abnormal dilation of the testicular mediastinal tubules.

The purpose of this study is to analyze the anatomical structures of the reproductive tract of some male alpacas by performing ultrasound, in order to highlight the possible presence of pathological anomalies and better understand the influence that these play on the reproductive capacity of the animal.

For this study, 8 male Huacaya alpacas were taken into consideration, who had been previously carried out a total andrological evaluation, complete with evaluation of the quantity and quality of the semen.

These subjects were then subjected to an ultrasound examination and the ultrasound images obtained were analyzed and compared using the ImageJ software, with the final aim of studying the testicular echogenic texture in different conditions (i.e. in the absence of anomalies and in the presence of testicular pathologies, with high or lower ambient temperatures).

Although the study in question was carried out on alpaca specimens, this protocol could find an application in all other species of zootechnical interest and could be used in the evaluation of the reproductive solidity of male subjects of high reproductive value.

1. INTRODUZIONE

L'alpaca (*Vicugna pacos*) è un mammifero appartenente alla famiglia dei Camelidi Sudamericani, insieme al lama (*Lama glama*), al guanaco (*L. guanacoe*) e alla vigogna (*V. vicugna*); utilizzato prevalentemente per la produzione di una fibra pregiata e in minore misura per la produzione di carne.

Visto il crescente interesse per questa specie di animali nei paesi occidentali, negli ultimi anni sono stati effettuati diversi studi sulle caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'apparato riproduttivo degli alpaca.

1.1. Caratteristiche anatomiche e fisiologiche dell'apparato riproduttivo

L'apparato riproduttivo degli alpaca, e dei camelidi in generale, presenta diverse caratteristiche anatomiche e fisiologiche specifiche che consentono di comprendere al meglio, analizzare approfonditamente ed esaminare in modo specifico le anomalie presenti nel tratto riproduttivo che influiscono sulla fertilità dei maschi di alpaca.

Inoltre vengono prese in considerazione anche le caratteristiche del seme ed i fattori che possono influenzarne la qualità.

1.1.1. Scroto e testicoli

Nell'alpaca adulto lo scroto non è pendulo, mentre i testicoli presentano una forma ellittica, sono relativamente piccoli rispetto a quelli degli altri animali domestici; inoltre normalmente presentano una consistenza soda, hanno la stessa dimensione e dovrebbero muoversi liberamente all'interno dello scroto (Tibary e Vaughan, 2006; Tibary et al., 2007).

La dimensione dei testicoli è un parametro estremamente improntante nella valutazione della capacità riproduttiva dei maschi di alpaca ed è collegata direttamente alla produzione giornaliera di sperma.

La lunghezza e la larghezza dei testicoli sono rispettivamente di 4-5 cm e 2,5-3 cm ed il peso medio di un testicolo è di circa 17 grammi (con un intervallo compreso tra 13 e 28 gr), anche se presentano variazioni di dimensione importanti in correlazione con l'età e maturano in modo relativamente lento (Tabella 1).

Età (mesi)/ Stalloni (fonte)	Alpaca (<i>n</i> = 158)	
	Dimensione (cm)	Peso (g)
6	1.0 × 0.4	0.6
12	2.3 × 1.5	2.9
18	2.8 × 1.9	6.6
24	3.3 × 2.2	9.9
30	3.6 × 2.3	13.9
36	3.6 × 2.4	13.6
Stalloni (Fowler <i>et al.</i> , 1998)	3.7 × 2.4	17.2
Stalloni (Sumar, 1983)	4.0 (3.2–4.8) × 2.6 (1.9–3.2)	17.7 (13.5–28.0)

Tabella 1: Media delle dimensioni dei testicoli (lunghezza x larghezza) e peso medio dei testicoli negli alpaca in correlazione con l'età dell'animale (tratto da Sumar, 1983; Fowler, 1998; Bravo *et al.*, 2002)

1.1.2. Epididimo e dotto deferente

L'epididimo è composto da tre parti differenti: *caput* (testa), *corpus* (corpo) e *cauda* (coda); piccole, saldamente collegate ai testicoli, facilmente palpabili e distinguibili con il tatto.

Il dotto deferente (*ductus deferens*) nell'alpaca presenta una lunghezza media di circa 40 cm ed è molto sottile, infatti è dotato di un diametro di 2 mm nella frazione iniziale alla giunzione dell'epididimo mentre si allarga fino a 3 mm nella cavità addominale, dove termina in prossimità della vescica (Smith *et al.*, 1994).

1.1.3. Prepuzio e pene

Il prepuzio nell'alpaca è piccolo e si trova nella regione inguinale, infatti è situato ad una distanza di circa 15 cm caudalmente rispetto all'ombelico.

Presenta un'apertura triangolare orientata caudalmente ed è formato da un apparato muscolare ben sviluppato, costituito da muscoli prepuziali craniali, laterali e caudali che consentono il movimento del piccolo orifizio prepuziale (*ostium praeputiale*) cranialmente durante l'erezione e l'accoppiamento; al contrario in assenza di stimolazione sessuale l'orifizio è diretto caudalmente (Tibary and Anouassi, 1997c; Fowler, 1998).

Il pene dei camelidi è fibroelastico ed in assenza di erezione viene trattenuto all'interno della guaina del muscolo retrattore del pene.

La sua lunghezza nell'alpaca varia dai 35 a 45 cm (Smith et al., 1994), mentre il diametro decresce gradualmente partendo dalla radice fino ad arrivare al collo del glande (*collum glandis*) (Fowler, 1998; Tibary and Anouassi, 1997).

Il pene ha una forma cilindrica ed è composto da diverse sezioni: radice del pene, corpo del pene, estremità libera del pene ed infine il glande.

Quest'ultimo è lungo 9-12 cm e all'estremità distale presenta un piccolo processo cartilagineo (di circa 1 cm di diametro) che termina con una curvatura ad uncino (Figura 1) (Bravo and Johnson, 1994); tale curvatura consente di avere una penetrazione degli anelli della cervice, attraverso l'attuazione di movimenti combinati di rotazione e spinta, e permette la deposizione del seme nella zona intrauterina.

Alla nascita il pene è completamente aderente al prepuzio, che aderisce al glande fino ai 2-3 anni di età dell'animale rendendo impossibile l'esteriorizzazione del pene nei giovani maschi.

Solo durante la pubertà, a mano a mano che il maschio matura, queste aderenze scompaiono gradualmente sotto l'influenza del testosterone.

Ad un anno di età solo una piccola percentuale di maschi di alpaca (corrispondente a circa l'8%) ha la completa liberazione delle aderenze tra prepuzio e pene ed è in grado di copulare; a 2 anni circa il 70% dei maschi presenta una totale assenza di aderenze ed infine raggiunti i 3 anni di età la

totalità dei maschi non presenta aderenze tra pene e prepuzio (Figura 2) (Sumar, 1996; Tibary and Vaughan, 2006).



Figura 1: Glande del pene di un alpaca.
La freccia indica il processo cartilagineo, che si estende oltre l'orifizio uretrale (Tibary e Vaughan, 2006)

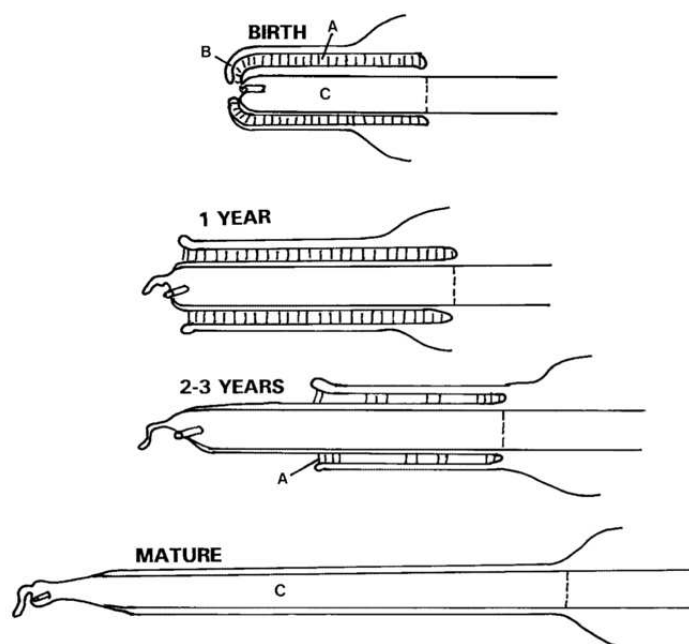


Figura 2: Diagramma delle aderenze prepuziali del camelide. La lettera "A" indica le aderenze prepuziali, la lettera "B" il prepuzio mentre la lettera "C" rappresenta il pene.

1.1.4. Pubertà e maturazione sessuale

L'età a cui l'alpaca raggiunge la pubertà è variabile a seconda dell'animale ed è influenzata da diversi fattori come la genetica, l'alimentazione, i cambiamenti climatici e la stagione di nascita.

Alcuni soggetti possono mostrare comportamenti atti alla riproduzione anche in giovane età (anche ad un'età inferiore all'anno), ma la completa erezione e penetrazione possono avvenire solo quando il pene non presenta alcuna aderenza con il prepuzio ed è completamente libero dalle aderenze prepuziali (Escobar, 1984; Fowler, 1998; Sumar, 1985).

Come già anticipato, il processo di distacco del prepuzio dal pene inizia solitamente all'età di 12-13 mesi e coincide con un aumento della concentrazione plasmatica di testosterone (Bravo and Johnson, 1994).

Più nello specifico gli alpaca raggiungono la maturità sessuale a 5 anni di età circa, età alla quale raggiungono un peso di 62-63 kg ed i testicoli presentano una lunghezza media di 4-5 cm ed una larghezza di 2,5-3 cm (Sumar, 1996).

1.1.5. Spermatogenesi e produzione di sperma

I testicoli hanno due funzioni principali: spermatogenesi e produzione di ormoni (tra cui il testosterone, responsabile dello sviluppo delle caratteristiche sessuali secondarie come una maggiore massa muscolare e l'aumento della libido).

Negli alpaca la produzione di sperma è correlata alla dimensione dei testicoli e la lunghezza media del testicolo può essere utilizzata per stimare la probabilità di produzione di sperma nei maschi (Tabella 2) (Galloway, 2000).

La spermatogenesi si verifica durante tutto l'anno in tutti i camelidi, ma nonostante questo presenta una notevole variabilità in base alla stagione, alla posizione geografica (correlata a sua volta a fattori nutrizionali, fattori climatici ed altri fattori ambientali), alla gestione della mandria e alla struttura sociale del gruppo di camelidi (in quanto i maschi di alpaca sono fondamentalmente poligami territoriali) (Novoa, 1970; El Wishy, 1988; McEvoy et al., 1994).

Lunghezza media del testicolo (cm)	Proporzione di maschi (%)	Percentuale di tessuto testicolare che produce spermatidi allungati
<3	100	0
3-4	68	<10
	31	30-60
>4	36	<10
	31	10-60
	31	>60

Tabella 2: Sviluppo della funzione testicolare negli alpaca con testicoli di diverse dimensioni (Galloway, 2000)

1.1.6. Caratteristiche del seme

Le caratteristiche fisiche e biologiche del seme di camelide sudamericano sono variabili a seconda delle condizioni di raccolta (come per esempio il metodo di raccolta del seme, la fertilità e la libido del maschio, la temperatura ambientale). Gli eiaculati di ciascun maschio sono generalmente costituiti da sperma a basso volume e ad alta viscosità, contenente una bassa concentrazione di spermatozoi (Sumar, 1983).

Il volume dell'eiaculato varia da 0,4 a 12,5 ml (Fernandez-Baca e Calderon, 1966; Garnica et al., 1993; Quispe, 1987; Sumar and Leyva, 1981), ma questi valori possono subire delle variazioni e diminuire con l'aumentare della frequenza di utilizzo della vagina artificiale per la raccolta del seme (Bravo et al., 1997a).

Il colore dello sperma è prevalentemente bianco latte (Fernandez-Baca and Calderon, 1966), ma talvolta può avere una colorazione bianco crema (Garnica et al., 1993) o può presentare tracce di sangue (questo si verifica quando lo sperma viene raccolto per aspirazione dalla vagina, a seguito di un leggero trauma al tratto riproduttivo femminile).

La colorazione può essere eterogenea o può presentare del materiale traslucido con alcune aree torbide.

Inoltre il colore dipende dalla concentrazione di spermatozoi: nell'alpaca il volume totale dello sperma è costituito per l'88,5% da plasma seminale mentre gli spermatozoi rappresentano l'11,5% del volume dello sperma, senza differenze significative tra le diverse età (Garnica et al., 1993).

Un'altra caratteristica fisica fondamentale del seme di alpaca è la sua notevole viscosità, collegata prevalentemente alla presenza di mucopolisaccaridi provenienti dalle secrezioni delle ghiandole bulbouretrali o dalla prostata (Garnica et al., 1993).

Tale caratteristica rende difficili le procedure di laboratorio e la miscelazione con estensori (Garnica et al., 1993; Merlian et al., 1986; Tibary and Anouassi, 1997; Tibary and Pugh, 2003; Vaughan et al., 2003), per questo motivo talvolta viene attuata la liquefazione del seme mediante l'esposizione ad enzimi idrolitici e proteolitici (come tripsina e collagenasi) con il rischio però di causare danni agli spermatozoi se la concentrazione utilizzata è troppo elevata o se l'incubazione viene prolungata per un periodo troppo lungo.

Il pH del seme di alpaca è di 7,5 (Bravo et al., 1997a; Kubicek, 1974).

1.2. Breeding Soundness Evaluation

La valutazione della fertilità del maschio (o Breeding Soundness Evaluation, BSE) viene applicata per diverse specie di bestiame ed è uno strumento eccellente di valutazione della capacità di un maschio di accoppiarsi e riprodursi, utile per scartare tutti i soggetti ipofertili o infertili che non soddisfano i criteri richiesti per la fecondazione.

Nei camelidi sudamericani questa procedura di valutazione è ancora in fase di sviluppo, ma nonostante ciò esistono degli studi che dimostrano che la valutazione del seme di alpaca può essere attuata senza troppe elaborazioni e senza l'utilizzo di strumentazioni sofisticate (Bravo, 2007).

Ogni soggetto riproduttore viene gestito individualmente e prima della valutazione si deve procedere con l'identificazione accurata e duratura del soggetto, tramite l'utilizzo di marchi auricolari, collari o microchip.

Più nello specifico in tale valutazione vengono presi in esame i genitali esterni e la loro fisiologia, compresa la valutazione dello sperma e la valutazione delle concentrazioni ematiche di testosterone.

1.2.1. Anamnesi e valutazione fisica dell'animale

La storia dell'animale è un aspetto molto importante da prendere in considerazione durante la valutazione della fertilità del maschio di alpaca, poiché consente di stabilire i criteri di esame ed identificare la presenza di eventuali problematiche.

L'anamnesi, o storia clinica dell'animale, dovrebbe tener conto dei seguenti fattori specifici: l'età dell'animale, l'origine ed il tipo di gestione, la documentazione riproduttiva e l'eventuale presenza di malattie o problemi di salute precedenti. Più specificatamente, l'età è un fattore fondamentale da considerare nel protocollo BSE dato che consente di stabilire se l'animale è sessualmente maturo e fertile (alcune problematiche legate all'ambito sessuale, come l'incapacità di montare, l'incapacità di esteriorizzare il pene oppure una

fertilità inferiore ai normali standard, possono essere correlati all'imaturità sessuale del soggetto in esame) (Tibary, 2003; Tibary and Pugh, 2003).

Un'altra fase di fondamentale importanza durante tale valutazione è l'esame fisico generale dell'animale, che dovrebbe comprendere una valutazione dell'aspetto generale, l'analisi della conformazione e delle condizioni fisiche dell'animale (Fowler, 1998).

1.2.2. Valutazione dei genitali esterni

La valutazione dei genitali esterni prevede l'analisi di prepuzio, pene, testicoli ed epididimo, che devono essere esaminati a fondo mediante palpazione e/o esame ecografico.

I testicoli devono avere una forma ovoidale e devono essere resistenti alla palpazione digitale; inoltre devono muoversi liberamente all'interno dello scroto e devono essere di dimensione uguale (la differenza di lunghezza tra i due testicoli dovrebbe essere inferiore al 15%).

L'asse longitudinale e trasversale dei testicoli possono essere misurati con l'utilizzo di calibri (la dimensione del testicolo è un indicatore molto importante della capacità di produzione dello sperma e della fertilità dell'animale), mentre è possibile analizzare la struttura interna del testicolo mediante un'ecografia che deve essere eseguita con l'animale in posizione eretta o in decubito laterale.

La trama ecografica del testicolo deve essere ipoecogena, con una chiara linea ecogena nel mezzo che indica la presenza del mediastino del testicolo (o corpo di Highmore, ispessimento della tunica albuginea in cui sono situati i segmenti terminali dei tubuli seminiferi).

L'epididimo durante la valutazione esterna può essere palpato per escludere ostruzioni e si possono distinguere nettamente le porzioni della testa, del corpo e della coda; negli alpaca si può notare in modo chiaro che la testa dell'epididimo è più grande della coda, al contrario del toro e dell'ariete in cui la coda è notevolmente più grande della testa.

Il pene deve muoversi liberamente all'interno del prepuzio e deve essere palpato per rilevare dolore, gonfiore o la presenza di essudati e lesioni (in

questo caso un'esame dettagliato di prepuzio e pene richiede il più delle volte la sedazione dell'animale), mentre l'orifizio prepuziale deve essere controllato per assicurarsi che non siano presenti secrezioni, ostruzioni o prolassi.

La cute scrotale e prepuziale deve essere analizzata con attenzione per evidenziare l'eventuale presenza di ispessimenti, edemi, croste, verruche, lacerazioni ed infiammazioni (Tibary e Vaughan, 2005).

1.2.3. Valutazione dei genitali interni

Nella valutazione dell'apparato riproduttore interno si vanno ad analizzare la prostata e le ghiandole bulbouretrali.

La prostata può essere analizzata mediante ecografie ed è descritta come una massa ipoecogena di tessuto collocata cranialmente alla vescica.

Al contrario le ghiandole bulbouretrali possono essere valutate sia digitalmente che mediante ecografia; quest'ultime durante la palpazione devono risultare come due strutture ben definite ed arrotondate, mentre tramite l'ecografia si possono distinguere due strutture rotonde con una conformazione ipoecogena (Bravo e Sumar, 1991; Neely e Bravo, 1998).

1.2.4. Valutazione delle concentrazioni di testosterone

Il testosterone è il principale ormone riproduttivo maschile, con la funzione di stimolare la libido sessuale e sviluppare alcune caratteristiche sessuali secondarie (come lo sviluppo dei genitali esterni).

Tale ormone è presente nelle concentrazioni basali in misura ridotta dalla nascita fino ai 18 mesi di età, successivamente con l'avanzare dell'età si assiste ad un aumento esponenziale delle concentrazioni di testosterone (aumento che coincide con la comparsa della libido sessuale e con la scomparsa dell'attaccamento tra il pene ed il prepuzio) (Tabella 3).

Queste concentrazioni possono però subire delle modifiche a seconda del soggetto in analisi, infatti alcuni maschi sono più precoci ed hanno un aumento

repentino del testosterone e quindi della pulsione sessuale, mentre altri maschi possono presentare un cambiamento più lento delle concentrazioni ematiche di testosterone.

Durante la valutazione BSE è fondamentale raccogliere un campione di sangue del maschio, in modo tale da raccogliere informazioni fondamentali per la determinazione della concentrazione di testosterone correlata all'età ed avere indirettamente informazioni sulla dimensione dei testicoli e sul livello della libido (Bravo et al., 1992)

ALPACA		
Età (mesi)	Dimensione testicolo	Testosterone
6	1.0 × 0.4	67
12	2.3 × 1.5	213
18	2.8 × 1.9	1156
24	3.3 × 2.2	2163
30	3.6 × 2.4	2835
36	3.6 × 2.4	5385
Stalloni	3.7 × 2.5	5247

Tabella 3: Dimensione media dei testicoli e concentrazioni di testosterone negli alpaca suddivise per età (espressa in mesi). La dimensione dei testicoli è misurata in cm (lunghezza x larghezza), mentre la concentrazione di testosterone è misurata in pg/ml (picogrammo per millilitro) (Bravo, 2007)

1.2.5. Valutazione del seme

La valutazione del seme prevede una prima fase di raccolta dello sperma, che può essere effettuata seguendo due procedure principali: il primo metodo di raccolta più pratico e che non richiede una strumentazione elaborata e sofisticata consiste nell'aspirazione dell'eiaculato dall'apparato cervicale esterno della femmina dopo che il maschio ha copulato, mentre il secondo metodo di raccolta del seme consiste nell'utilizzo di una vagina artificiale inserita in un manichino di alpaca in posizione copulatoria (tale metodo è molto

affidabile ma richiede l'addestramento del maschio al manichino) (Guarnica, Achata e Bravo, 1993; Bravo et al., 1997).

Una volta attuata la raccolta del seme è possibile proseguire con la sua valutazione.

L'eiaculato il più delle volte presenta una consistenza gelatinosa con spermatozoi con motilità ridotta (il seme di camelide non presenta una motilità progressiva, in quanto gli spermatozoi si muovono lentamente a causa della presenza di materiale gelificante nel liquido seminale).

In genere la motilità può variare dal 70% all'80% a seconda dell'età dell'animale e a seconda della stagione (Tabella 4), infatti durante il periodo estivo tale valore diminuisce drasticamente fino a raggiungere valori compresi tra lo 0% e il 55% nell'emisfero settentrionale (Figura 3).

Un altro fattore variabile a seconda dell'età dell'animale e della stagione è la proporzione di spermatozoi vivi/morti, difatti durante la primavera, l'autunno e l'inverno la percentuale di spermatozoi vivi può avere un valore compreso tra il 70% e l'85% mentre in estate la percentuale di spermatozoi vivi diminuisce fino a raggiungere un valore tra lo 0% e il 40% (Figura 4).

Oltre alla misurazione della motilità e del numero di spermatozoi vivi/morti, è possibile effettuare un'analisi anche della concentrazione spermatica.

Quest'ultimo fattore rappresenta la caratteristica del seme più variabile, infatti sulla base dell'analisi effettuata su sette maschi adulti la concentrazione spermatica variava da 3,5 a 65 milioni/ml (Bravo, 2007).

Età	Motilità (%)	Sperma vivo (%)
Giovani maschi (20-26 mesi)	74	73.3
Tre anni	72.2	80
Stalloni adulti	68.5	73.5
Stalloni vecchi (>11 anni)	70	70

Tabella 4: Motilità e vitalità dello sperma in diverse età di alpaca maschi (Bravo, 2007)

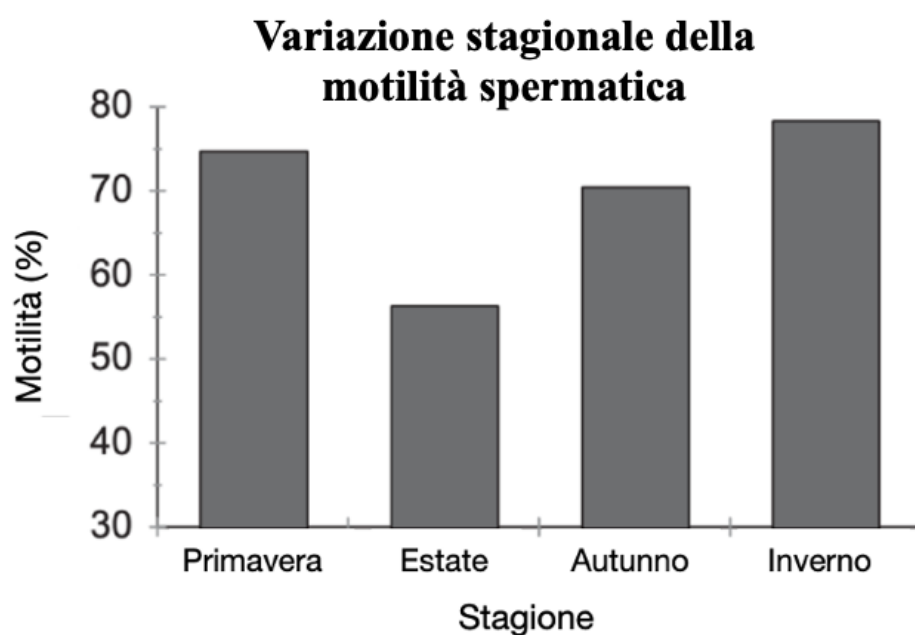


Figura 3: Motilità degli spermatozoi a seconda della stagione negli Stati Uniti (Bravo, 2007)



Figura 4: Percentuale di spermatozoi vivi a seconda della stagione negli Stati Uniti (Bravo, 2007)

1.3. Disturbi riproduttivi nel maschio di alpaca ed anomalie dei genitali esterni

Nonostante gli studi sulle patologie del tratto riproduttivo dei camelidi maschi siano relativamente scarsi, è possibile analizzare alcune anomalie principali che possono portare all'infertilità o all'ipofertilità dell'animale.

Secondo diversi studi l'incidenza di condizioni patologiche negli alpaca maschi adibiti alla riproduzione è di circa il 18,1% (di cui il 10% è riconducibile alla presenza di ipoplasia testicolare, il 5,7% alla presenza di criptorchidismo ed infine il 2,5% è collegato alla presenza di testicoli ectopici).

Tali valori subiscono una variazione nell'analisi dei soggetti al macello dove l'incidenza di anomalie e patologie è del 30,5% (di cui il 10,8% è ipoplasia, il 3% criptorchidismo, l'1,9% è correlato alla presenza di testicoli ectopici ed infine il 14,5% è determinato dalla presenza di cisti) (Sumar, 1983).

1.3.1. Anomalie del pene e del prepuzio

L'insorgenza di anomalie del pene e del prepuzio nei camelidi è generalmente molto rara, questo perché tali frazioni sono ben protette dall'attacco degli agenti esterni grazie alla loro posizione anatomica.

Per effettuare una corretta analisi di queste zone anatomiche esterne il più delle volte è necessaria la sedazione dell'animale, in quanto in questo modo è possibile exteriorizzare il pene ed evidenziare l'eventuale presenza di un prepuzio anormalmente pendulo, oppure la presenza di edemi, lacerazioni, di un prolasso della mucosa prepuziale o di gonfiore prepuziale.

Il gonfiore prepuziale (*preputial swelling*) può avere diverse cause: può essere causato dalla presenza di un'inflammatione locale provocata dal contatto con irritanti chimici o fisici, può essere dovuto alla presenza di infestazioni parassitarie oppure alla rottura dell'uretra (nel caso di rottura dell'uretra è necessario procedere immediatamente con il drenaggio dell'urina accumulata nello spazio sottocutaneo); inoltre il gonfiore prepuziale può essere correlato e può far parte di un grande edema ventrale che si forma negli animali sottoposti

a condizioni di stress da caldo oppure in stato di ipoproteinemia (ossia una condizione fisica collegata direttamente alla diminuzione del contenuto di proteine totali nel sangue, spesso associata ad uno scarso nutrimento dell'animale) (Tibary *et al.*, 2008).

Un'altra anomalia di questa frazione del tratto riproduttivo è la parafimosi, una condizione patologica in cui il camelide non è in grado di retrarre il pene per farlo ritornare in *status quo ante*. L'insorgenza di questa patologia si può osservare negli animali con un accumulo di sporco nell'apertura prepuziale e se non curata tempestivamente potrebbe evolvere in una condizione di cancrena e potrebbe portare a gravi conseguenze per il soggetto affetto da tale problematica.

Altra patologia del tratto riproduttivo maschile è la fimosi, che rappresenta un restringimento del prepuzio che impedisce al camelide di sporgere il pene fuori dalla guaina prepuziale. Nel caso degli alpaca, in cui si ha il distaccamento del prepuzio dal pene nella fase post-puberale, tale problematica può essere dovuta ad un'apertura prepuziale congenitamente piccola oppure può essere associata alla presenza di lesione (come noduli ed accessi) che impediscono l'esteriorizzazione del pene durante la fase di accoppiamento (Tibary *et al.*, 2008).

Infine un'altra anomalia che interessa la sezione del pene e del prepuzio è l'urolitiasi, ossia la produzione e presenza di calcoli (o uroliti) in qualsiasi tratta delle vie urinarie, anche se la maggior parte degli studi effettuati sui camelidi ha evidenziato che la maggior parte dei calcoli si trovano nell'uretra distale o a livello della flessione sigmoidea.

I soggetti colpiti da questa patologia inizialmente manifestano segni di coliche ad intermittenza, che poi diventano più frequenti con il passare del tempo e vengono accompagnate da letargia ed anoressia fino ad arrivare alla rottura della vescica. Per far fronte a questa problematica è necessario attuare la cateterizzazione uretrale, pratica che però non è sempre possibile effettuare nei giovani alpaca a causa dell'attaccamento prepuziale-penieno che impedisce l'esteriorizzazione del pene; quindi nei casi in cui non è possibile praticare il cateterismo è necessario procedere con l'uretrotomia.

L'urolitiasi può essere prevenuta in particolare con una migliore gestione della parte nutrizionale, in quanto la somministrazione di una dieta ben bilanciata con una giusta integrazione di sale e un buon apporto di acqua può limitare l'insorgenza di tale problematica (Tibary and Anouassi, 1997d; Tibary *et al.*, 2008).

1.3.2. Anomalie dell'epididimo

Esistono poche informazioni e studi riguardanti la presenza di anomalie nell'epididimo dei camelidi sudamericani.

Alcuni studi hanno riportato la presenza di cisti dell'epididimo nell'alpaca (Sumar, 1983; Tibary *et al.*, 2001): le strutture cistiche sono state trovate nel 14,5% degli animali macellati, in particolare sulla faccia anteriore della testa dell'epididimo e vicino al bordo ventrale del testicolo (Figura 5).

La maggiore parte di queste cisti aveva un diametro variabile di 1-5 mm, anche se in alcuni casi sono state rilevate dimensioni superiori fino ad arrivare ai 50 mm (Sumar, 1983).



Figura 5: Grande cisti dell'epididimo nell'alpaca

1.3.3. Anomalie dello scroto e dei testicoli

L'esame dei testicoli comprende l'ispezione, la palpazione, la misurazione e l'ecografia dello scroto in generale e del suo contenuto.

Tale esame viene effettuato il più delle volte con l'animale in posizione eretta, in modo tale da facilitare le diverse operazioni di manipolazione dei genitali; in alcuni casi però è necessaria la sedazione dell'animale per poter portare a termine l'analisi (nel caso in cui l'animale presenta un atteggiamento aggressivo per il personale oppure nel caso in cui il soggetto presenta uno scroto estremamente sensibile e/o dolorante).

Per evidenziare l'eventuale presenza di anomalie del tratto riproduttivo maschile è estremamente importante analizzare accuratamente la struttura e le diverse caratteristiche fisiche dei testicoli (quali grandezza, asimmetria, consistenza e posizione all'interno dello scroto). Alla palpazione i testicoli normali e sani devono essere lisci, sodi ed elastici, mentre un'alterazione di queste caratteristiche e la presenza di testicoli duri e fibrotici, oppure molto morbidi, comporta la presenza di particolari alterazioni degenerative.

Oltre ad analizzare la conformazione dei testicoli è altrettanto importante esaminare la pelle dello scroto, che deve essere sottile e liscia e non deve presentare particolari anomalie e lesioni.

In quanto alle lesioni cutanee dello scroto, le più comuni sono correlate ad infiammazioni traumatiche o parassitarie (le infestazioni parassitarie comunemente osservate in questa regione anatomica sono le infestazioni da rogna da acaro o le infestazioni da zecche), oppure sono causate da traumi a seguito di morsi ad opera di altri maschi.

Nei camelidi sudamericani sono frequenti altre patologie che interessano i genitali esterni; una tra queste è l'ipoplasia testicolare che consiste in una condizione fisica probabilmente ereditaria determinata dalle ridotte dimensioni di uno o di entrambi i testicoli, con conseguente alterazione del parenchima testicolare che riporta una presenza ridotta o la mancanza totale di tubuli seminiferi e quindi un'assenza di spermatogenesi (Tibary, 2004; Waheed *et al.*, 2011).

L'incidenza di tale patologia negli alpaca è del 10% circa e in questi casi il testicolo sinistro sembra essere più colpito rispetto al testicolo destro in presenza di ipoplasia testicolare bilaterale (Sumar, 1983).

Un'altra alterazione dei testicoli meno frequente rispetto a quella appena elencata è il criptorchidismo, ossia la mancata discesa di uno o entrambi i testicoli all'interno della borsa scrotale. Questa patologia ha un'incidenza molto ridotta nei camelidi (in uno studio condotto su quasi 800 animali al macello è stata riportata un'incidenza del 3% di criptorchidismo unilaterale e di questa percentuale il 58,3% interessava il testicolo sinistro mentre il 41,7% il testicolo destro, quindi anche in questo caso così come nell'ipoplasia testicolare il testicolo sinistro sembra essere il più colpito da tali patologie) (Sumar, 1983).

La degenerazione testicolare è un'altra anomalia del tratto riproduttivo maschile causa più comune dell'infertilità dell'animale (Ahmed e Nada, 1993; Tibary et al., 2005). Tale condizione può avere diverse origini, come un forte stress da caldo a cui è sottoposto l'animale, a seguito di traumi o infiammazioni dei testicoli e/o dello scroto, febbre, presenza di tossine, condizione di squilibrio nutrizionale o ormonale.

La degenerazione testicolare inoltre porta al deterioramento dell'epitelio seminifero e al deterioramento della qualità dello sperma (Figura 6), con conseguente azoospermia (assenza di spermatozoi nel liquido seminale), oligozoospermia (chiamata anche oligospermia, condizione in cui lo sperma contiene un numero di spermatozoi più basso del normale) e teratozoospermia (presenza di spermatozoi malformati).

Infine, un'ulteriore problematica di notevole importanza è rappresentata dall'insorgenza di cisti testicolari (o cisti della rete testis), formazioni sacculari anomale che possono essere visualizzate mediante ecografia (Figura 7 e 8).

Non esistono studi specifici che consentono di identificare l'esatta eziopatogenesi di questa anomalia, ma è possibile riconoscere alcuni fattori scatenanti come per esempio un drenaggio linfatico disturbato oppure l'ostruzione dei dotti efferenti (o ductus efferentes, condotti che collegano la rete testicolare con la sezione iniziale dell'epididimo) (Tibary, 2003, 2004a, 2004b; Tibary et al., 2001; Tibary and Pugh, 2003).

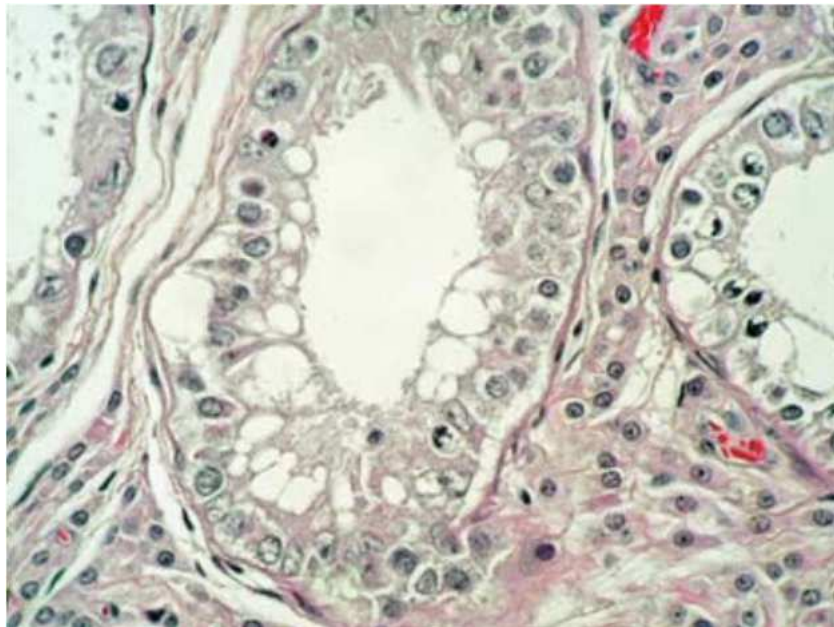


Figura 6: Immagine istologica che raffigura la degenerazione testicolare in un alpaca. In questa raffigurazione si può notare l'aspetto vacuolizzato dei tuboli seminiferi (ricco di vacuoli, piccole cavità, all'interno del citoplasma cellulare) e la totale assenza di attività spermatica



Figura 7: Cisti testicolari (rete testis) in un alpaca. Campione ottenuto dopo la castrazione.

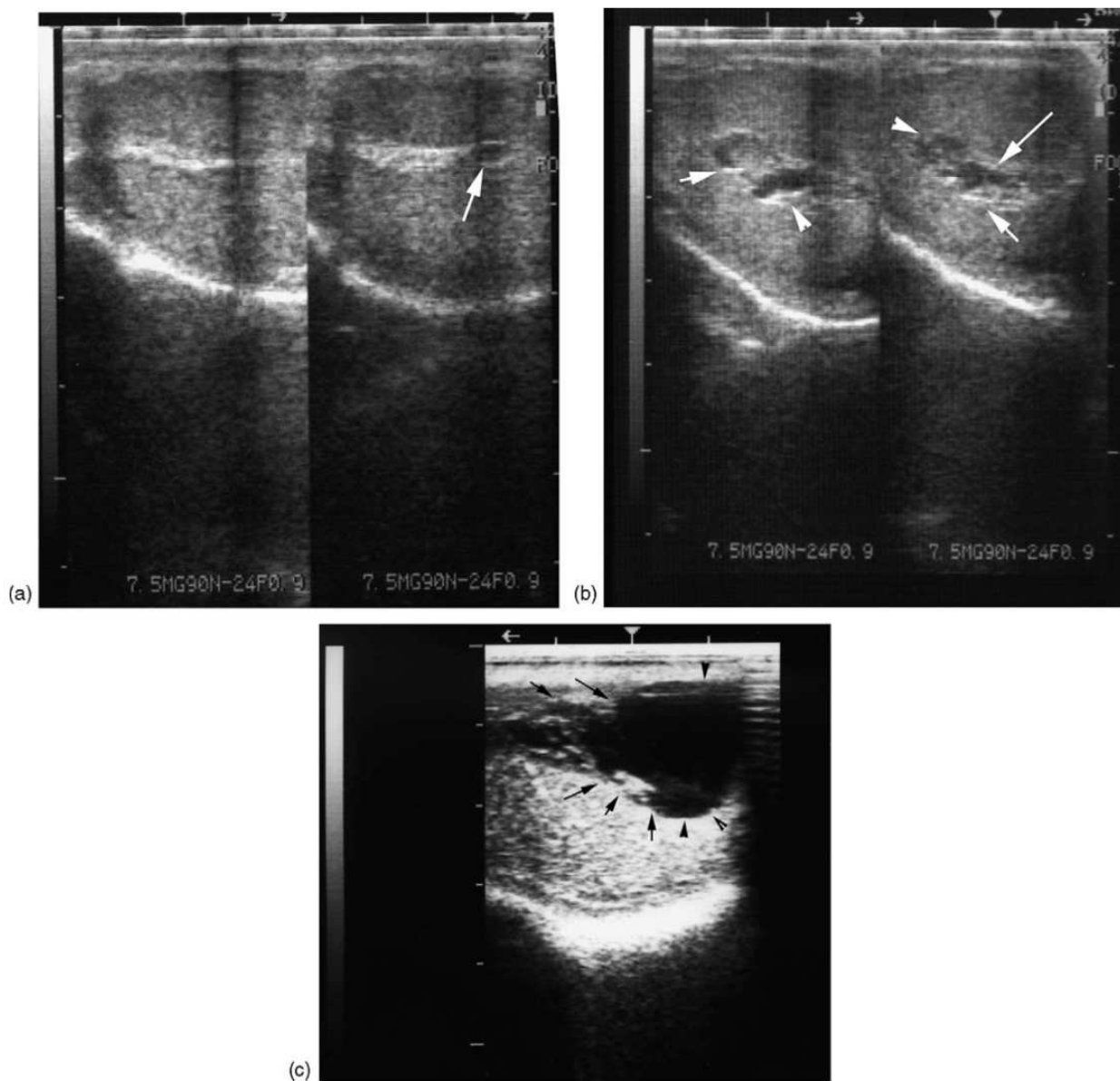


Figura 8: Immagini ecografiche delle cisti della rete testis: le diverse immagini (a-c) raffigurano il testicolo di alpaca con diversi gradi di dilatazione cistica della rete testis (Tibary e Vaughan, 2006)

1.4. L'ecografia ed i suoi principi fondamentali

L'ecografia (chiamata anche ultrasonografia o ecotomografia) è il metodo di imaging medico maggiormente utilizzato in diversi ambiti.

Tale tecnica di diagnostica per immagini si basa sulla trasmissione di onde sonore ad alta frequenza attraverso l'organismo e gli echi che ne derivano vengono poi ricevuti ed analizzati da un computer, che a sua volta crea un'immagine in sezione ad alta risoluzione di organi, tessuti e flussi ematici (Mattoon e Nyland, 2015).

Le tecniche ad ultrasuoni stanno assumendo un'importanza sempre più rilevante nella riproduzione animale, essendo sia un metodo di diagnosi che uno strumento terapeutico.

Di conseguenza, è fondamentale oggi comprendere al meglio l'uso delle tecnologie ad ultrasuoni utilizzate ampiamente nelle realtà zootecniche contemporanee, dato che gli esami ecografici sono oramai una routine e una componente cruciale negli esami diagnostici in riproduzione.

Le ecografie infatti consentono di valutare lo stato della gravidanza e del feto, permettono di identificare precocemente l'eventuale presenza di feti gemelli (che potrebbero portare a problematiche alla madre e a criticità durante il parto), permettono di evidenziare patologie ovariche ed uterine nella femmina (non facilmente rilevabili attraverso la palpazione rettale) e consentono di mettere in evidenza patologie e/o anomalie dell'apparato riproduttivo maschile (Medan e Abd El-Aty, 2010).

Oltre all'ampio spettro di utilizzo, le ecografie presentano molteplici vantaggi: il loro utilizzo è privo di rischi e controindicazioni, non presentano effetti collaterali e l'esecuzione è semplice, rapida ed indolore.

Per eseguire esami ecografici di buona qualità è importante analizzare e comprendere i principi fisici che sono alla base dell'ecografia diagnostica.

1.4.1. Interazione tra onde ultrasonore e la materia

Il suono è il risultato della propagazione dell'energia meccanica sotto forma di onda pressoria attraverso la materia, in grado di produrre alternativamente bande di compressione e rarefazione di molecole all'interno del mezzo di conduzione (Mattoon e Nyland, 2015).

Gli ultrasuoni sono delle oscillazioni ad andamento sinusoidale di frequenza superiore ai 20.000 Hz, ossia una frequenza superiore alla capacità delle persone di udire i suoni (i suoni udibili dall'orecchio umano presentano una frequenza compresa tra i 16 e i 20.000 Hz, mentre le frequenze inferiori ai 16 Hz sono definite come infrasuoni).

Al contrario, le onde sonore utilizzate nelle ecografie diagnostiche sono caratterizzate da una frequenza fino a 1.000 volte maggiore rispetto al range percepibile dall'essere umano; normalmente negli esami medici ecografici si utilizzano frequenze sonore da 2 a 20 MHz con oscillazioni di tipo longitudinale. Queste onde meccaniche si possono propagare solo attraverso un mezzo fisico deformabile (quale solido, liquido o gas, mentre non possono propagarsi nel vuoto) e portano a delle perturbazioni transitorie dello stato fisico senza che si verifichi il trasporto della materia; più nello specifico le perturbazioni transitorie dello stato fisico interessano la pressione e la densità del mezzo.

Tale mezzo fisico deformabile è composto da particelle legate tra di loro da forze di coesione elastiche che quando vengono colpite dall'onda meccanica ultrasonora si avvicinano tra di loro (fase di compressione), cedono una parte della loro energia alle particelle vicine e poi ritornano allo stato di equilibrio di partenza (fase di rarefazione); questo meccanismo si ripete poi in modo consequenziale anche con le particelle successive.

In conclusione gli ultrasuoni si propagano nel mezzo in esame sotto forma di variazioni di pressione, variazioni che determinano la formazione di bande a maggiore e a minore densità di particelle rispettivamente nella fase di pressione e nella fase di rarefazione (Figura 9).

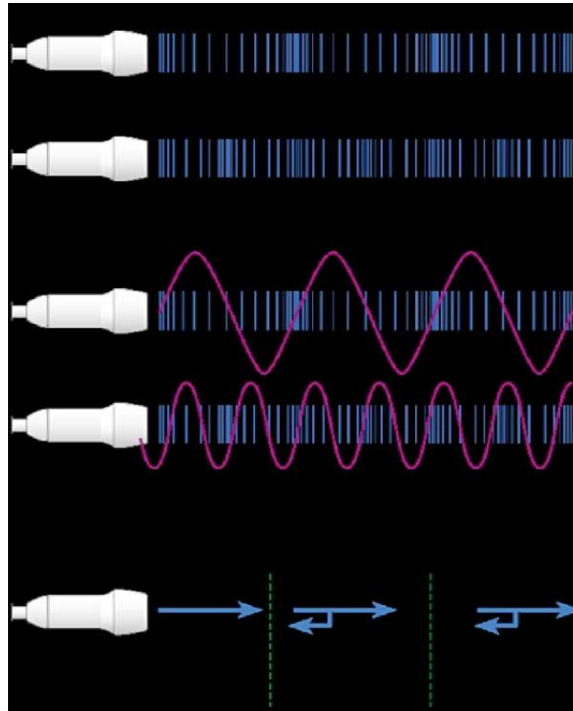


Figura 9: Raffigurazione della trasmissione delle onde sonore e degli echi. Gli ultrasuoni vengono emessi da una sonda sotto forma di onde longitudinali, formate da aree di compressione ed aree di rarefazione (Mattoon e Nyland, 2015).

1.4.2. Grandezze caratteristiche dell'onda ultrasonora

L'onda ultrasonora presenta le caratteristiche tipiche di un moto oscillatorio armonico e può essere rappresentato in un grafico cartesiano come un'onda sinusoidale, dove sull'asse delle ascisse è indicato il tempo (t) mentre nell'asse delle ordinate vengono riportate le variazioni di pressione (P).

Le principali grandezze fisiche che caratterizzano un'onda ultrasonora sono (Figura 10):

- Lunghezza d'onda (l , più comunemente indicata con la lettera greca λ): è la distanza tra due picchi successivi di un'onda periodica. Più specificatamente può essere definita come la distanza percorsa durante un ciclo o un periodo tra due bande di compressione o di rarefazione.

- Frequenza (f): è il numero di cicli al secondo, misurabile in Hertz (Hz), ossia il numero di volte in cui si ripete una lunghezza d'onda (cicli) al secondo. 1 Hz corrisponde ad 1 ciclo/s, 1 KHz (kilohertz) è equivalente a 1.000 cicli/s ed infine 1 MHz (megahertz) corrisponde a 1.000.000 cicli/s.
- Velocità di propagazione (c): è la distanza percorsa dall'onda nell'unità di tempo, misurabile in m/s. Questo parametro è condizionato dalle proprietà fisiche del mezzo in analisi, principalmente dalla resistenza del mezzo alla compressione che a sua volta dipende dalla sua densità e dalla sua elasticità (o compattezza). La velocità media di propagazione degli ultrasuoni aumenta nei tessuti compatti e diminuisce in quelli ad alta densità, ma per quanto riguarda i tessuti biologici dell'organismo è possibile identificare una velocità media di circa 1540 m/s (ad eccezione dell'aria, del grasso e dell'osso che assumono un valore diverso) (Tabella 5).
- Periodo (T): è il tempo necessario affinché passino due compressioni successive nello stesso punto, misurabile in secondi. In altre parole può essere definito come l'intervallo temporale corrispondente alla lunghezza d'onda, poiché rappresenta il tempo in cui l'onda compie un'oscillazione completa e poi torna alla sua condizione iniziale.
- Ampiezza dell'onda (A): è l'altezza dell'onda e quindi rappresenta la differenza tra il valore massimo dell'onda ultrasonora in fase di compressione ed il valore di equilibrio (raffigura il massimo spostamento delle molecole che compongono la materia rispetto alla loro posizione di equilibrio).
- Intensità (I): è l'energia trasportata dall'onda, che attraversa in un secondo una superficie unitaria piana perpendicolare alla direzione di propagazione dell'onda stessa. In altre parole, l'intensità di un'onda è la potenza trasmessa dalla sorgente di tale onda per unità di superficie, misurabile in W/cm².

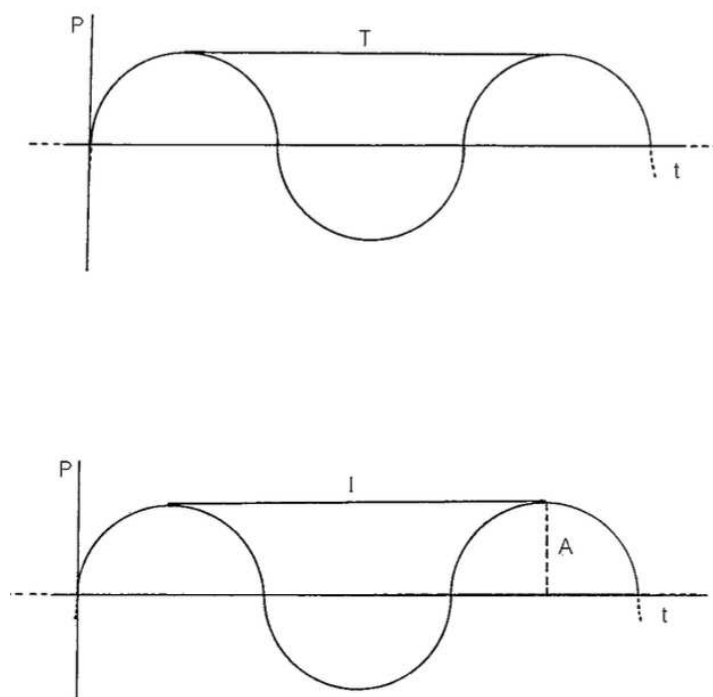


Figura 10: Rappresentazione grafica della progressione del fascio di ultrasuoni, che avviene con un andamento sinusoidale nel mezzo trasmittente. Sull'asse delle ascisse è indicato il tempo (t) e sull'asse delle ordinate la variazione di pressione (P). Nel primo grafico è rappresentato il periodo (T) misurato in secondi, mentre nella seconda rappresentazione è raffigurata la lunghezza d'onda (l) misurata in mm e l'ampiezza dell'onda (A) (Orlacchio A., 2010)

aria	331	m/s
grasso	1450	m/s
acqua	1540	m/s
tessuti molli	1540	m/s
cervello	1541	m/s
fegato	1549	m/s
sangue	1570	m/s
muscolo	1585	m/s
cristallino	1620	m/s
osso	4080	m/s

Tabella 5: Velocità di propagazione degli ultrasuoni nei tessuti (Orlacchio A., 2010)

1.4.3. Interfaccia ed impedenza acustica

L'impedenza acustica (Z) è una caratteristica propria di ogni mezzo che descrive come esso si oppone al passaggio degli ultrasuoni, è quindi la resistenza intrinseca della materia ad essere attraversata dagli ultrasuoni.

Tale grandezza si misura in Rayl e dipende dalla densità del mezzo e dalla velocità di propagazione delle onde sonore; si ottiene dal prodotto tra la densità tissutale (d) e la velocità di propagazione (c).

I diversi tessuti anatomici hanno tutti un'impedenza diversa e questo è il principio su cui si basano le tecniche ecografiche; per esempio il tessuto osseo e i gas hanno impedenze acustiche rispettivamente alte e basse.

L'aria è meno densa e più facilmente comprimibile rispetto ai tessuti parenchimatosi e trasmette il suono ad una velocità inferiore, invece l'osso è più denso e meno comprimibile e trasmette il suono ad una velocità maggiore (Tabella 6).

Tra due mezzi dotati di un'impedenza acustica differente si può evidenziare una superficie di separazione (interfaccia) nella quale la propagazione degli ultrasuoni subisce alcune alterazioni per effetto dei fenomeni di riflessione, rifrazione, diffusione o dispersione.

La riflessione è il fenomeno per cui un'onda ultrasonora che agisce sulla superficie di separazione (interfaccia) tra due mezzi differenti non attraversa l'interfaccia ma cambia direzione di propagazione e ritorna al mezzo di partenza, per cui l'interfaccia rappresenta la superficie riflettente che rinvia gli ultrasuoni alla sonda.

Quando il fascio di ultrasuoni raggiunge perpendicolarmente l'interfaccia si ha la massima riflessione speculare e quindi tutta l'energia viene rinviata verso la sonda (Figura 11); invece se il fascio di ultrasuoni agisce sulla superficie dell'interfaccia in modo obliquo e non perpendicolare si va a generare un fascio riflesso dotato di un angolo di riflessione uguale a quello di incidenza (Figura 12).

Se l'interfaccia viene colpita con un angolo non perpendicolare ma obliquo, il fascio di onde ultrasonore subisce una deviazione superando la struttura e questo prende il nome di rifrazione. Questo fenomeno di alterazione della

direzione del fascio ultrasonoro dipende dall'angolo di incidenza del fascio a livello dell'interfaccia e dalla diversa velocità di propagazione degli ultrasuoni nei mezzi in analisi.

Infine, il fenomeno della diffusione (o scattering, che deriva dal termine inglese “*scatter*” ossia spargimento) si verifica quando il fascio di onde incontra una superficie irregolare o tante piccole superfici orientate in modi diversi e questo porta alla diffusione del fascio in tutte le direzioni in modo casuale.

Invece il fenomeno della dispersione (o diffrazione) avviene quando il fascio ultrasonoro incontra delle particelle più piccole della lunghezza d'onda degli ultrasuoni e quindi l'energia di ritorno è estremamente bassa.

aria	0,0000	× 10 ⁶ Rayls
grasso	1,38	× 10 ⁶ Rayls
acqua	1,44	× 10 ⁶ Rayls
cervello	1,54	× 10 ⁶ Rayls
fegato	1,65	× 10 ⁶ Rayls
rene	1,62	× 10 ⁶ Rayls
sangue	1,61	× 10 ⁶ Rayls
muscolo	1,70	× 10 ⁶ Rayls
cristallino	1,84	× 10 ⁶ Rayls
osso	7,8	× 10 ⁶ Rayls

Tabella 6: impedenza acustica di diversi tessuti, derivante dal prodotto tra la densità tissutale e la velocità di propagazione degli ultrasuoni (Orlacchio A., 2010)

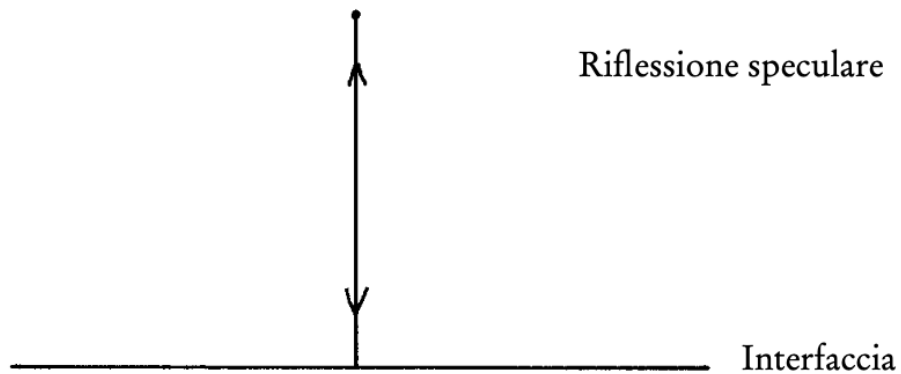


Figura 11: Rappresentazione grafica della riflessione speculare, secondo la quale tutta l'energia viene rinviata verso la sonda quando il fascio di ultrasuoni incide perpendicolarmente sulla superficie riflettente (Orlacchio A., 2010)

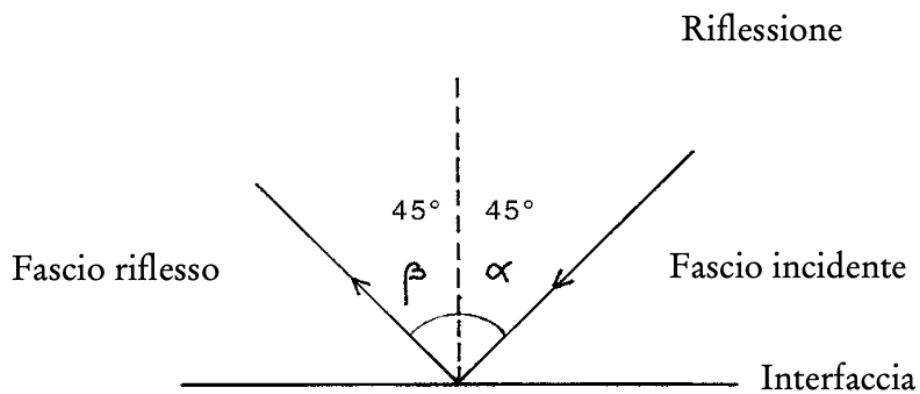


Figura 12: Rappresentazione grafica della riflessione obliqua, secondo la quale in caso di incidenza obliqua del fascio di ultrasuoni l'eco di ritorno viene rinviato con un angolo di riflessione uguale a quello incidente (Orlacchio A., 2010)

1.4.4. Diverse modalità di acquisizione del segnale ultrasuono

Gli ecografi moderni presentano più modalità di funzionamento, infatti esistono diverse procedure di visualizzazione delle immagini ecografiche in grado di fornire informazioni diverse sul tessuto o sull'organo oggetto di studio.

Tra queste diverse modalità di acquisizione e visualizzazione degli echi di ritorno è possibile identificarne tre, più frequentemente utilizzate nelle applicazioni cliniche in medicina veterinaria: A-mode, B-mode e M-mode.

L'A-mode (o "*Amplitude mode*", ossia modulazione di ampiezza) è la modalità di acquisizione del segnale ultrasonoro utilizzata meno frequentemente in ambito veterinario ma è anche la più semplice, che consiste nell'invio da parte dell'ecografo di un impulso alla volta per misurare la profondità o le dimensioni di un organo. Tale modalità viene utilizzata prevalentemente durante gli esami oculistici e per esami che richiedono una misurazione precisa di lunghezza e profondità, come nel caso della determinazione dello spessore del grasso dorsale negli animali da reddito.

Il segnale inviato viene poi rappresentato su un grafico monodimensionale con variazioni di oscillazione di una linea su un grafico, dove l'asse verticale rappresenta l'ampiezza degli echi di ritorno mentre l'asse orizzontale indica la profondità da cui deriva l'eco (infatti l'altezza dei picchi rispetto alla linea di base rappresenta l'ampiezza degli echi, invece la posizione dei picchi lungo la linea di base rappresenta la profondità da cui deriva l'eco) (Figura 13).

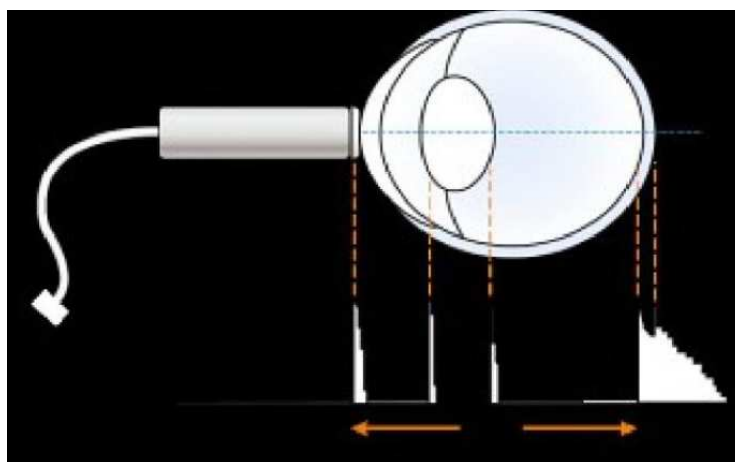


Figura 13: Rappresentazione grafica della modalità di visualizzazione degli ultrasuoni A-mode (Mattoon e Nyland, 2016)

La modalità di visualizzazione degli echi B-mode (o “*Brightness mode*”, ovvero modulazione di luminosità) è la più utilizzata in ecografia e consente di produrre immagini bidimensionali che raffigurano la sezione del tessuto/organo bersaglio, in modo tale da ottenere sia informazioni morfologiche che funzionali. Tale immagine che ne ricaviamo è formata da punti a differente luminosità in una scala di grigi; gli echi di ritorno appaiono come punti la cui luminosità o scala di grigi è proporzionale all’ampiezza degli echi mentre la cui posizione è equivalente alla profondità degli echi stessi (Figura 14).



Figura 14: Rappresentazione grafica della modalità di visualizzazione degli ultrasuoni B-mode (Riccitelli S., 2014)

Infine la modalità M-mode (o “*Motion mode*”) consente di ottenere un serie di immagini in sequenza che rappresentano il movimento di una struttura nel tempo.

Lo spostamento dell’immagine rispetto alla linea di base rappresenta il movimento nel tempo delle strutture da cui provengono gli echi; da questo ne deriva che le strutture fisse appaiono come una linea retta mentre le strutture in movimento vengono raffigurare come dei punti luminosi che si spostano rispetto alla linea di base (Figura 15).

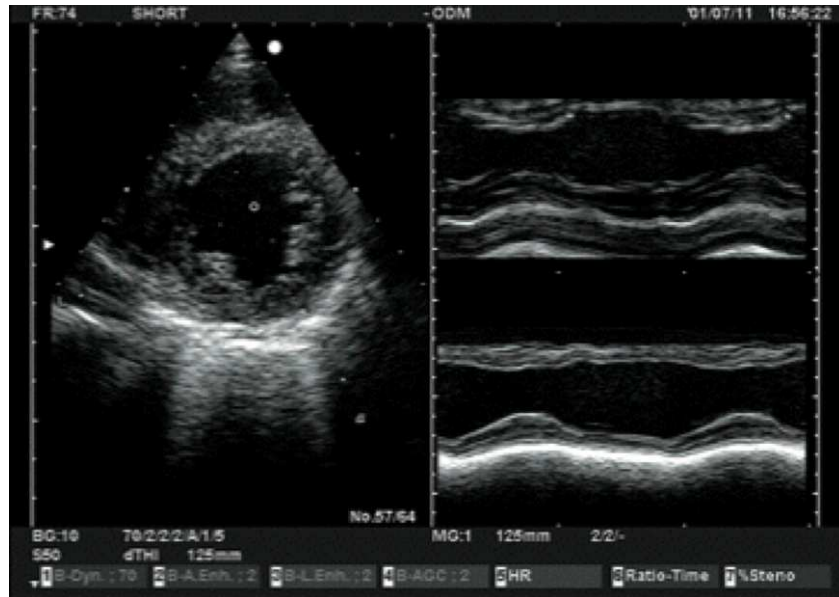


Figura 15: Raffigurazione grafica della modalità di visualizzazione degli ultrasuoni B-mode (immagine a sinistra) e M-mode (immagine a destra) (Riccitelli S., 2014)

1.4.5. Apparecchiature necessarie per la tecnica ad ultrasuoni

L'apparecchio utilizzato per l'attuazione di questa tecnica diagnostica è l'ecografo, un dispositivo in grado di generare ultrasuoni, ricevere, elaborare ed infine trasformare in immagini le onde ultrasonore rinviate (echi) dalle superfici tissutali riflettenti (interfacce).

Tutti gli apparecchi ecografici sono costituiti da diverse sezioni fondamentali e componenti di base, indipendentemente dal loro costo e dalla loro qualità:

- Generatore di impulsi;
- Trasduttore;
- Sistema elettronico di amplificazione, elaborazione e digitalizzazione;
- Sistemi di visualizzazione;
- Sistemi di registrazione.

Il trasduttore (più comunemente chiamato sonda) è un dispositivo in grado di generare e ricevere ultrasuoni in modo alternato attraverso l'uso di cristalli piezoelettrici, infatti grazie alle proprietà piezoelettriche degli elementi che lo

compongono è in grado di convertire l'energia elettrica in energia meccanica e viceversa.

Il generatore di impulsi invia impulsi sincronizzati ad alto voltaggio ai cristalli piezoelettrici (come il quarzo) che si trovano all'interno della sonda, i quali vibrano ed emettono ultrasuoni che vengono trasferiti al paziente.

L'immagine finale si crea grazie agli echi di ritorno dal tessuto alla sonda dopo ogni impulso e viene inviata ad un sistema elettronico, che provvede ad amplificare, elaborare e digitalizzare gli echi riflessi dalle interfacce.

Una volta ottenuta l'immagine ecografica questa viene riprodotta su un monitor (sistema di visualizzazione) e successivamente viene registrata su uno specifico sistema di registrazione delle immagini (pellicola radiografica, pellicola a sviluppo istantaneo, carta termica oppure su videoregistratore).

1.4.6. Terminologia ecografica e interpretazione delle immagini ecografiche

Per effettuare una corretta analisi delle immagini ecografiche è fondamentale conoscere ed utilizzare i termini specifici, in grado di descrivere al meglio le proprietà delle diverse strutture biologiche analizzate.

I termini maggiormente utilizzati per descrivere l'aspetto delle immagini ecografiche sono:

- *Anecogeno*: termine ecografico che descrive un'area ecopriva, ovvero una struttura in cui non si ha la produzione di echi riflessi. Questo avviene con strutture a contenuto completamente liquido, sia di tipo fisiologico (come una vescica ripiena di urina oppure i vasi sanguigni) che di tipo patologico (come la presenza di cisti).

Tali aree appaiono nere nelle immagini ecografiche, poiché sono in grado di trasmettere facilmente il suono senza alcuna attenuazione (Figura 16).

- *Trasonico*: termine utilizzato per descrivere una struttura che si lascia attraversare liberamente dagli ultrasuoni.
- *Isoecogeno* (*iso* = uguale): espressione utilizzata per indicare strutture con un'ecogenicità uguale a quella del parenchima circostante normale o degli altri organi e tessuti circostanti.

- *Ipoecogeno* (*ipo* = minore): termine utilizzato per indicare una struttura con un'ecogenicità minore, ossia una struttura in grado di produrre pochi echi quando viene raggiunta dagli ultrasuoni.
Un'area ipoecogena si presenta con una colorazione grigio scuro tendente al nero, più scura rispetto ad un'area normale questo perché lascia passare gli ultrasuoni ed il livello di riflessione è ridotto (Figura 17).
- *Iperecogeno* (*iper* = maggiore): termine utilizzato per indicare una struttura con un'ecogenicità maggiore, in grado di riflettere una notevole quantità di onde ultrasonore. Tale caratteristica è tipica delle strutture solide (come i calcoli), che nelle immagini ecografiche si presentano di un colore più luminoso (da grigio chiaro a bianco) vista la loro capacità di riflettere le onde ultrasonore (Figura 18).

La formazione dell'immagine ecografica finale deriva da una combinazione di echi sia diffusi che speculari prodotti dalla struttura analizzata.

Il sangue o i fluidi in generale che non contengono cellule o particelle appaiono solitamente neri nelle immagini ecografiche, dato che la loro capacità di riflessione degli echi è estremamente ridotta; al contrario i liquidi dotati di una certa viscosità a causa di un aumento del quantitativo di proteine, cellule o particelle, possono invece presentare un certo grado di ecogenicità (anche se l'ecogenicità non è un indicatore affidabile della composizione di un liquido).

Gli organi parenchimatosi (come fegato e reni, dotati di un parenchima compatto) ed i tessuti sani privi di anomalie e patologie sono rappresentati nelle immagini ecografiche da diverse tonalità di grigio, senza particolari distinzioni a seconda dell'animale. Qualora però tali organi e tessuti vengono colpiti da patologie il loro livello di ecogenicità può subire delle modifiche importanti.

Il tessuto adiposo normalmente è un mezzo molto ecogeno, in particolare il grasso strutturale dotato di un maggiore contenuto di tessuto connettivo.

Un altro aspetto fondamentale di cui tener conto nell'analisi delle immagini ottenute tramite ecografia (oltre all'ecogenicità delle strutture e delle sostanze anatomiche e alla diversa colorazione che queste assumono nella scala dei

grigi) è l'ecostruttura dell'immagine, che fornisce informazioni sulla struttura e sulla composizione anatomica dell'organo o del tessuto analizzato.

Nello specifico è estremamente importante la dimensione, la distanza e la regolarità dei punti che compongono l'immagine.

I punti possono essere piccoli, medi o grandi, possono essere ravvicinati o distanti e possono avere una dimensione ed una distanza simile (ecostruttura uniforme, con punti di dimensione e distanza simile nel parenchima) oppure non eterogenea (ecostruttura eterogenea, con dimensione dei punti e distanza variabile all'interno del parenchima).

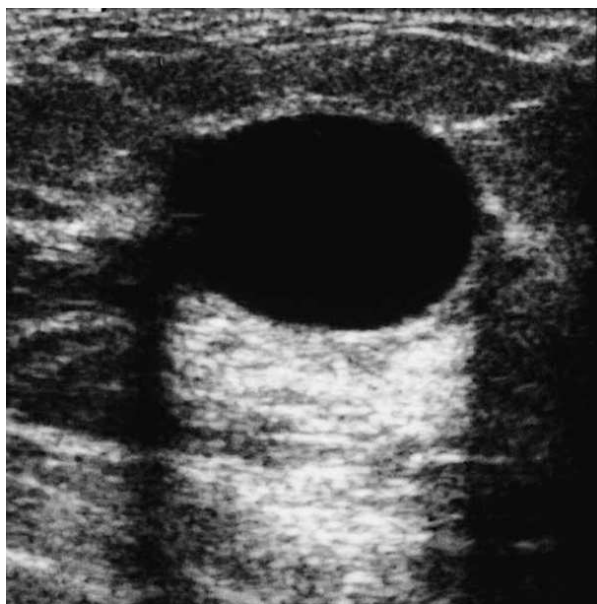


Figura 16: Rappresentazione di una lesione anecogena. L'immagine mostra un'area rotondeggiante priva di echi al suo interno con margini netti e regolari, riconducibile ad una formazione cistica.

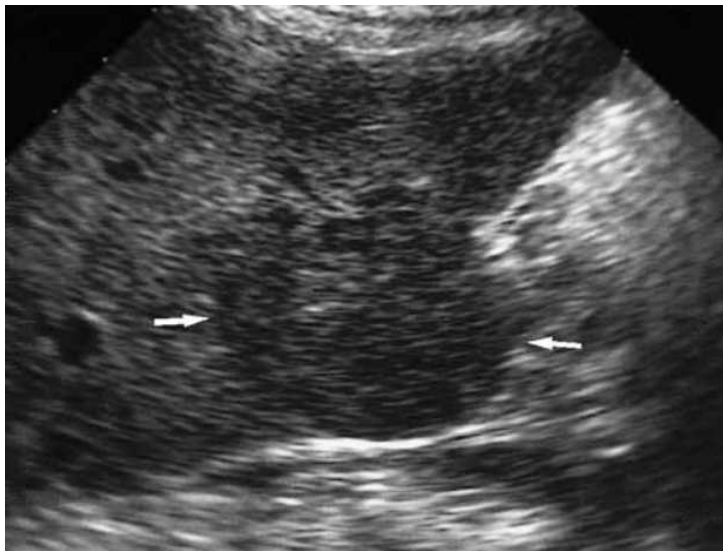


Figura 17: Raffigurazione di una lesione ipoecogena. L'immagine rappresenta un'area rotondeggiante ipoecogena in modo omogeneo, che si distingue nettamente rispetto al parenchima circostante; riconducibile ad un adenoma nel fegato (tumore epiteliale benigno a struttura ghiandolare)

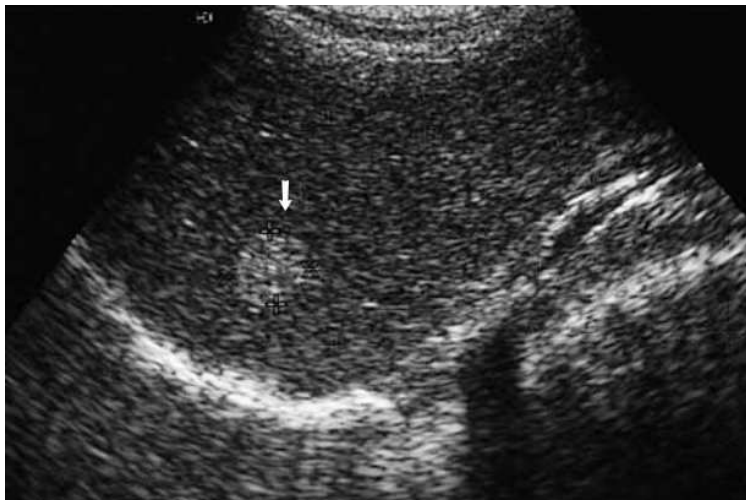


Figura 18: Raffigurazione di una lesione iperecogena. Nell'immagine si può notare un'area rotondeggiante omogeneamente iperecogena, con margini regolari e con un'ecostruttura diversa rispetto al parenchima circostante; riconducibile ad un angioma capillare.

1.4.7. Artefatti ecografici

Un aspetto di fondamentale importanza di cui tener conto durante l'analisi delle immagini ecografiche è la presenza di artefatti, ovvero delle immagini aggiuntive errate che non corrispondono all'esatta anatomia e funzionalità del tessuto reale ma sono il risultato di interazioni particolari ed alterate del fascio di ultrasuoni con le strutture analizzate.

La presenza di questi artefatti possono portare a diverse modifiche dell'immagine reale, come per esempio la presenza di strutture anatomiche non reali, mancanti, dislocate rispetto alla loro reale posizione, con forma, dimensione ed ecogenicità alterata.

Tali alterazioni sono molto frequenti in medicina veterinaria e il più delle volte sono causate dal movimento dell'animale in esame; per questo motivo l'operatore deve essere in grado di riconoscere ed eliminare tali insidie, che potrebbero portare ad un'errata lettura delle immagini ecografiche.

Gli artefatti ecografici possono essere suddivisi in due macrocategorie: artefatti da propagazione (come riverberazione, coda di cometa ed effetto specchio) ed artefatti da attenuazione (come il cono d'ombra posteriore e le ombre acustiche laterali).

Gli artefatti da riverberazione si originano quando il fascio di ultrasuoni rimbalza ripetutamente tra due superfici altamente riflettenti (solitamente gas) oppure tra la sonda ecografica e un tessuto con un elevato livello di riflettenza che rimanda gli echi al trasduttore.

Da questa alterazione si creano delle linee da riverberazione ripetute ben distinguibili, la cui numerosità dipende dalla forza di penetrazione del fascio di ultrasuoni e dalla sensibilità della sonda (Figura 19).

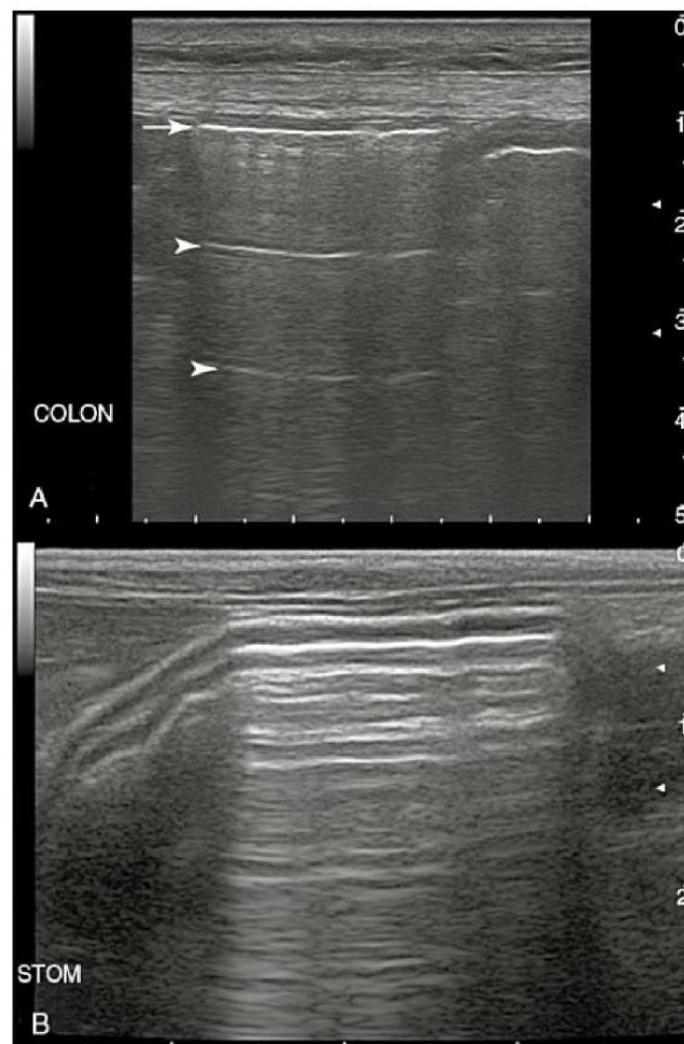


Figura 19: (A) Rappresentazione di un artefatto da riverberazione (chiamato anche artefatto da ripetizione). La linea ecogena più superficiale rappresenta l'interfaccia in analisi mentre nella frazione sottostante si possono osservare due artefatti ecogeni lineari ripetuti (indicati dalle frecce) (Mattoon e Nyland, 2016)

L'artefatto a coda di cometa è facilmente distinguibile ed identificabile nelle immagini ecografiche, che presentano una serie di piccoli echi molto luminosi ad una distanza ravvicinata. Tale condizione si verifica quando il fascio ultrasonoro investe una superficie relativamente piccola, nella quale sono presenti diverse interfacce con differente impedenza acustica (come per esempio piccole bolle di gas ravvicinate).

Infine un altro artefatto da propagazione è l'artefatto specchio, prodotto da interfacce curve molto riflettenti che causano la formazione di riflessione

multiple a specchio rispetto all'interfaccia d'interesse; in questo modo si ha la duplicazione dell'immagine in posizione speculare rispetto alla superficie d'origine (Figura 20).



Figura 20: Rappresentazione di un'immagine anomala del fegato con un artefatto specchio; in questo esempio si possono notare le immagini speculari di fegato, cistifellea e calcoli biliari (Mattoon e Nyland, 2016)

L'ombra acustica (o cono d'ombra) corrisponde all'attenuazione del fascio di ultrasuoni causata dal meccanismo di riflessione, che si manifesta come un'area di echi a bassa ampiezza o intensità (area ipoecogena o anecogena simile ad un'ombra a forma di cono).

Il cono d'ombra posteriore è un artefatto secondario ad una riflessione quasi completa o all'assorbimento quasi totale del suono, e maggiore è la percentuale del fascio attenuato maggiore è il cono d'ombra che si va a formare.

Questo artefatto da attenuazione può essere causato dalla presenza di gas o di tessuto osseo, infatti nel caso di un tessuto parenchimoso-gas gli echi vengono riflessi e si ha la formazione di un'ombra disomogenea mentre nel caso di un tessuto parenchimoso-osso si forma un'ombra acustica omogenea

e uniformemente nera (i calcoli hanno un comportamento simile al tessuto osseo e quindi possono portare alla formazione di un cono d'ombra posteriore omogeneo e pulito) (Figura 21 e 22).



Figura 21: Rappresentazione di un cono d'ombra posteriore. La surrenale destra calcificata di un gatto mostra un cono 'ombra posteriore omogeneo (indicato dalle frecce), che appare come un'area anecogena al di sotto della superficie ecogena della ghiandola surrenale (Mattoon e Nyland, 2016)



Figura 22: Rappresentazione di un cono d'ombra posteriore. I numerosi calcoli vescicali creano un cono d'ombra posteriore omogeneo (Mattoon e Nyland, 2016)

Oltre all'insorgenza di un'ombra acustica posteriore è possibile riscontrare occasionalmente anche ombre acustiche laterali, ossia rifrazioni ai margini laterali di una struttura curva ripiena di liquido.

Questo fenomeno è causato dalla velocità più bassa degli ultrasuoni in strutture ricche di liquido e si osserva regolarmente sui margini di strutture rotondeggianti, come vescica, cistifellea, ghiandole surrenali e reni (Figura 23).

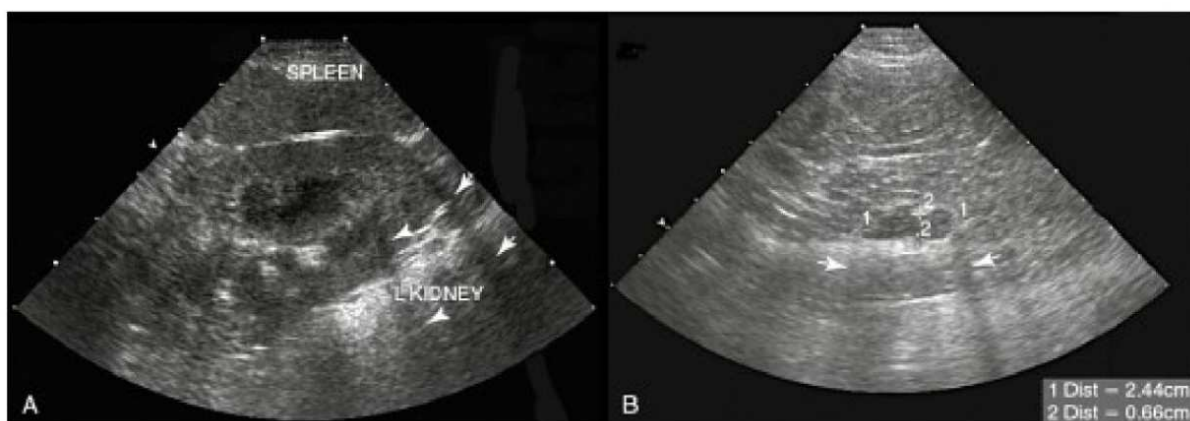


Figura 23: Rappresentazione di ombre acustiche laterali. Si possono notare sottili linee scure che si originano dai margini laterali del rene (indicate dalle frecce) (Mattoon e Nyland, 2016)

1.5. Esame ecografico nei maschi di alpaca

Come annunciato in precedenza, l'apparato riproduttivo maschile può essere interessato da diverse patologie ed anomalie d'importanza variabile che possono portare all'alterazione delle capacità riproduttive dell'animale.

Tra queste patologie assumono una notevole rilevanza le anomalie dello scroto e dei testicoli, in particolare la presenza di cisti testicolari ha un'incidenza nella popolazione di alpaca maggiore rispetto alle altre patologie (circa il 14,5% della percentuale totale di soggetti che hanno riportato la presenza di anomalie e/o patologie una volta al macello).

L'esame ecografico dello scroto dei camelidi sudamericani può essere effettuato con l'animale in piedi e prevede una prima parte in cui lo scroto del maschio viene pulito per eliminare i residui di sporco presenti sulla superficie testicolare ed una seconda fase in cui si procede con la distribuzione di una quantità adeguata di gel di accoppiamento direttamente sul trasduttore (o sonda ecografica) per garantire un buon contatto con il tessuto dell'organo da analizzare.

In seguito ogni testicolo viene esaminato in modo analitico, spostando la sonda prima in posizione verticale e poi in posizione orizzontale in modo tale da ottenere diverse immagini ecografiche sulla sezione longitudinale destra e sinistra dell'organo e sulla sezione trasversale, utilizzando il mediastino testicolare come punto di riferimento.

In un soggetto sano, privo di anomalie e/o patologie, le diverse immagini ad ultrasuoni devono riportare due aree facilmente distinguibili: un'area periferica costituita da un tessuto omogeneo normoecogeno che corrisponde al parenchima testicolare, e un'area centrale maggiormente ecogena che corrisponde alla rete testicolare (o rete testis, una rete di anastomosi di tubuli responsabili del trasporto dello sperma dai tubuli seminiferi ai dotti deferenti) (Figura 24).

Il parenchima testicolare però può subire delle variazioni, infatti può perdere il suo aspetto omogeneo in presenza di particolari lesioni, come nel caso di cisti che appaiono come aree ipoecogene (Figura 25).

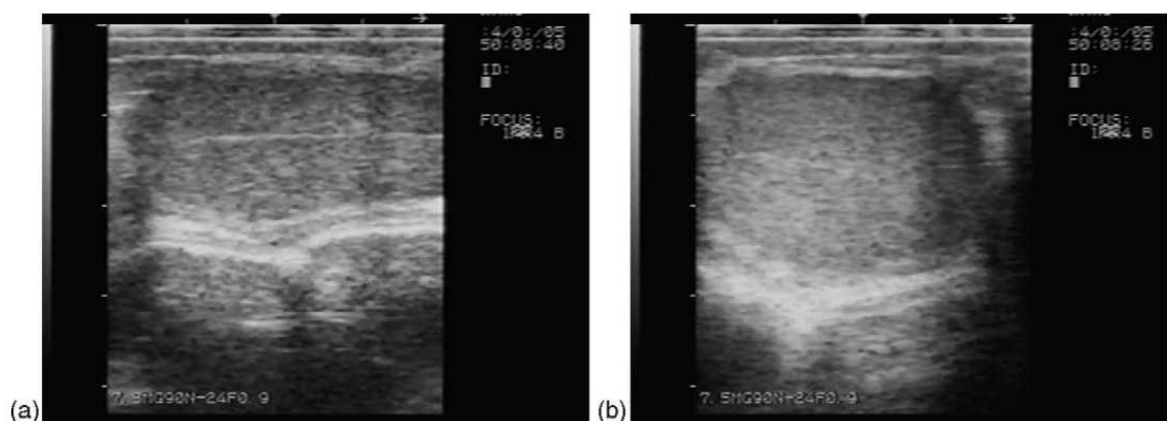


Figura 24: Immagini ecografiche che mostrano la normale struttura di un testicolo di alpaca: (a) asse longitudinale e (b) sezione trasversale. In queste immagini è ben visibile rete testis fibrosa che appare come una struttura ecogena (mediastinum testis)

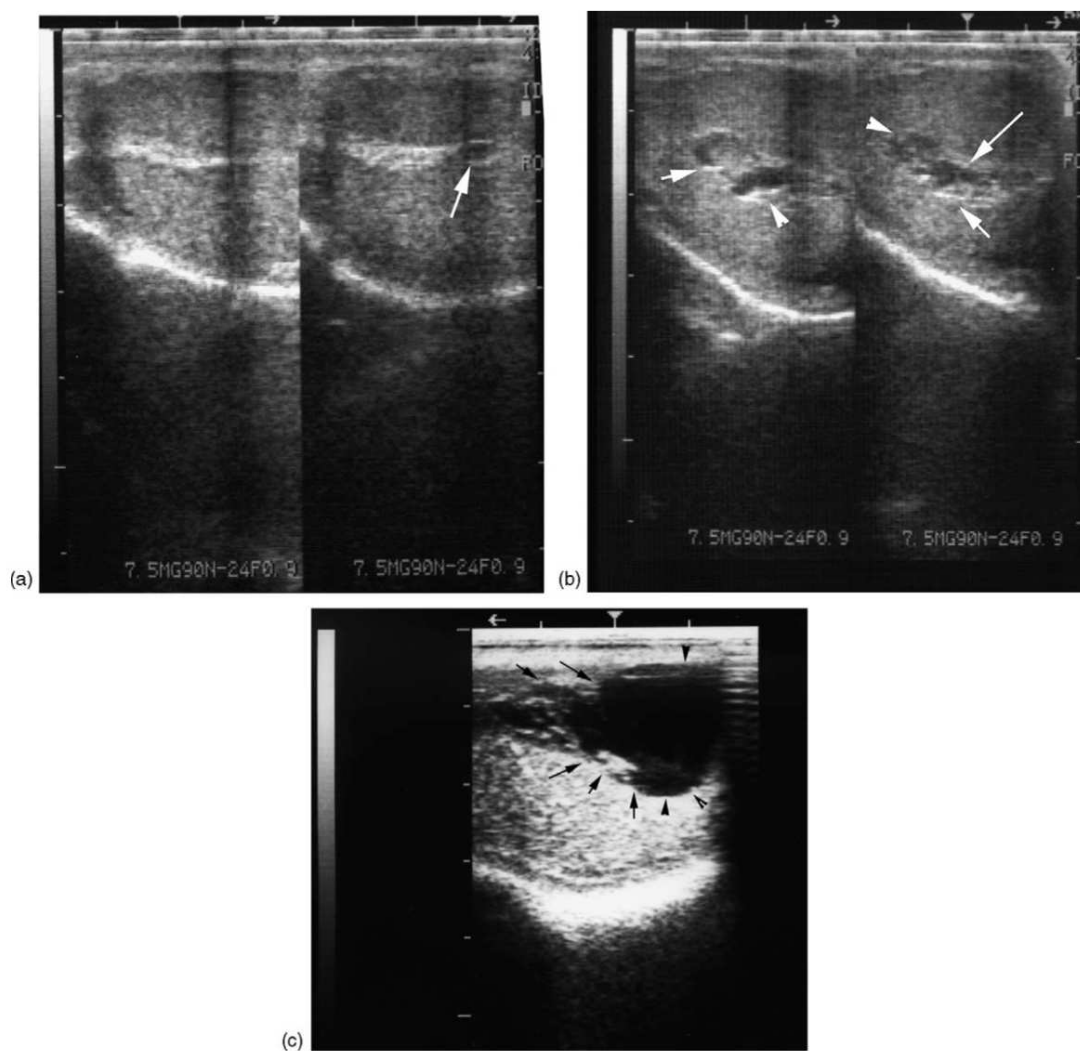


Figura 25: Immagini ecografiche che mostrano le cisti della rete testis: (a-c) testicolo di alpaca che mostra diversi gradi di dilatazione cistica nella rete testis

1.6. Termoregolazione testicolare e problemi collegati allo stress da caldo

Nella maggior parte dei mammiferi la temperatura dei testicoli è inferiore di alcuni gradi rispetto alla temperatura addominale (considerando una temperatura corporea media di 37,7°C - 38,9°C).

Tale differenziazione della temperatura rappresenta un fattore essenziale per il mantenimento di una corretta spermatogenesi e dell'attività riproduttiva del maschio di alpaca, in quanto un'esposizione dei testicoli a temperature maggiori rispetto ai normali standard può portare all'alterazione della funzionalità testicolare con l'interruzione della spermatogenesi e la conseguente insorgenza di una condizione di infertilità temporanea o permanente.

È stato dimostrato che un aumento della temperatura testicolare è correlato ad una variazione dei parametri spermatici, quali la diminuzione del numero di spermatozoi prodotti, la diminuzione degli spermatozoi mobili e viventi e l'aumento del numero di spermatozoi con anomalie morfologiche (Schwalm A. et al., 2007).

Le elevate temperature infatti provocano una diminuzione di circa l'80% della concentrazione spermatica, indipendentemente dalla presenza di lesioni ed anomalie intratesticolari (Stelletta e Oztutar Stelletta, 2016).

Un'adequata temperatura testicolare è mantenuta stabile da una serie di meccanismi fisiologici complessi che coinvolgono lo scroto, i testicoli veri e propri e l'anatomia vascolare delle arterie e delle vene testicolari, infatti la conformazione strutturale dell'arteria testicolare (circondata da un plesso venoso testicolare, chiamato plesso pampiniforme) permette la termoregolazione testicolare attraverso un meccanismo di scambio del calore controcorrente.

Tale capacità di termoregolazione però risulta essere più complessa nei camelidi sudamericani, in quanto la loro conformazione anatomica ed alcune caratteristiche proprie dei testicoli li rende più sensibili a temperature ambientali elevate. Più nello specifico, gli alpaca presentano uno scroto non pendulo e quindi poco sporgente e a stretto contatto con il corpo; questa caratteristica incide in modo diretto sulla temperatura scrotale poiché una variazione della

temperatura corporea interna ha un effetto diretto e rapido sulla temperatura intratesticolare.

Oltre all'alterazione e alla compromissione della spermatogenesi e della qualità del seme prodotto, le elevate temperature ambientali correlate ad un elevato livello di umidità possono portare all'insorgenza di edemi scrotali e prepuziali e allo sviluppo di idrocele grave (ossia un accumulo anomalo di liquido nello scroto, intorno ai testicoli); entrambe patologie che possono risolversi spontaneamente ma che comportano una fase di sterilità di durata variabile (da pochi mesi a più anni).

Queste anomalie del sistema riproduttivo maschile sono state evidenziate nei camelidi sudamericani allevati in ambienti con temperature uguali o superiori ai 29°C per almeno 4 settimane, ovvero temperature molto comuni durante il periodo estivo in molte zone dell'Europa (Tibary A. et al., 2008).

In aggiunta a queste problematiche strettamente correlate all'apparato riproduttivo maschile dei camelidi, temperature elevate possono portare all'insorgenza di una sintomatologia clinica più generale, con sintomi che includono: ipertermia, aumento della salivazione, anoressia, disidratazione, atassia, debolezza muscolare, diminuzione della libido ed alterazione delle componenti biochimiche del plasma seminale (Tabella 7).

Per limitare il più possibile tale condizione di stress termico è fondamentale la tosatura dell'animale, la presenza costante di acqua fresca in abbondanza e di zone d'ombra, accompagnate da sistemi di raffreddamento degli ambienti di allevamento.

Parametro	Normale (12)		Patologico (6)		Media
	Bassa temperatura	Elevata temperatura	Bassa temperatura	Elevata temperatura	
Glucosio (mg/dl)	0.85 ± 0.37	0.85 ± 0.17	1.74 ± 0.71	0.26 ± 0.14	1.02 ± 0.28
Colesterolo (mg/dl)	2.24 ± 0.96	1.11 ± 0.43	2.75 ± 1.68	2.97 ± 1.41	1.96 ± 0.63
Trigliceridi (mg/dl)	14.8 ± 3.99	29.72 ± 13.39	14.78 ± 4.95	41.38 ± 16.68	23.23 ± 7.53
Proteine totali (mg/dl)	1.94 ± 0.6	4.3 ± 1.98	3.91 ± 1.09	6.91 ± 1.02	3.83 ± 1.13
GGT (U/L)	32.6 ± 20.68	122.29 ± 53.72	141.64 ± 52.25	247.13 ± 90.67	115.11 ± 36.38
ALP (U/L)	67.98 ± 43.68	234.28 ± 128.79	184.13 ± 101.8	1142.23 ± 336.13	255.83 ± 118.60
Ca (mg/dl)	11.55 ± 0.91	10.26 ± 2.77	16.38 ± 2.36	13.39 ± 1.54	12.38 ± 1.74
P (mg/dl)	0.28 ± 0.05	0.71 ± 0.31	0.33 ± 0.04	0.63 ± 0.06	0.50 ± 0.17
Mg (mg/dl)	4.45 ± 0.52	2.99 ± 0.44	4.15 ± 0.56	2.54 ± 0.58	3.61 ± 0.4
Creatinina	0.72 ± 0.30	0.59 ± 0.17	0.49 ± 0.03	0.36 ± 0.04	0.58 ± 0.14
Urea	39.83 ± 12.25	40.59 ± 4.70	47.67 ± 6.92	45.97 ± 5.41	42.62 ± 5.27

Tabella 7: Elenco dei parametri biochimici del plasma seminale (in condizioni normali e patologiche) a basse e alte temperature ambientali (Stelletta e Oztutar Stelletta, 2016).

2. OBIETTIVO DELLA RICERCA

Lo scopo di questo studio è quello di analizzare approfonditamente e mettere a confronto le immagini ecografiche dei testicoli di alpaca (*Vicugna pacos*).

In particolare è stata esaminata la tessitura ecogenica testicolare di alpaca di età diverse, mediante analisi delle immagini con il programma ImageJ.

In questo modo è stato possibile studiare l'effetto della degenerazione cistica e della temperatura ambientale sulla tessitura ecogenica dei testicoli e sugli aspetti riproduttivi dei soggetti.

Il progetto di ricerca ha previsto una prima selezione delle immagini ad ultrasuoni e lo studio delle nozioni base sull'anatomia e fisiologia dell'apparato riproduttivo maschile dei camelidi sudamericani; inoltre sono stati studiati i meccanismi di funzionamento delle apparecchiature ecografiche e dei principi fondamentali che le governano.

Le immagini sono poi state analizzate per segnalare eventuali modifiche dell'ecogenicità testicolare in ogni soggetto maschio che ha preso parte allo studio.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Selezione degli individui maschi, raccolta ed analisi delle immagini ecografiche

Per effettuare un'analisi approfondita dei dati raccolti tramite BSE (*Breeding Soundness Evaluation*), riguardanti le lesioni cistiche testicolari negli alpaca maschi, sono state prese in analisi diverse immagini ecografiche provenienti da una raccolta di dati a lungo termine (2010-2018) relativa ai camelidi sudamericani allevati in Italia.

Nella fase iniziale di questo studio sono state selezionate alcune delle immagini derivanti da questa macroraccolta ed in seguito sono state studiate approfonditamente le anomalie intrascrotali ed i dati individuali di ciascun soggetto maschio.

Per questo studio sono stati inizialmente presi in considerazione 45 maschi di età diverse (su un totale di 120) classificati come “riproduttori” e ai quali era stato effettuato un esame completo sulla loro capacità riproduttiva, completo di ecografia scrotale.

Dopo questa prima fase di cernita degli individui d'interesse è stata effettuata una seconda selezione e scrematura dei soggetti maschi che avrebbero preso parte allo studio: infatti sono stati selezionati per l'esame finale 8 maschi provenienti dal nord e dal centro Italia (equivalenti a circa il 20% dei soggetti di partenza), i quali presentavano lesioni cistiche a livello scrotale con conseguente incremento del volume scrotale; più nello specifico i maschi adulti utilizzati come riproduttori presentavano una lesione monolaterale intratesticolare, mentre per tutti i soggetti la maggior parte delle lesioni che portavano ad un aumento del volume testicolare erano localizzate sul testicolo sinistro (Tabella 8).

Tutti i soggetti derivanti da questa seconda selezione erano stati sottoposti ad un esame BSE completo comprendente l'analisi dello sperma ed altri esami diagnostici collaterali (quali l'ecografia delle ghiandole scrotali ed accessorie e

la valutazione della composizione biochimica del plasma seminale), effettuati a due diverse temperature ambientali.

Le temperature ambientali a cui è stata effettuata la valutazione della capacità riproduttiva e della fertilità dei maschi corrispondono ad un valore medio di 22°C (15-30°C) durante il periodo estivo e di 12°C (7-16°C) durante il periodo primaverile.

Da questa suddivisione è emerso che il periodo con temperature maggiori ha avuto un'influenza significativa sull'aumento del volume testicolare (Tabella 9).

ID del maschio	Alpaca	Nome	Età	Tipo
1	Huacaya	Fangio	1.5	Degenerazione cistica RT
2	Huacaya	Valentino	1.5	Degenerazione cistica RT
3	Huacaya	Santi	2.5	Ectasia tubulare/Degenerazione cistica
4	Huacaya	Eddie	2.5	Cisti epididimale
5	Huacaya	Emporio	3	Cisti epididimale
6	Huacaya	Indi	4	Cisti epididimale
7	Huacaya	Newport	6	Ectasia tubulare/Degenerazione cistica
8	Huacaya	Tazio	10	Ectasia tubulare/Degenerazione cistica

Tabella 8: Elenco delle condizioni patologiche dello scroto nei maschi di alpaca, nella quale è indicata l'età dei soggetti ed il tipo di lesione che presentano.

Dai dati riportati in questa tabella si può notare che l'incidenza di degenerazioni cistiche e di ectasie tubulari della rete testis presentano insieme una frequenza del 13,3% nei soggetti maschi, mentre le cisti epididimali rappresentano il 6,67% delle lesioni scrotali.

Parametro	Normale (12)		Patologico (6)	
	Bassa temperatura	Elevata temperatura	Bassa temperatura	Elevata temperatura
Età (anni)	7.5 (5.56-10.58)	7.91 (4.84-13.6)	9.68 (6.40-12.08)	8.92 (5.61-11.37)
BCS	3.2 ± 0.13	3.13 ± 0.17	3 ± 0.25	2.83 ± 0.08
Volume testicolo destro	7.23 ± 1.08	16.69 ± 2.28	10.36 ± 2.08	25.48 ± 4.53
Volume testicolo sinistro	9.45 ± 1.77	18.38 ± 2.39	11.68 ± 1.73	25.45 ± 0.47
Volume (ml)	1.78 ± 0.52	1.10 ± 0.28	1.77 ± 0.14	1 ± 0.5
Viscosità	2	1.67 ± 0.21	2.67 ± 0.33	2.33 ± 0.66
Colore	1.75 ± 0.2	2.33 ± 0.33	2.67 ± 0.66	2.00
Concentrazione (1x10 ⁶ /ml)	46.17 ± 2.08	7.67 ± 2.39	120.83 ± 15.02	43.33 ± 21.86
Motilità (%)	20	16.67 ± 9.19	50.00 ± 5.77	46.33 ± 21.85

Tabella 9: Valore dei parametri valutati (normali e patologici) in condizioni di alta e bassa temperatura ambientale (Stelletta F.O. et al., 2022).

La presenza di un diverso numero di asterischi * indica una differenza significativa tra alta e bassa temperatura in condizioni normali e patologiche.

La lunghezza, la larghezza e lo spessore di entrambi i testicoli sono stati misurati utilizzando dei calibri. Invece il volume testicolare è stato misurato mediante la formula:

$$\text{Volume testicolare} = \text{lunghezza} \times \text{larghezza} \times \text{altezza} \times 0,5236$$

(Stelletta e Oztutar Stelletta, 2016)

Le immagini ecografiche dell'apparato riproduttivo maschile sono state raccolte mediante l'utilizzo di un ecografo con sonda ad array lineare da 10 MHz, ossia una sonda costituita da numerosi elementi piezoelettrici (da 64 a più di 500) disposti in linea, con una lunghezza compresa tra 2,5 e 10 cm, dotata di una frequenza elevata e di un'area di scansione di forma rettangolare (Figura 26).

Tale tipologia di sonda è dotata di una scarsa profondità del campo di vista di circa 6 cm equivalente ad un livello di penetrazione utile prevalentemente per lo studio delle strutture superficiali, in quanto più alta è la frequenza più è superficiale il campo di vista mentre più è bassa la frequenza più è profondo il campo di vista.

Tramite l'utilizzo di questa tipologia di trasduttore è stato possibile esaminare approfonditamente il contenuto scrotale attraverso la suddivisione del testicolo in sezioni sagittali, trasversali e longitudinali.

Invece per quanto riguarda la raccolta delle immagini ecografiche delle ghiandole accessorie è stata effettuata una prima eliminazione manuale delle feci dal retto seguita dall'inserimento della sonda ecografica nell'ano al di sopra della porzione superiore della prostata e delle ghiandole bulbouretrali.

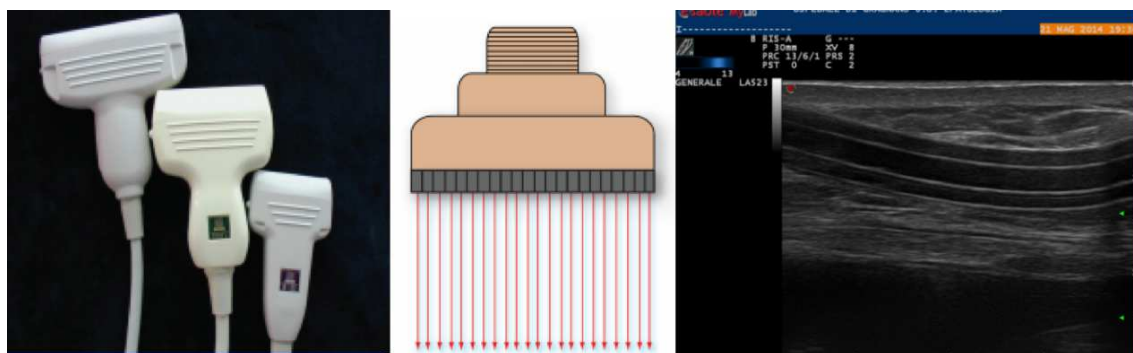


Figura 26: Rappresentazione grafica di una sonda ad array lineare.

Dopo la selezione finale degli 8 soggetti maschi e la raccolta delle immagini ecografiche ad essi associate è stato possibile proseguire con la fase finale dello studio, rappresentata dall'analisi delle immagini e della tessitura ecogenica testicolare degli alpaca mediante l'utilizzo di ImageJ.

ImageJ è un programma informatico di analisi ed elaborazione digitale delle immagini, sviluppato dal National Institutes of Health degli Stati Uniti (NIH).

Tale programma consente di visualizzare, modificare, analizzare, elaborare e salvare immagini a 8 bit, 16 bit e 32 bit; inoltre consente di calcolare l'area e le statistiche dei valori di pixel in sezioni specifiche stabilite dall'utente, permette di misurare distanze ed angoli, è in grado di creare istogrammi di densità e consente la calibrazione della densità o della scala di grigi.

3.2. Metodi di utilizzo del programma ImageJ: nozioni base e comandi utili per l'analisi delle immagini ecografiche

3.2.1. Tipi di immagini

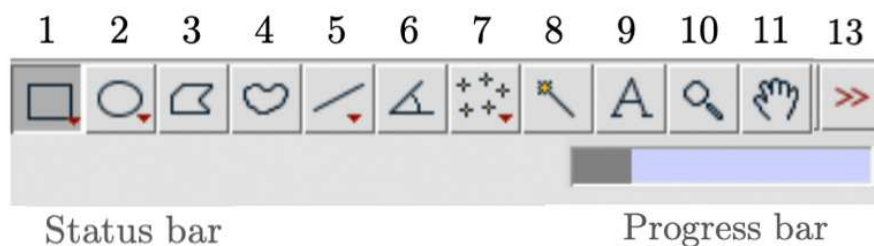
Tutte le immagini digitali sono composte da pixel, ossia singoli componenti più piccoli delle immagini che costituiscono le unità minime d'informazione luminosa e contengono valori numerici che vanno dal bianco al nero (intensità di pixel).

Ogni pixel è composto da un determinato numero di bit; tale numero di bit con il quale viene rappresentato ogni singolo pixel è definito come profondità di colore dell'immagine.

In termini di bit per pixel (bpp) i tipi di immagine di cui ImageJ si occupa sono:

- 8 bit: immagini che possono visualizzare 256 (2^8) livelli di grigio; questa rappresenta la risoluzione più utilizzata in ambito ecografico
- 16 bit: immagini che possono visualizzare 65.536 (2^{16}) livelli di grigio
- 32 bit: immagini che possono visualizzare 4.294.967.296 (2^{32}) livelli di grigio
- Colori RGB: immagini a colori a 24 o 32 bit che possono visualizzare 256 valori nel canale rosso (Red), verde (Green) e blu (Blue).

3.2.2. Barra degli strumenti



- | | | | |
|---|--|----|------------------------|
| 1 | Rectangular Selection Tool and Rounded Rectangular Selection Tool | 8 | Wand Tool |
| 2 | Oval Selection Tool, Elliptical Selection Tool and Brush Selection Tool | 9 | Text Tool |
| 3 | Polygon Selection Tool | 10 | Magnifying Glass |
| 4 | Freehand Selection Tool | 11 | Scrolling Tool |
| 5 | Straight Line Selection Tool, Segmented Line Selection Tool, Freehand Line Selection Tool and Arrow Tool | 13 | <i>More Tools</i> Menu |
| 6 | Angle Tool | | |
| 7 | Point Tool and Multi-point Tool | | |

La barra degli strumenti di ImageJ contiene strumenti utili per selezionare, disegnare, zoomare, scorrere, etc.

Le icone 1, 2, 3 e 4 hanno la funzione di selezionare una specifica area d'interesse e rappresentano rispettivamente uno strumento di selezione rettangolare "*Rectangular selection tool*", uno strumento di selezione circolare "*Oval selection tool*", uno strumento di selezione a forma poligonale "*Polygon selection tool*" (questo consente di creare selezioni di forma irregolare composte da una serie di segmenti in linea) ed infine uno strumento di selezione a mano libera "*Freehand selection tool*" che permette all'utente di disegnare in autonomia la sezione da analizzare.

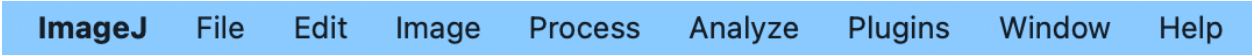
Invece l'icona 5 "*Straight line selection tool*" rappresenta uno strumento di selezione a linea retta, l'icona 6 "*Angle tool*" consente di misurare un angolo definito da tre punti; l'icona 7 "*Point tool*" permette di creare una selezione di punti nell'immagine da selezionare (utile per contare diversi elementi o per

registrare le coordinate dei pixel) e l'icona 8 "*Wand tool*" permette di selezionare oggetti o elementi di colore uniforme.

Oltre a questi elementi di analisi, esistono anche comandi più generali come l'icona 9 "*Text tool*" che consente di inserire annotazioni, frasi e lettere nell'immagine in analisi, l'icona 10 "*Magnifying glass*" che consente di zoomare l'immagine, oppure l'icona 11 "*Scrolling tool*" che consente di spostarsi all'interno dell'immagine mantenendo lo stesso livello di ingrandimento della figura.

A questi comandi se ne aggiungono altri (icona 13 "*More tools menu*"), selezionabili dall'utente in base alle sue necessità ed in base al tipo di immagine che deve analizzare.

3.2.3. Comandi del menu

A horizontal menu bar with a light blue background. It contains ten items: "ImageJ", "File", "Edit", "Image", "Process", "Analyze", "Plugins", "Window", and "Help". The text is in a black, sans-serif font.

La barra dei menù compare una volta aperto il programma informatico ed elenca tutti i comandi di ImageJ.

Questi comandi generali sono organizzati in otto menù:

1. File: permette di compiere operazioni di base sui file, come apertura, salvataggio in diversi formati, importazione, stampa e creazione di nuove immagini.
2. Edit: permette di compiere operazioni di modifica e disegno, eliminazione del colore di sfondo ed eliminazione dell'area al di fuori dell'elemento selezionato nell'immagine; nonché impostazioni globali come taglia, copia e incolla.
3. Image: permette di convertire e modificare le immagini. Questo comando è composto a sua volta da un sottomenu estremamente ampio che consente di determinare il tipo di immagine attiva o modificarla in un'altra tipologia di immagine (8 bit, 16 bit, 32 bit o RGB), consente di regolare la luminosità, il contrasto di colori, i livelli di soglia e le dimensioni dell'immagine.

Inoltre permette di visualizzare e impostare varie proprietà dell'immagine, duplicare, zoomare e trasformare l'immagine.

4. **Process**: consente di elaborare le immagini e comprende anche le operazioni sui punti, i filtri e le operazioni aritmetiche tra più immagini.
5. **Analyze**: permette di effettuare misurazioni statistiche sui dati dell'immagine, consente la creazione di istogrammi ed altre operazioni relative all'analisi delle immagini.
6. **Plugins**: questa sezione della barra del menù contiene comandi per la creazione, la modifica e la gestione dei componenti aggiuntivi.
7. **Window**: permette la selezione e la gestione delle finestre aperte.
8. **Help**: questa sezione riguarda gli aggiornamenti e le informazioni generali sulla versione del programma.

3.2.4. *Miglioramento dell'immagine*

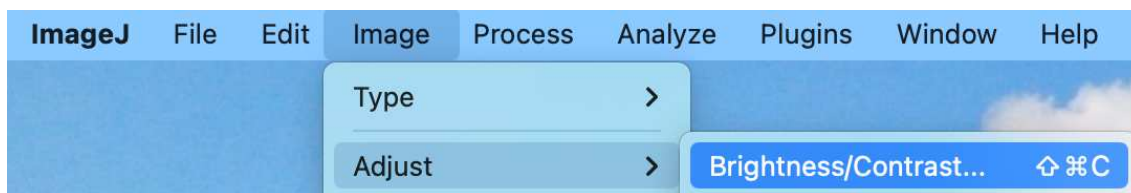
Il primo aspetto da prendere in considerazione nell'analisi delle ecografie è il miglioramento della qualità dell'immagine, che consente di variare la luminosità, il contrasto ed eventualmente il rumore (ossia la variazione non desiderata che porta ad alterazioni della luminosità, del colore ed ostacola la misura del contrasto).

Il primo passaggio consiste nell'acquisizione dell'immagine da analizzare attraverso il menu *File > Open* e nella successiva conversione di tale immagine nel formato desiderato.

Una volta selezionata ed aperta l'immagine ecografica desiderata appare al di sopra di essa una riga di informazioni (come il numero di pixel e il numero di bit per pixel) ed è fondamentale convertire tutte le immagini in 8 bit attraverso il sottomenu *Image > Type*, in modo tale da poter suddividere l'intensità del segnale in una scala di 256 valori di grigio.

Successivamente è possibile proseguire con la regolazione della luminosità e del contrasto attraverso il comando *Brightness/Contrast* (dal menu *Image > Adjust > Brightness/Contrast*), strumento che consente di modificare l'immagine manualmente o in modo automatico attraverso l'ottimizzazione

automatica della luminosità e del contrasto in base all'analisi dell'istogramma dell'immagine.



3.2.5. Creazione dell'istogramma

Per effettuare l'analisi della tessitura ecogenica delle diverse regioni anatomiche d'interesse è fondamentale la creazione di un istogramma.

L'istogramma è un grafico bidimensionale che riporta sull'asse x il numero di valori del livello di grigio (ossia la scala di grigi) e sull'asse y la frequenza dei pixel (ovvero la quantità di pixel presenti all'interno dell'immagine per quel determinato livello di grigio), quindi consente di avere una lettura immediata, obiettiva e scientifica della luminosità dell'immagine e della qualità del contrasto.

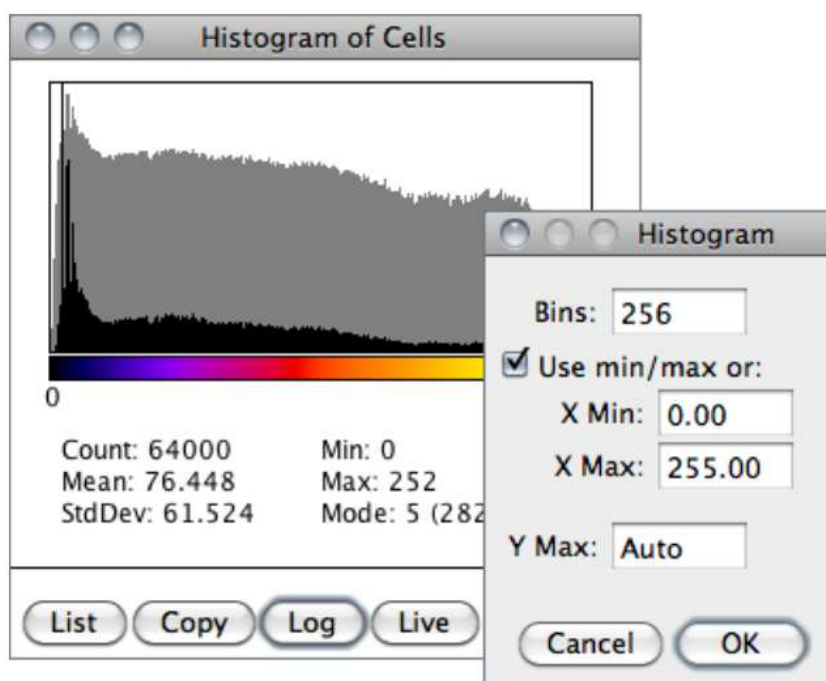
Tale rappresentazione grafica mediante diagramma raffigura in maniera schematica in che modo sono distribuiti i pixel scuri e luminosi in un'immagine digitale, in quanto in ciascuna immagine ogni singolo pixel ha una specifica luminosità a cui viene attribuito un valore numerico compreso tra 0 e 255 (dove 0 corrisponde al nero e 255 al colore bianco).

Lungo l'asse orizzontale viene mostrato il numero dei pixel per ciascun valore tonale; partendo da sinistra si hanno i valori relativi alle ombre, ai mezzi toni e alle luci (infatti all'estrema sinistra si ha il nero perfetto mentre all'estrema destra si ha il bianco perfetto).

Per ottenere un istogramma dell'immagine oggetto di studio è necessario convertire l'immagine in formato 8 bit e selezionare l'area di cui si vuole ottenere il diagramma (la selezione della sezione d'interesse può essere effettuata mediante l'utilizzo dei diversi strumenti di selezione: selezione rettangolare, circolare, poligonale e a mano libera).

Dopo la selezione dell'area si può proseguire con la vera e propria creazione dell'istogramma attraverso il sottomenu *Analyze > Histogram*, che consente di ottenere il diagramma rappresentante la gamma tonale dell'immagine al di sotto del quale vengono riportati alcuni valori rilevanti nell'analisi della scala dei grigi, ovvero il conteggio totale dei pixel presenti (*Count*), il valore medio della scala dei grigi (*Mean*), la deviazione standard (*StdDev*), il valore di grigio minimo (*Min*), massimo (*Max*) e la moda (*Mode*, ossia il valore che si presenta con maggiore frequenza).

Per salvare i dati ottenuti è sufficiente cliccare sul comando Copia (*Copy*) e poi riportarli su un foglio Excel, mentre il comando *Log* consente di visualizzare una versione dell'istogramma in scala logaritmica (sovrapposta in grigio) ed il comando *Live* permette di monitorare la variazione dei valori durante lo spostamento del mouse all'interno della finestra dell'istogramma.



Nel caso dell'analisi della tessitura ecogenica dei testicoli di alpaca sono stati presi in considerazione gli istogrammi di diverse sezioni: per ogni soggetto maschio che ha preso parte a questo studio sono stati messi a confronto il testicolo sano privo di anomalie patologiche con il testicolo patologico ed il mediastino normale con il mediastino patologico.

3.2.6. Trascrizione e analisi statistica dei dati ottenuti

I dati ottenuti da ciascun istogramma sono poi stati trascritti su un foglio Excel e sono stati suddivisi a seconda del soggetto maschio, della sezione in analisi (parenchima o mediastino) e della condizione patologica di tale sezione (normale o patologico).

I dati relativi ai PGI (Pixel Gray Intensity) normali e patologici dell'intero testicolo, del mediastino e del parenchima testicolare sono stati comparati attraverso l'utilizzo di ANOVA ad una via, utilizzando la procedura GLM del software SIGMASTAT 2.03 e considerando la condizione patologica (normale vs degenerazione cistica) come variabile indipendente ed i valori di PGI dell'intero testicolo, del mediastino e del parenchima come variabili dipendenti.

4. RISULTATI

4.1. Istogrammi legati alla degenerazione cistica testicolare

I primi due casi (Caso 1: Fangio, Caso 2: Valentino) di cui sono state analizzate le immagini ecografiche attraverso l'utilizzo del programma ImageJ sono due giovani maschi di un anno e mezzo discendenti dallo stesso padre, entrambi che presentano una degenerazione cistica del mediastino testicolare sinistro.

Le ecografie di entrambi i soggetti sono state effettuate nel periodo estivo (giugno) e sono state suddivise in una sezione longitudinale sinistra, una sezione longitudinale destra ed una sezione trasversale.

Dall'immagine della sezione trasversale dei testicoli è stato possibile analizzare e mettere a confronto mediante istogramma il testicolo ed il mediastino testicolare sano e privo di alterazioni con il testicolo patologico con degenerazione cistica.

Dall'istogramma del testicolo destro (ovvero il testicolo normale non patologico) e del testicolo sinistro (testicolo patologico) è possibile evidenziare una diversa ecogenicità nelle diverse sezioni testicolari (Tabella 10).

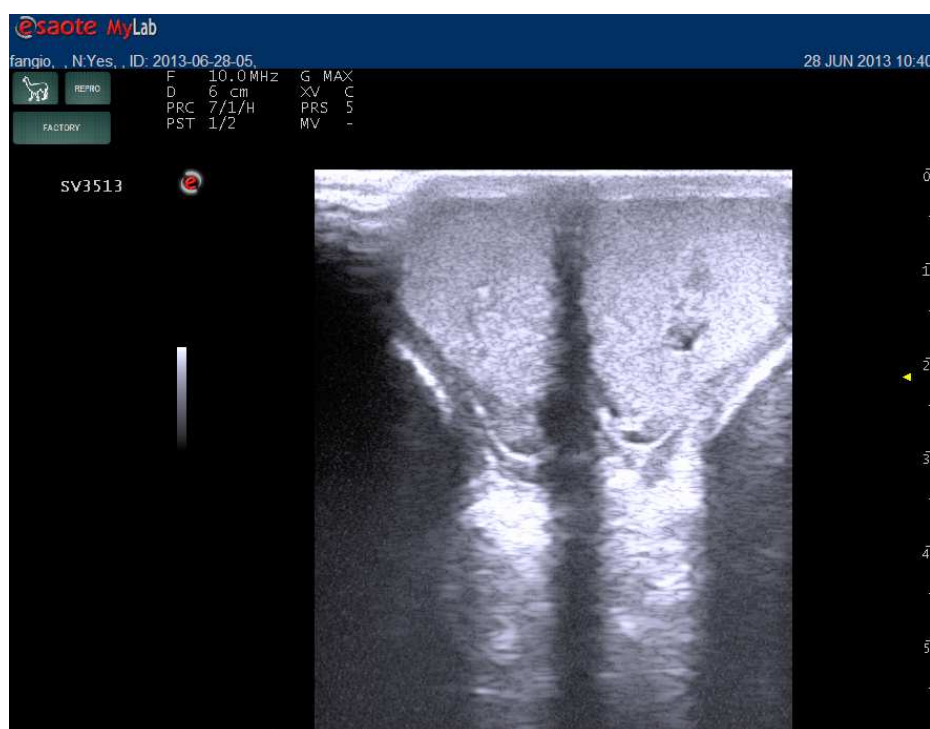
Male name	Sezione	Condizione	Media	Dev.st.	Moda	valore max	valore min
Fangio	parenchima	normale	176,521	27,21	150	248	104
	parenchima	patologico	162,639	32,828	150	254	35
	mediastino	normale	187,748	23,326	188	243	130
	mediastino	patologico	169,011	34,682	183	254	75
Valentino	parenchima	normale	185,428	30,366	150	254	89
	parenchima	patologico	145,946	34,822	142	254	30
	mediastino	normale	200,768	22,612	203	244	120
	mediastino	patologico	167,986	46,554	234	254	57

Tabella 10: File excel dei casi 1 e 2, dove sono riportati i principali valori d'interesse (media, deviazione standard, moda, valore minimo e valore massimo della scala dei grigi)

Il parenchima del testicolo sano del Caso 1 presenta un'ecogenicità normale e non alterata con un istogramma spostato verso il lato destro, ossia verso i valori di grigio più elevati e vicini al valore massimo 255 (corrispondente al colore bianco); tale istogramma presenta un valore medio di 176.52 con una deviazione standard (s) equivalente a 27.20 (176.52 ± 27.20) ed un valore minimo e massimo rispettivamente di 104 e 248.

Il parenchima del testicolo patologico invece presenta un istogramma con una distribuzione più ampia lungo l'asse delle ascisse, con un valore medio della scala dei grigi di 162.64 (± 32.83), un valore massimo di 254 ed un valore minimo di 35 (nettamente inferiore rispetto a quello evidenziato nel testicolo sano) (Grafico 1).

Una differenza maggiore dell'istogramma e dei dati ad esso correlati si evidenzia nell'analisi del mediastino testicolare, che presenta una tessitura ecogenica maggiormente differenziata. Il mediastino destro normale è caratterizzato da un grafico spostato verso destra, con un valore medio di 187.75 (± 23.33) ed un valore massimo e minimo di 243 e 130; al contrario il mediastino affetto da degenerazione cistica presenta un valore medio di 169.01, una deviazione standard di 34.68 ed un valore massimo di 254 e minimo di 75 (Grafico 2).



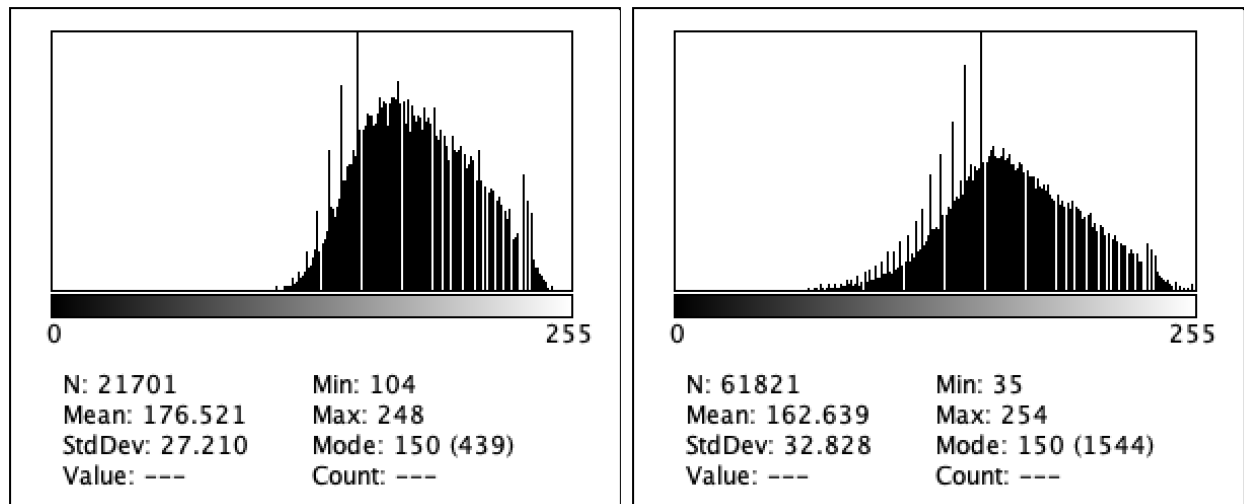


Grafico 1: Istogrammi dei testicoli del Caso 1 (Fangio).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

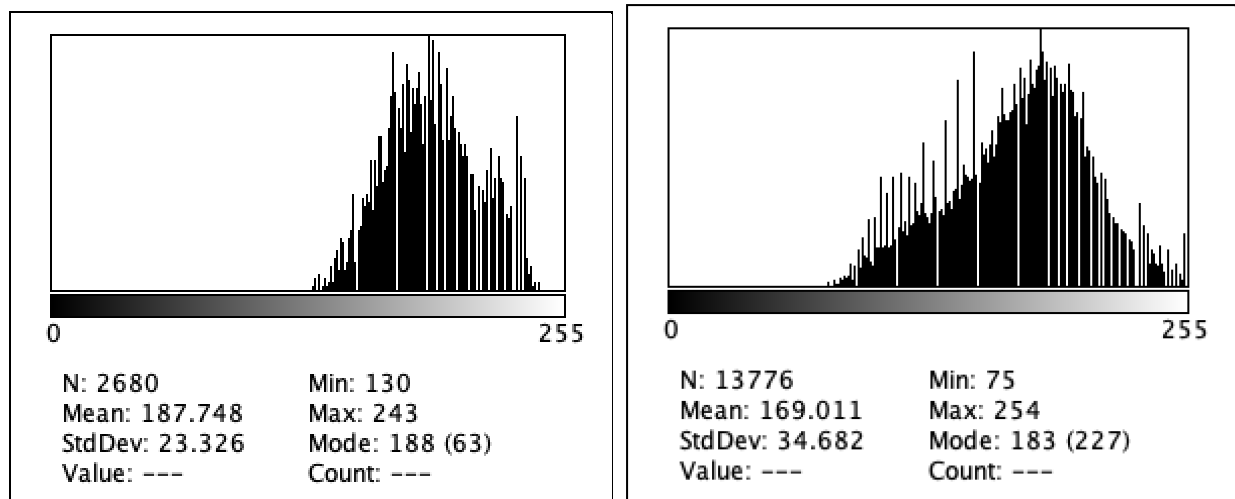


Grafico 2: Istogrammi del mediastino del Caso 1 (Fangio).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

Il Caso 2 presenta un'ecogenicità e un andamento dell'istogramma molto simili al soggetto precedente. Nello specifico il parenchima testicolare sano è rappresentato da un valore medio della scala dei grigi di 185.43 (± 30.37) con un valore massimo di 254 ed un valore minimo di 89; mentre il parenchima patologico presenta un valore medio di 145.95 (± 34.82) ed un valore massimo e minimo di 254 e 30 (Grafico 3).

Una notevole differenza dell'ecogenicità si evidenzia nell'analisi del mediastino, che presenta un valore medio di 200.77 (± 22.61) nel caso del testicolo sano e di 167.99 (± 46.55) nel caso del testicolo con degenerazione cistica (Grafico 4).



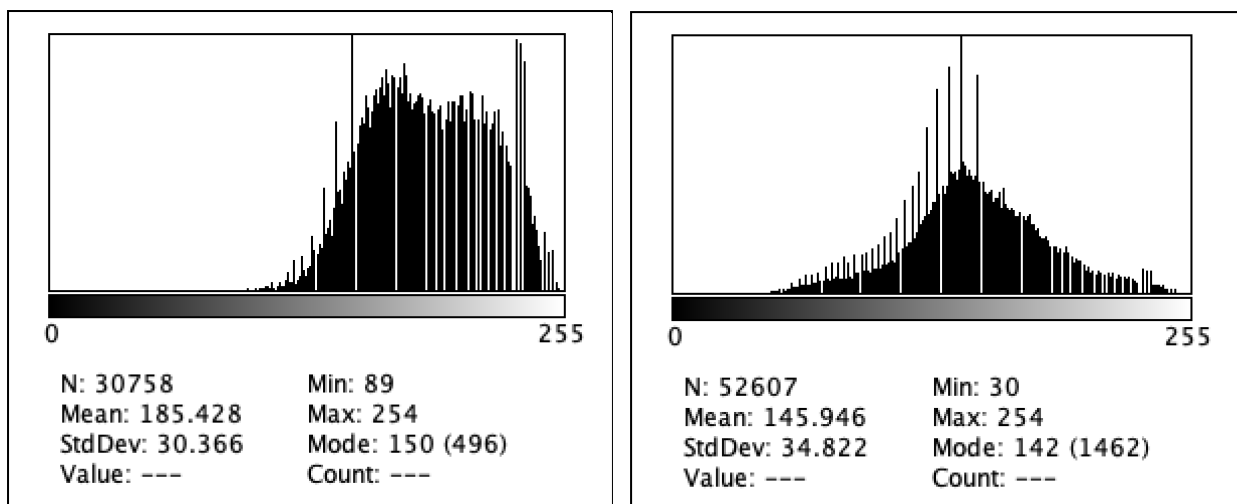


Grafico 3: Istogrammi dei testicoli del Caso 2 (Valentino).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

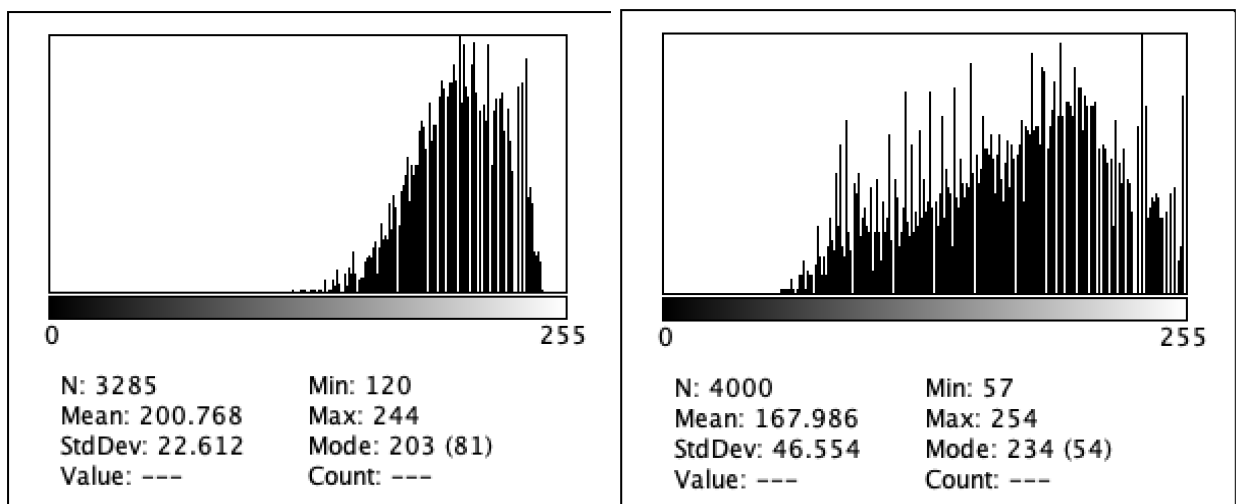


Grafico 4: Istogrammi del mediastino del caso 2 (Valentino).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

L'alterazione della tessitura ecogenica testicolare negli alpaca maschi, in seguito all'insorgenza di degenerazioni cistiche a livello dell'apparato riproduttivo, assume un andamento molto simile in tutti gli altri soggetti maschi che hanno preso parte allo studio.

Nello specifico in tutti i soggetti analizzati è evidenziabile una differenziazione degli istogrammi ottenuti dall'analisi del parenchima testicolare/mediastino sano e del parenchima/mediastino affetto da alterazioni patologiche della struttura anatomica (Tabella 11, Figura 27-32, Grafico 5-18).

Nome	Sezione	Condizione	Media	Dev.st.	Moda	valore max	valore min
Fangio	parenchima	normale	176,521	27,21	150	248	104
	parenchima	patologico	162,639	32,828	150	254	35
	mediastino	normale	187,748	23,326	188	243	130
	mediastino	patologico	169,011	34,682	183	254	75
Valentino	parenchima	normale	185,428	30,366	150	254	89
	parenchima	patologico	145,946	34,822	142	254	30
	mediastino	normale	200,768	22,612	203	244	120
	mediastino	patologico	167,986	46,554	234	254	57
Santi	parenchima	normale	170,629	28,073	150	253	22
	parenchima	patologico	116,289	18,662	125	180	36
	mediastino	normale	177,932	21,919	193	234	98
	mediastino	patologico	105,363	22,696	110	180	42
Indi	parenchima	normale	101,101	22,623	103	233	31
	parenchima	patologico	45,985	26,817	18	228	1
	mediastino	normale	99,809	17,748	110	144	46
	mediastino	patologico	35,289	22,052	22	223	1
Newport	parenchima	normale	110,429	26,808	107	254	28
	parenchima	patologico	89,654	31,944	93	254	0
	mediastino	normale	101,006	21,206	93	180	35
	mediastino	patologico	56,608	33,705	52	254	0
Tazio	parenchima	normale	153,237	31,856	150	254	26
	parenchima	patologico	139,707	23,626	136	234	36
	mediastino	normale	170,496	26,09	150	248	107
	mediastino	patologico	140,426	19,81	142	227	75
Emporio	parenchima	normale	139,033	22,926	136	232	68
	parenchima	patologico	117,45	25,547	110	220	36
	mediastino	normale	150,778	12,298	150	182	116
	mediastino	patologico	126,939	14,361	121	168	83
Eddie	parenchima	normale	161,94	28,814	150	254	35
	parenchima	patologico	173,918	35,458	150	254	46
	mediastino	normale	199,23	32,575	246	252	125
	mediastino	patologico	155,9	17,955	150	210	103

Tabella 11: File excel di tutti i soggetti, dove sono riportati i principali valori d'interesse

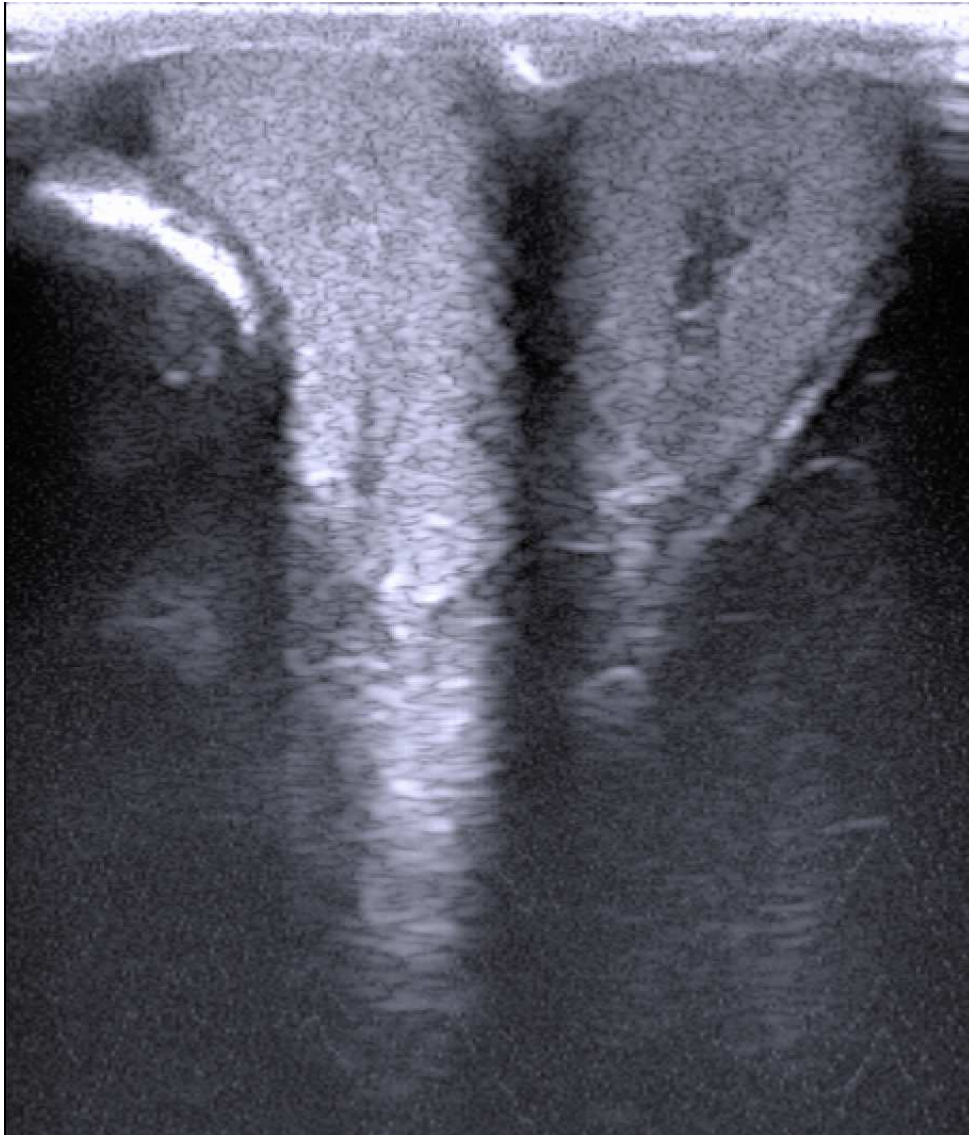


Figura 27: Immagine ecografica della sezione trasversale dei testicoli del Caso 3 (Santi). Il soggetto presenta ectasia tubulare/degenerazione cistica monolaterale della rete testis

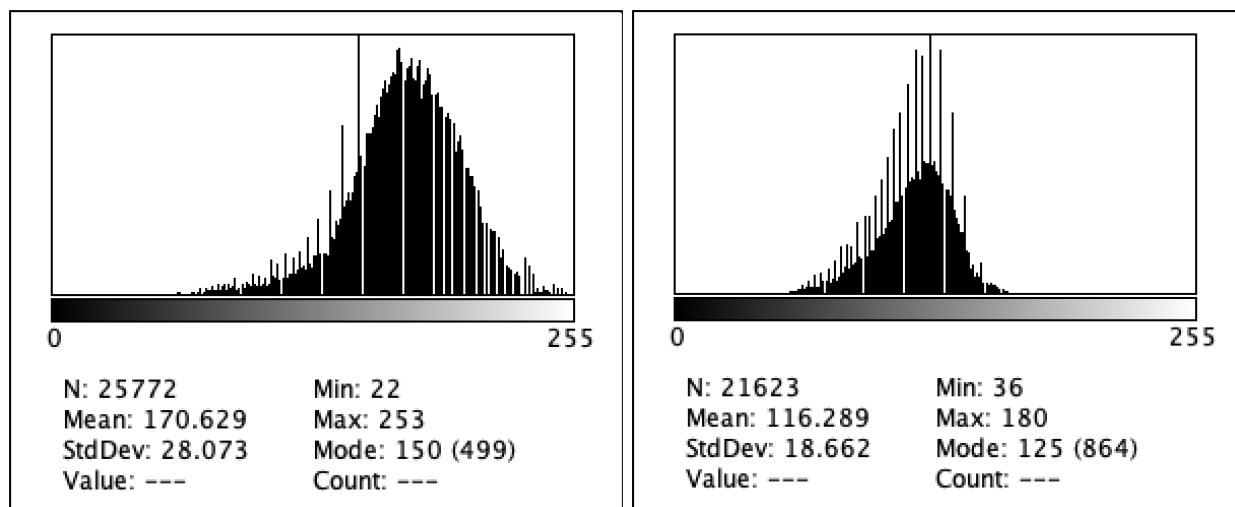


Grafico 5: Istogrammi dei testicoli del Caso 3 (Santi).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

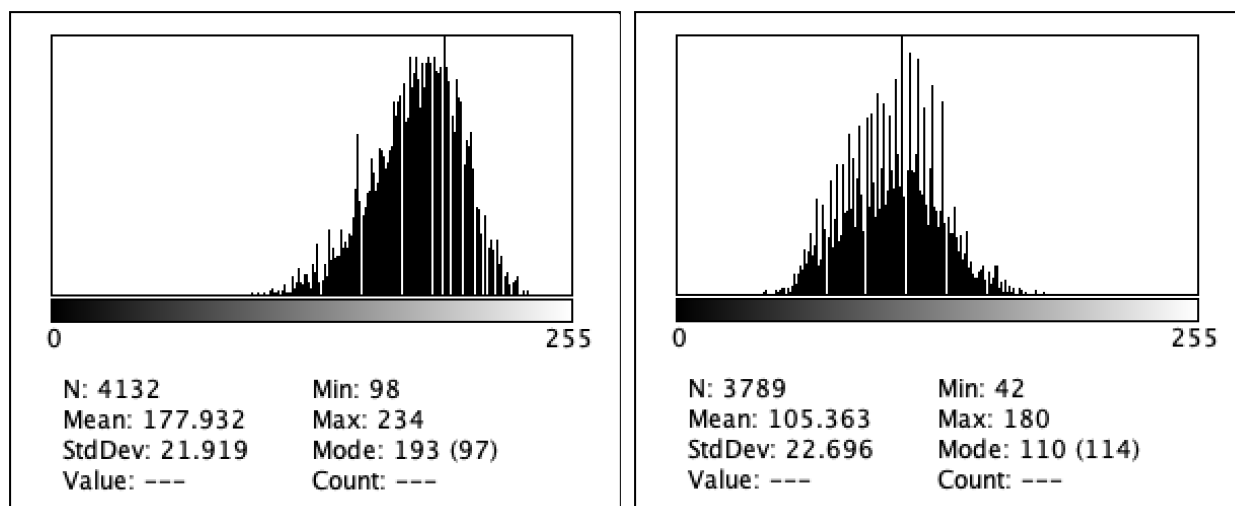


Grafico 6: Istogrammi del mediastino del Caso 3 (Santi).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

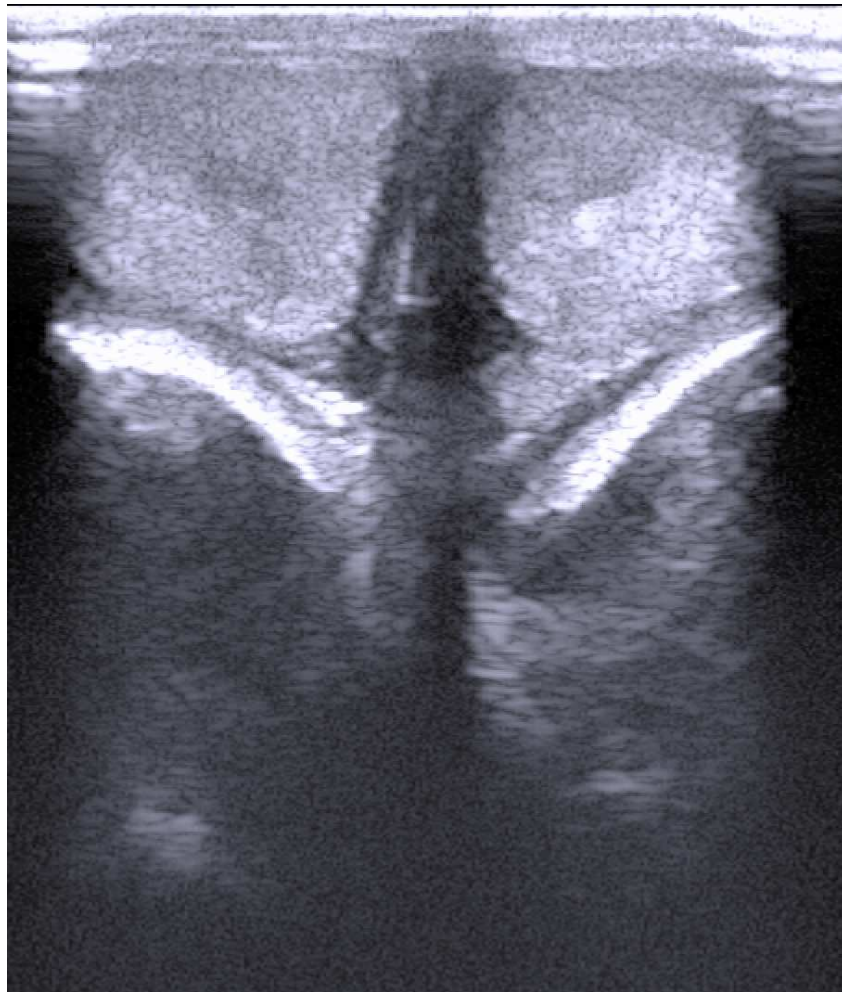


Figura 28: Immagini ecografiche della sezione trasversale e longitudinale dei testicoli del Caso 4 (Eddie). Il soggetto presenta una cisti epididimale ed un aumento dell'ecogenicità del mediastino testicolare sinistro

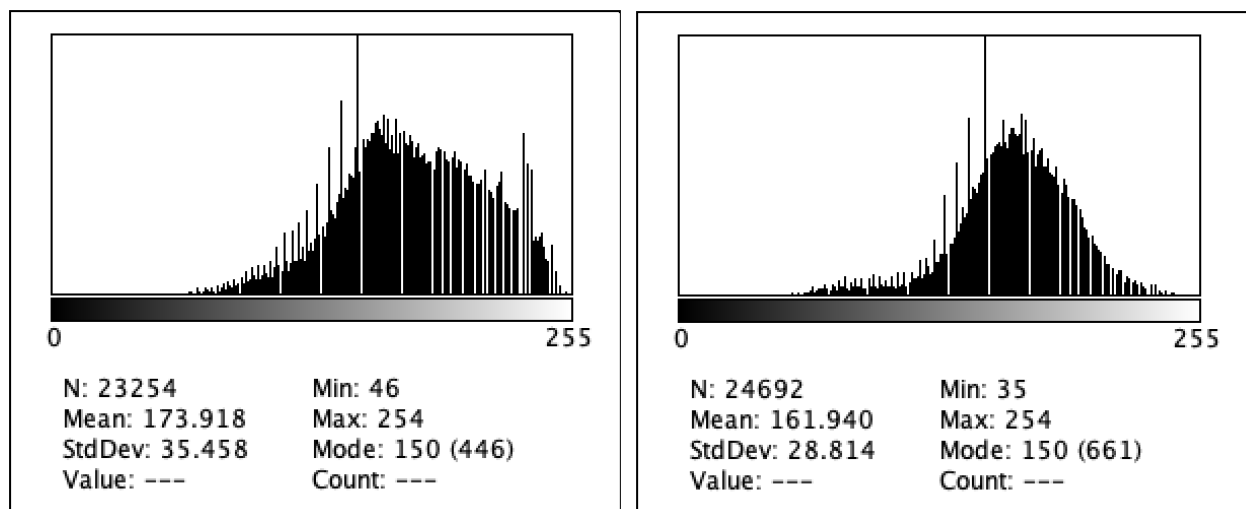


Grafico 7: Istogrammi dei testicoli del Caso 4 (Eddie).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

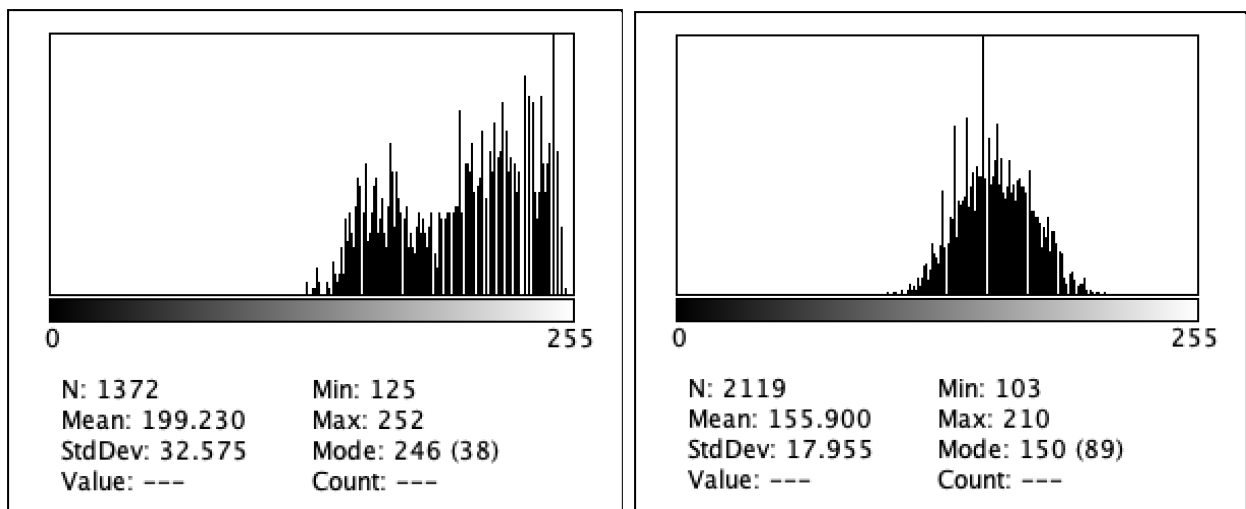


Grafico 8: Istogrammi del mediastino del caso 4 (Eddie).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

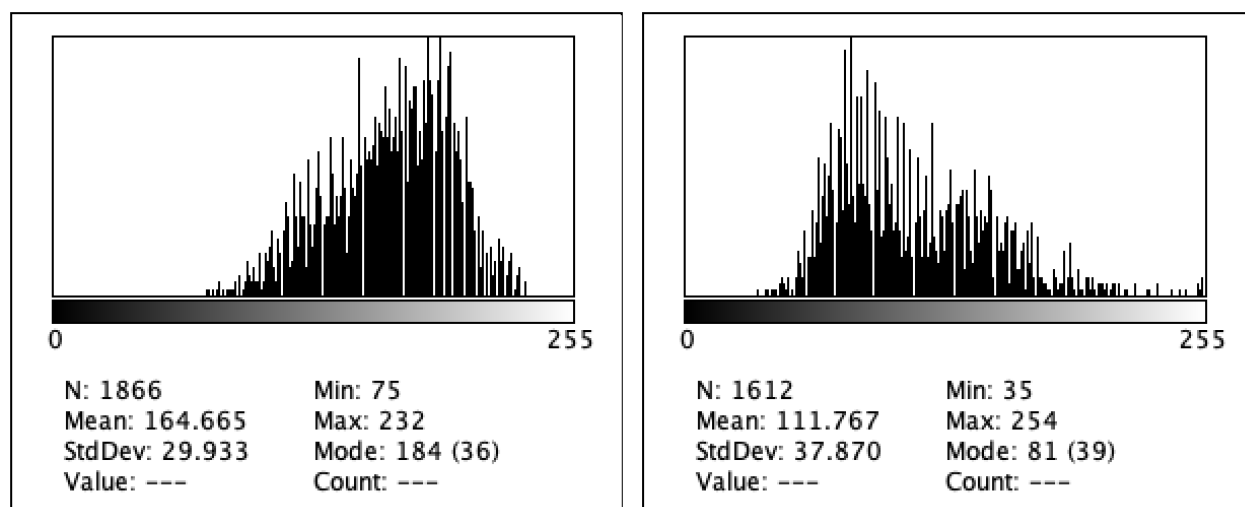


Grafico 9: Istogrammi della sezione epididimale del Caso 4 (Eddie).
L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma dell'epididimo normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma dell'epididimo patologico con cisti.



Figura 29: Immagine ecografica della sezione trasversale dei testicoli del Caso 5 (Emporio). Il soggetto presenta una cisti epididimale

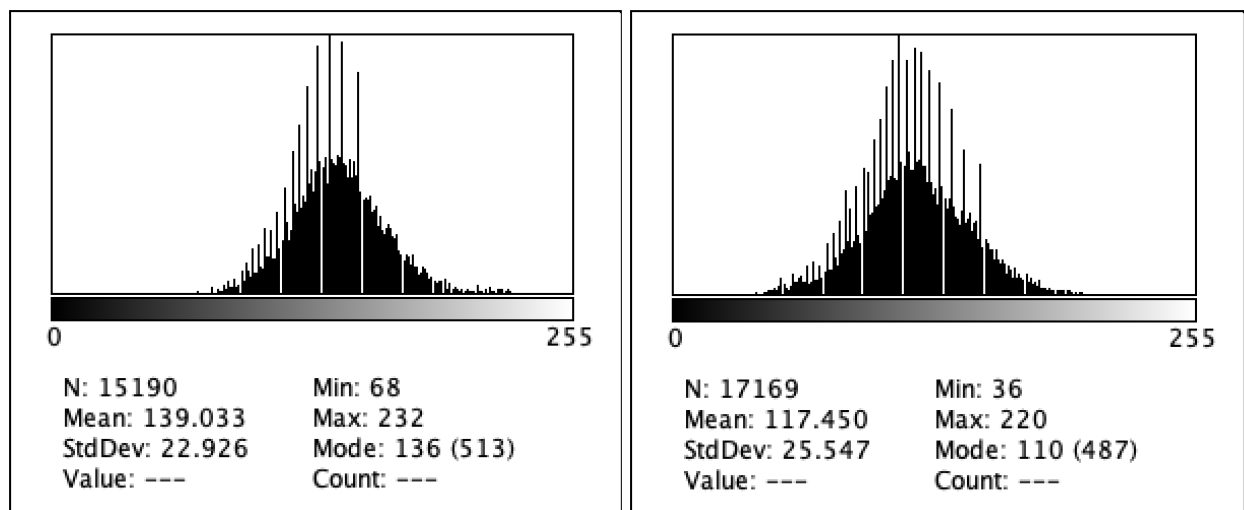


Grafico 10: Istogrammi dei testicoli del Caso 5 (Emporio).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

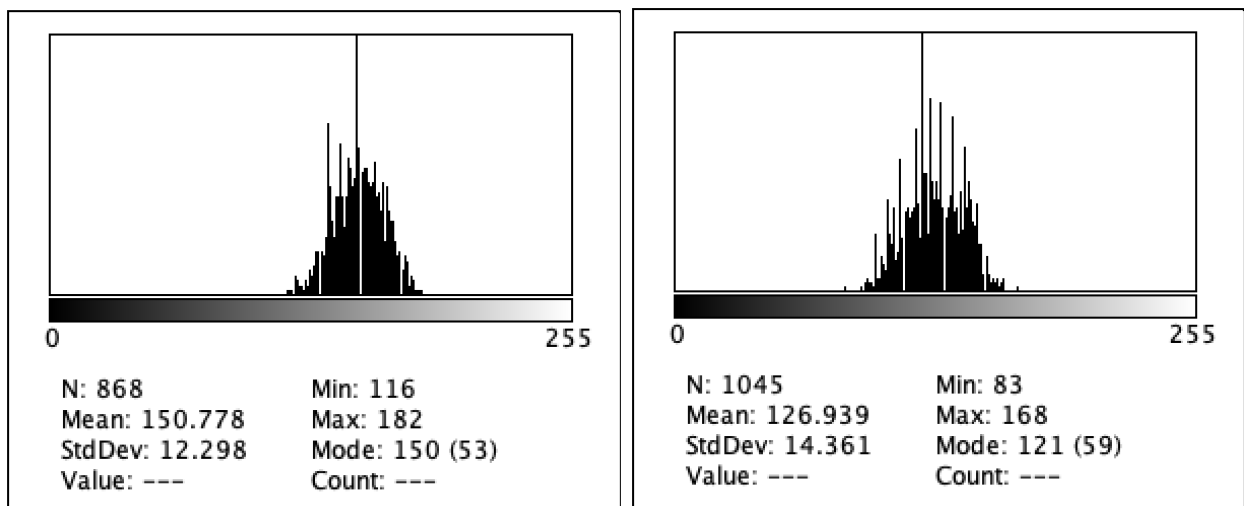


Grafico 11: Istogrammi del mediastino del Caso 5 (Emporio).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.



Figura 30: Immagine ecografica del testicolo del Caso 6 (Indi). Il soggetto presenta una degenerazione completa del testicolo

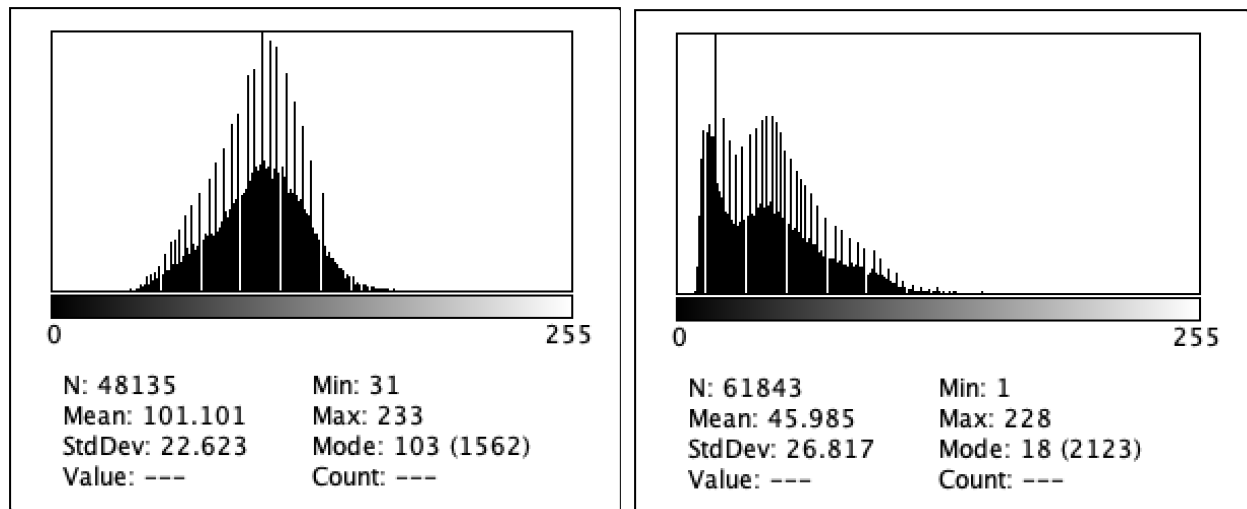


Grafico 12: Istogrammi dei testicoli del Caso 6 (Indi).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

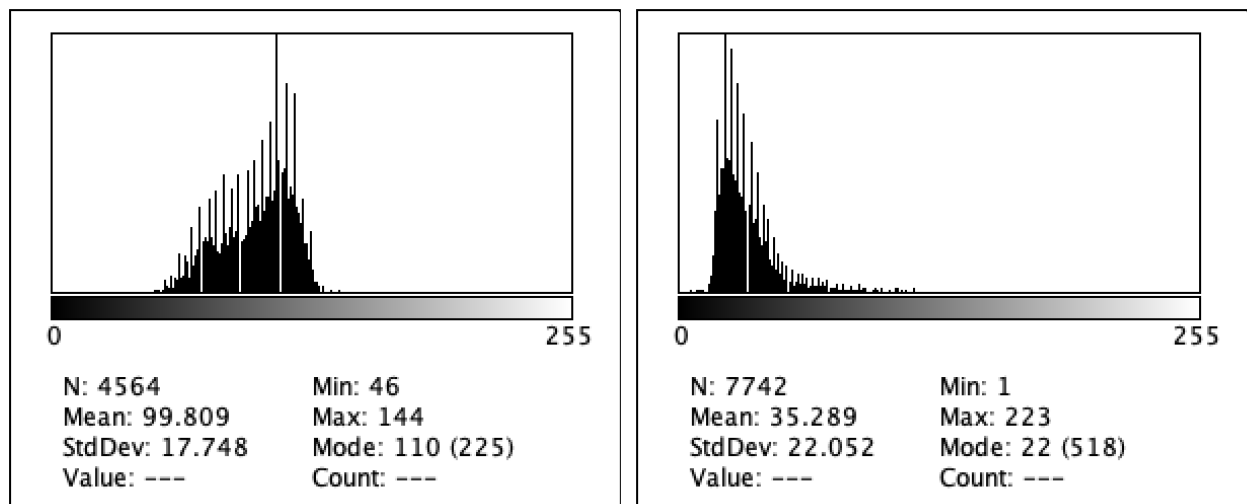


Grafico 13: Istogrammi del mediastino del Caso 6 (Indi).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

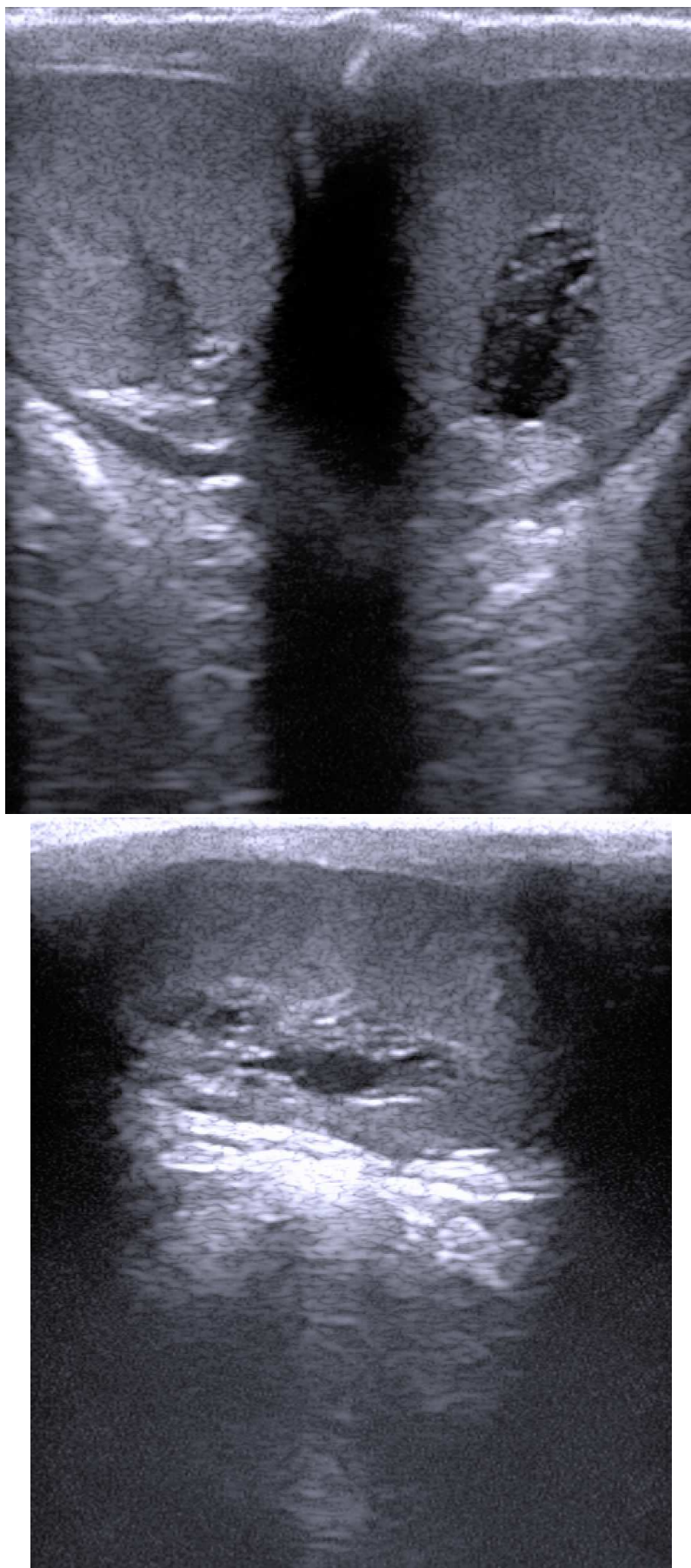


Figura 31: Immagini ecografiche della sezione trasversale e longitudinale dei testicoli del Caso 7 (Newport). Il soggetto presenta una degenerazione cistica monolaterale

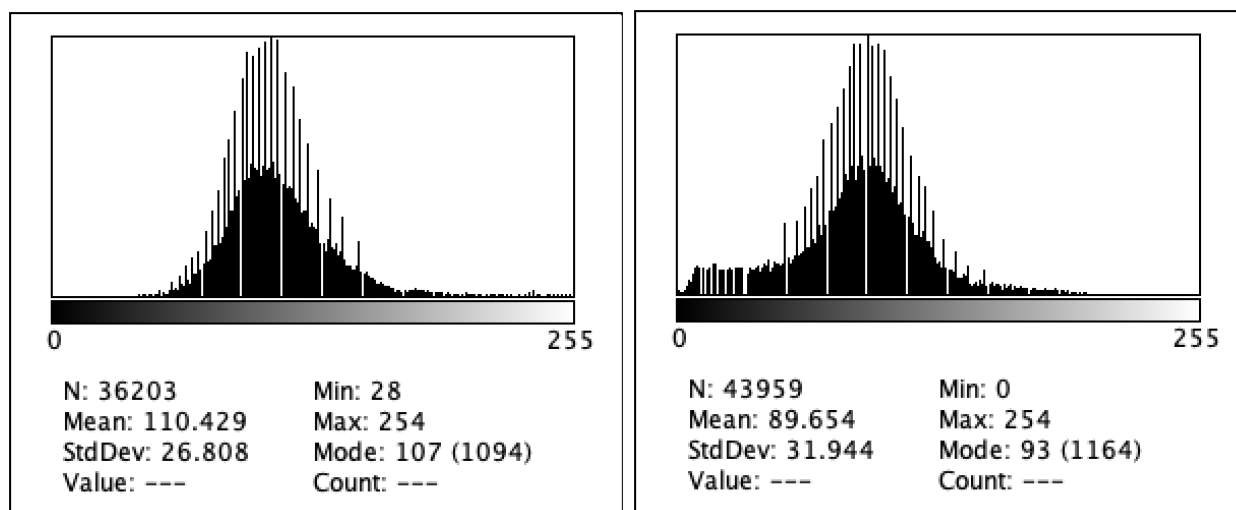


Grafico 14: Istogrammi dei testicoli del Caso 7 (Newport).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

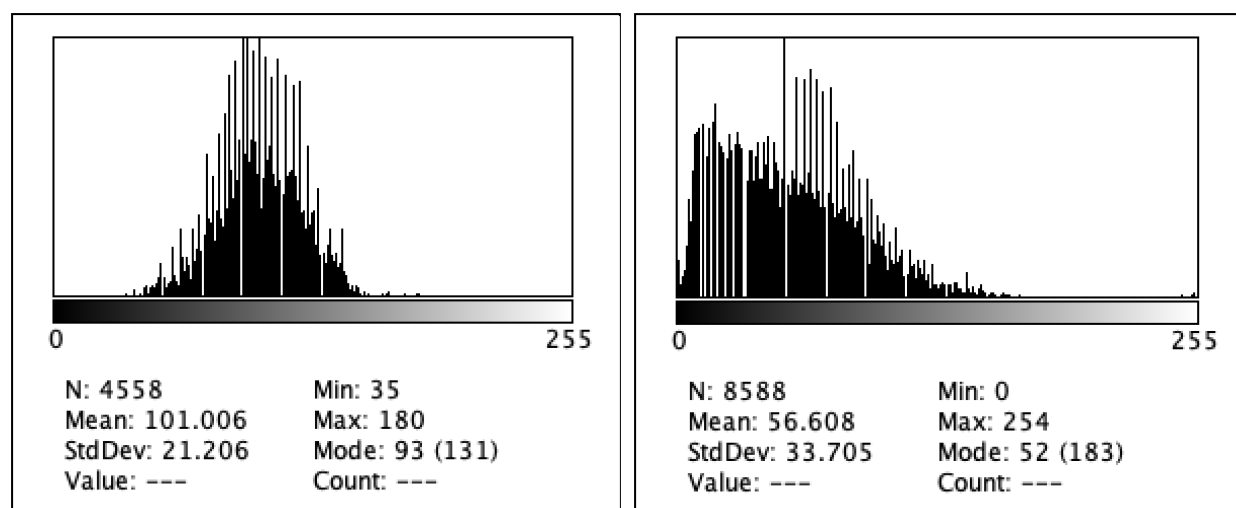


Grafico 15: Istogrammi del mediastino del Caso 7 (Newport).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

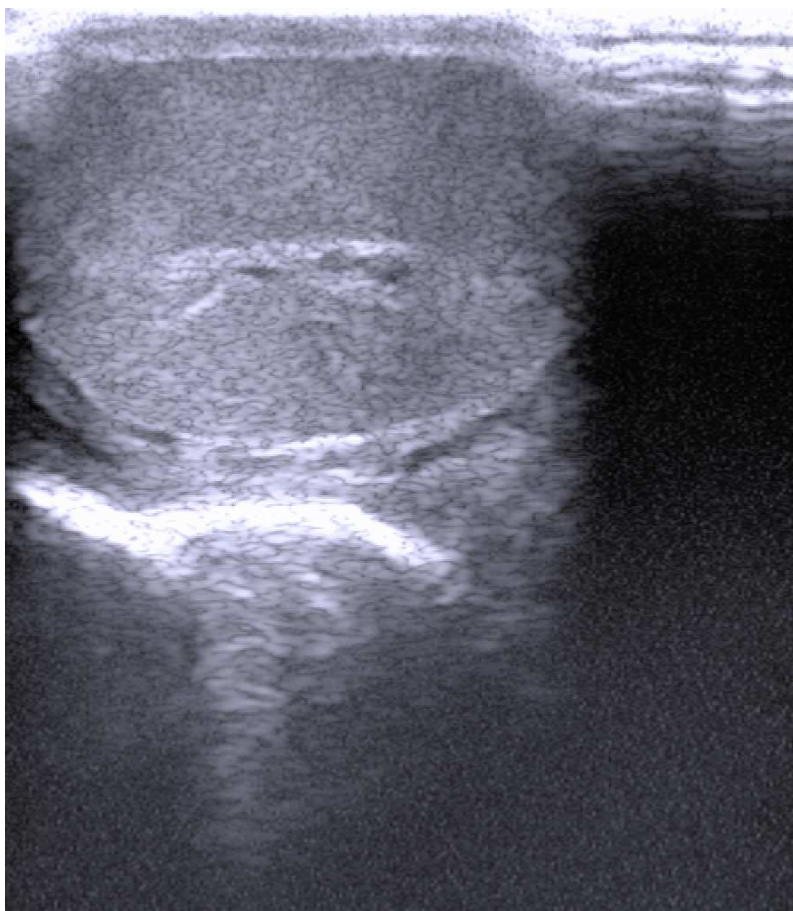


Figura 32: Immagini ecografiche della sezione trasversale e longitudinale dei testicoli del Caso 8 (Tazio). Il soggetto presenta una degenerazione cistica monolaterale

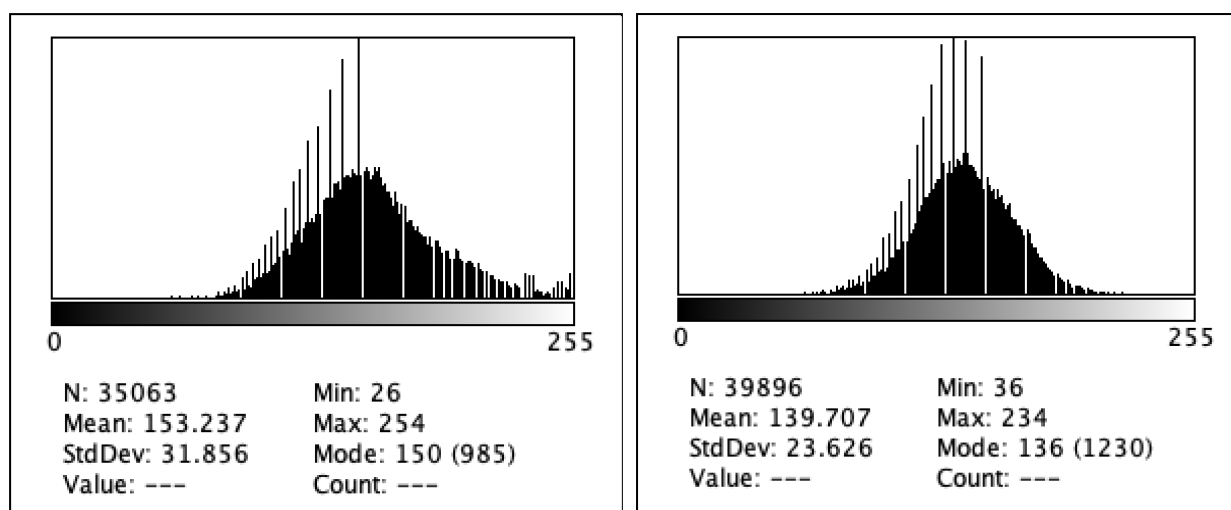


Grafico 16: Istogrammi dei testicoli del Caso 8 (Tazio).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del parenchima normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del parenchima patologico con degenerazione cistica.

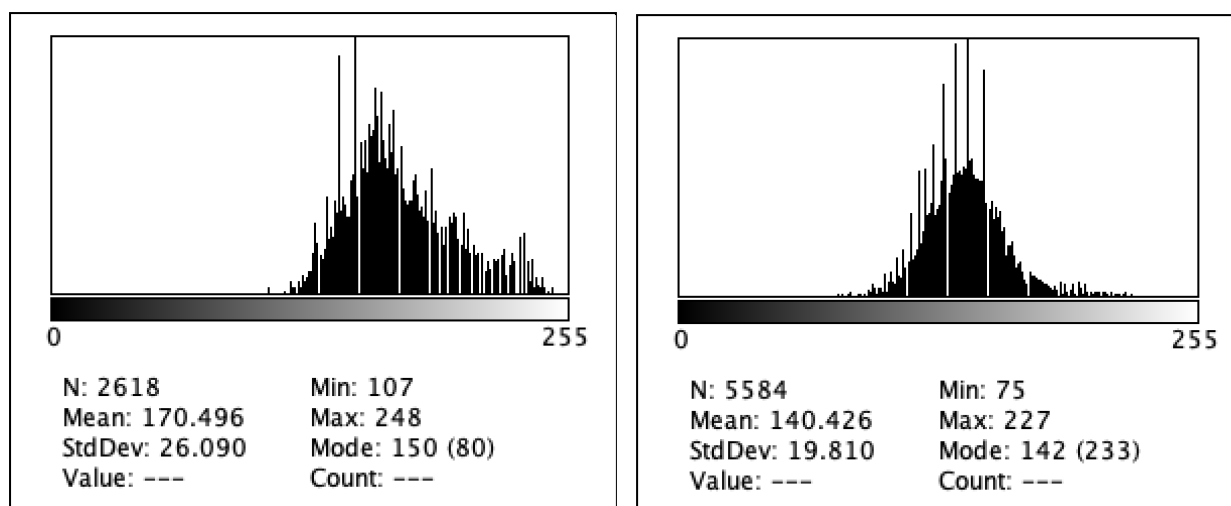


Grafico 17: Istogrammi del mediastino del Caso 8 (Tazio).

L'immagine a sinistra rappresenta l'istogramma del mediastino testicolare normale privo di patologie, mentre l'immagine a destra raffigura l'istogramma del mediastino patologico con degenerazione cistica.

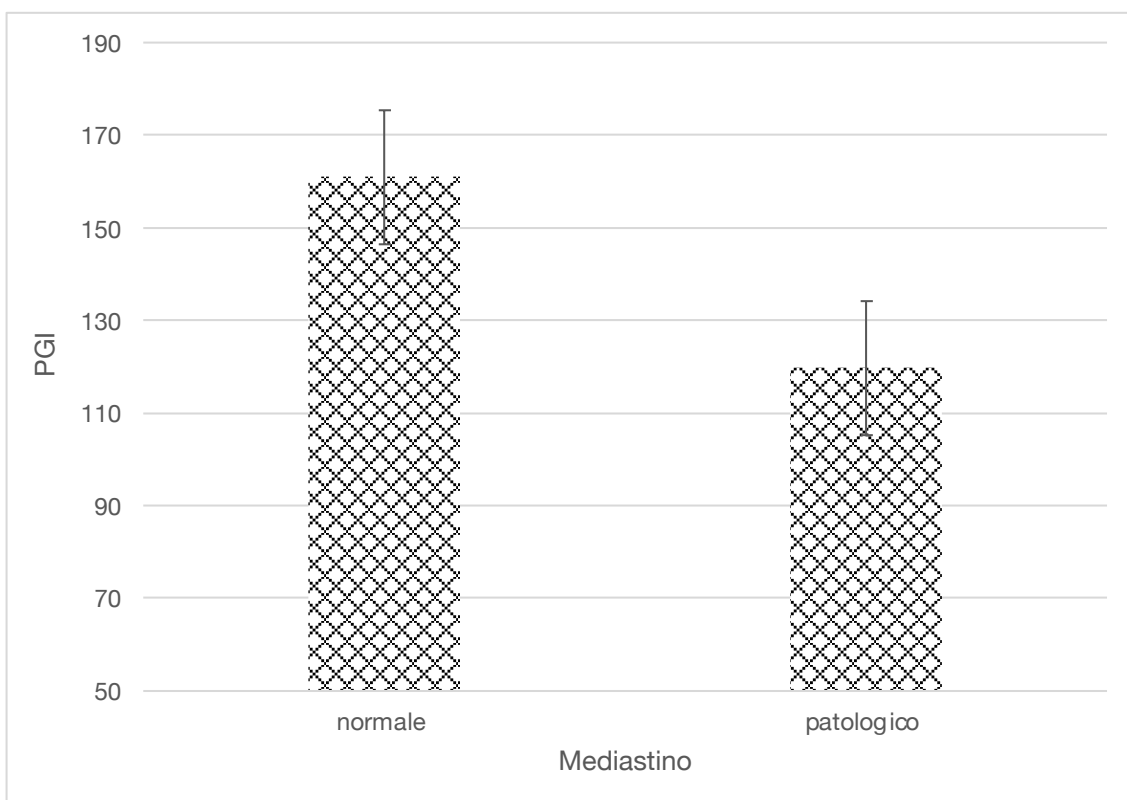
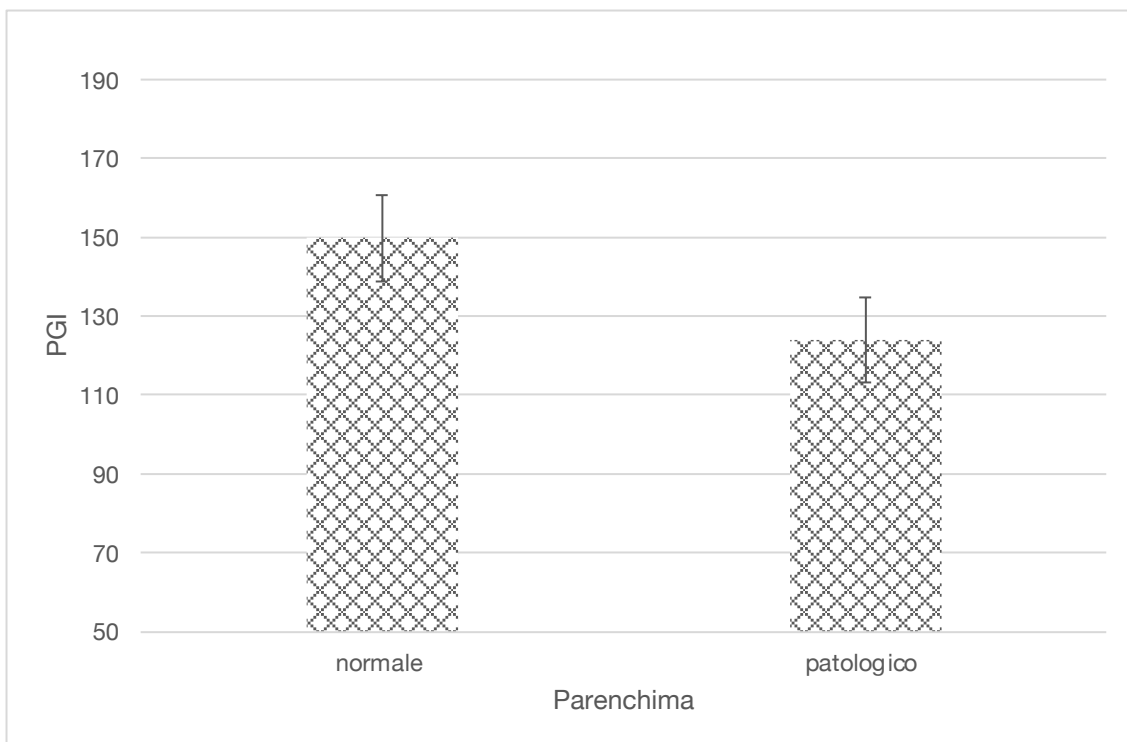


Grafico 18: Grafici statistici ottenuti mettendo a confronto i valori di PGI derivanti dagli istogrammi delle aree testicolari normali e patologiche (parenchima e mediastino)

4.2. Istogrammi legati alla temperatura ambientale

Per due soggetti maschi che hanno preso parte allo studio sono state effettuate le ecografie in due periodi diversi, caratterizzati dalla presenza di temperature e condizioni ambientali differenti.

I soggetti in questione sono Newport (6 anni) e Tazio (10 anni), entrambi affetti da degenerazione cistica ed ectasia tubulare e per i quali sono presenti immagini ecografiche risalenti al periodo estivo (giugno) e al periodo invernale (febbraio-marzo).

Per entrambi gli individui maschi è evidente una modifica degli istogrammi ottenuti derivanti dall'analisi delle ecografie effettuate, con uno spostamento dell'istogramma verso il lato destro (ossia verso i valori della scala di grigi più elevati) per le immagini ecografiche effettuate durante il periodo invernale e quindi con temperature più basse; mentre per quanto riguarda le immagini ecografiche effettuate durante il periodo estivo si può notare lo spostamento del grafico lungo l'asse delle x verso il margine sinistro (in corrispondenza dei valori della scala di grigio inferiori).

Il Caso Newport presenta con le basse temperature un valore medio di grigi equivalente a 154.84, con una deviazione standard di 30.92 ed un valore massimo e minimo di 254 e 51; al contrario con temperature elevate si assiste ad una diminuzione dei valori principali, infatti si ha un valore medio di 109.76 (± 27.13) con un valore massimo di 254 ed un valore minimo di 21 (Figura 33 e 34, Grafico 19).

Infine il Caso Tazio presenta un valore medio di 160.88 (± 33.23) durante il periodo invernale, con un valore massimo di 254 e minimo di 71; mentre durante il periodo estivo presenta un valore medio di 134.24 (± 34.29), con un valore massimo e minimo di grigio equivalente rispettivamente a 252 e 6 (Figura 35 e 36, Grafico 20).



Figura 33: Ecografia del soggetto Newport effettuata nel periodo invernale (febbraio)



Figura 34: Ecografia del soggetto Newport effettuata nel periodo estivo (giugno)

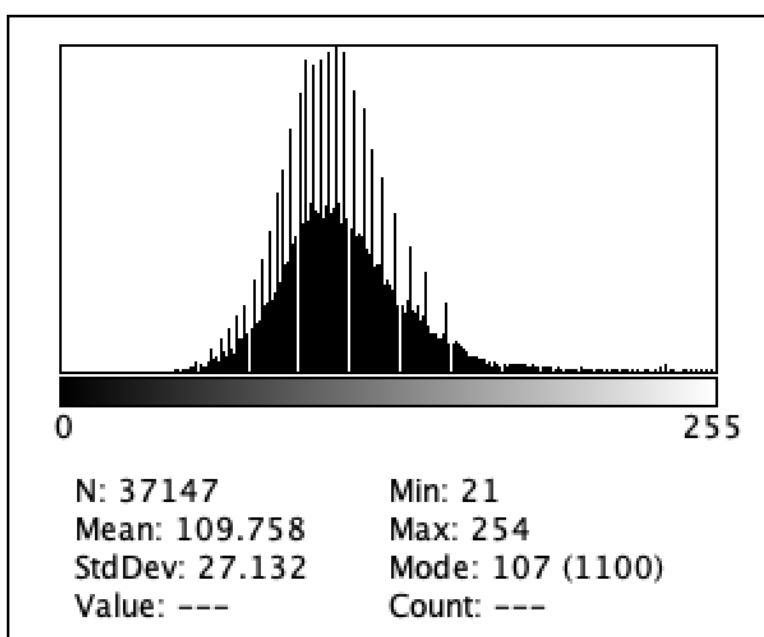
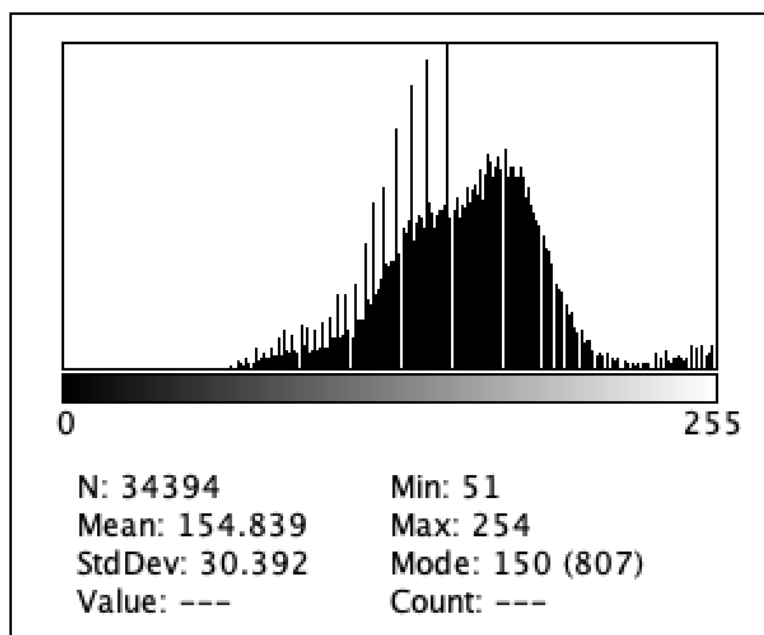


Grafico 19: Istogrammi ottenuti dall'analisi dei testicoli del soggetto Newport. Il primo grafico rappresenta la distribuzione dei grigi dell'ecografia testicolare effettuata a basse temperature (periodo invernale), mentre il secondo grafico rappresenta l'istogramma ottenuto dall'ecografia effettuata ad elevate temperature (periodo estivo)

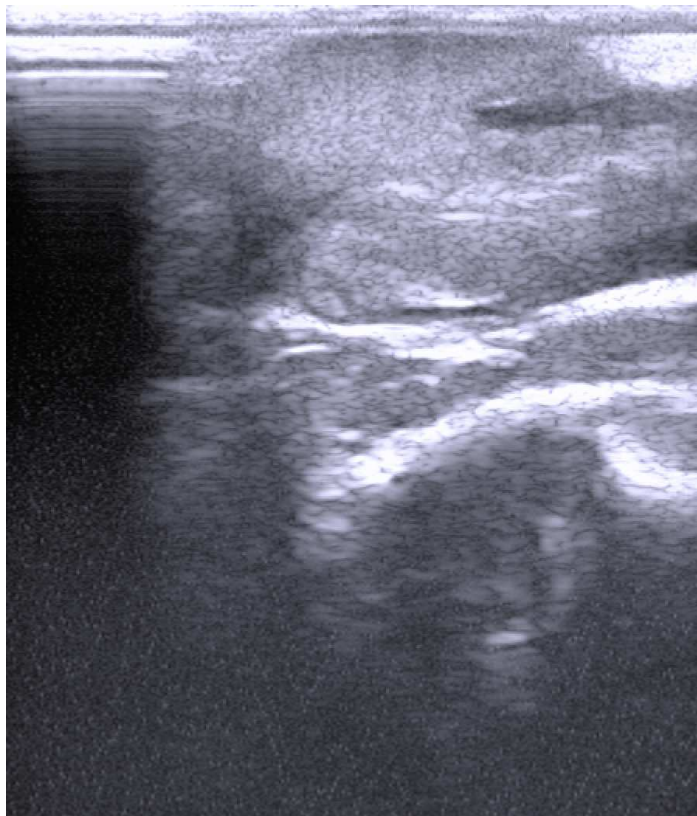


Figura 35: Ecografia del soggetto Tazio effettuata nel periodo invernale (marzo)



Figura 36: Ecografia del soggetto Tazio effettuata nel periodo estivo (giugno)

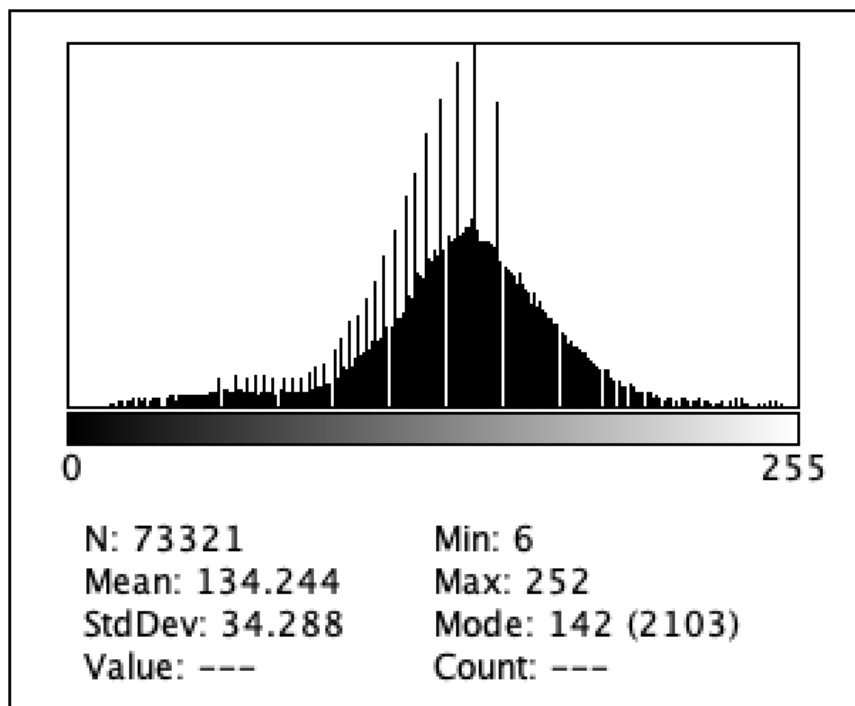
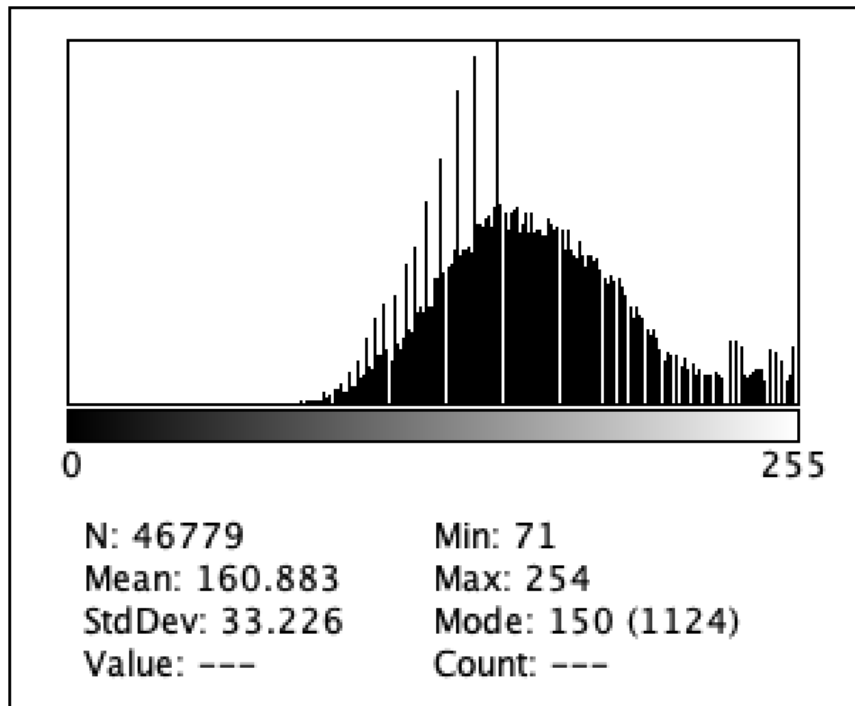


Grafico 20: Istogrammi ottenuti dall'analisi dei testicoli del soggetto Tazio.
 Il primo grafico rappresenta la distribuzione dei grigi dell'ecografia testicolare effettuata a basse temperature (periodo invernale), mentre il secondo grafico rappresenta l'istogramma ottenuto dall'ecografia effettuata ad elevate temperature (periodo estivo)

5. DISCUSSIONE

5.1. Effetto della degenerazione cistica sulla tessitura ecogenica testicolare

Tale diversificazione dei grafici ottenuti e dei valori numerici ad essi associati permettono di avere informazioni precise sull'ecogenicità testicolare, infatti la normale ecostruttura parenchimale è caratterizzata da echi fini e ben addensati tra di loro, caratterizzati da una buona omogeneità e da un'ecogenicità uniforme e di media intensità.

Al contrario, la presenza di un ecopattern finemente disomogeneo, con la presenza di aree ipoecogene o iperecogene sono tutte caratterizzazioni della presenza di una testicolopatia che potrebbe avere diverse eziologie e potrebbe avere effetti negativi diversi sul soggetto maschio e sulla sua capacità riproduttiva.

I valori più elevati e vicini al valore massimo della scala dei grigi negli istogrammi (equivalente a 255) sottolineano una prevalenza di pixel chiari e tendenti al bianco, mentre valori più bassi e tendenti allo 0 indicano la presenza di un numero elevato di pixel neri o scuri.

Nell'immagine ecografica il testicolo normale si presenta di forma ovale ed omogeneo, con il mediastino testicolare (o *mediastinum testis*) caratterizzato da un'area iperecogena allungata, ovvero un'area caratterizzata da una riflessione del fascio ultrasonografico maggiore rispetto al parenchima circostante di riferimento e rappresentata da una colorazione più chiara.

Al contrario, il testicolo con degenerazione cistica presenta un mediastino totalmente diverso e dotato di un'ecogenicità alterata, infatti il mediastino patologico è raffigurato nelle immagini ad ultrasuoni come una sezione ipoecogena o anecogena di dimensioni variabili, caratterizzata da una scarsa o nulla produzione di echi, da un livello di riflessione ridotto e da una colorazione grigio scura o nera.

Oltre alle informazioni sull'ecogenicità delle strutture testicolari, ImageJ e gli istogrammi possono fornire dettagli specifici sulle cisti presenti a livello

testicolare: le cisti semplici infatti possono avere una dimensione variabile da 2 mm a 2 cm, sono generalmente solitarie (ma possono essere anche multiple), di solito sono adiacenti al mediastino testicolare e all'ecografia appaiono con la sezione centrale anecoica; invece le cisti complicate presentano i bordi di forma irregolare, con una parete spessa e talvolta possono presentare delle calcificazioni (ossia delle piccole aree iperecogene che suggeriscono la presenza di una degenerazione maligna).

5.2. Effetto della temperatura sulla tessitura ecogenica testicolare

L'insorgenza di problematiche collegate allo stress da caldo è una condizione comune nei camelidi sudamericani, che negli ultimi anni si sono dovuti adattare a luoghi con temperature e livelli di umidità ambientale spesso elevati.

Vista la loro origine, l'adattamento evolutivo a temperature inferiori a 20°C ha contribuito direttamente alla loro ridotta capacità di termoregolazione a temperature più elevate, infatti l'epidermide e la fibra di queste specie (con un rivestimento esterno grossolano ed una fibra più fine) si sono sviluppati ed evoluti nel tempo per consentire l'adattamento a zone più fredde, permettere la ritenzione del calore ed impedire la penetrazione dell'acqua.

Tutti questi aspetti contribuiscono negativamente e rendono più difficili e complicati i processi di termoregolazione in ambienti con temperature elevate.

Nel caso di valori di THI elevati (il cui acronimo sta ad indicare "Temperature Humidity Index", e rappresenta un indice bioclimatico che permette di valutare la temperatura ambientale percepita in relazione ai livelli di umidità relativa dell'aria) i camelidi sudamericani dissipano il calore attraverso le finestre termiche, che consistono in aree di pelle dove la fibra è più sottile e dove sono presenti un gran numero di ghiandole sudoripare, situate prevalentemente nell'addome ventrale, nelle ascelle e nella regione inguinale.

Questi meccanismi di dissipazione del calore però non sono sufficienti in presenza di temperature ambientali ed umidità molto elevata, limitando gli animali non tomati a dissipare il calore corporeo solo attraverso la respirazione ed il raffreddamento per evaporazione.

Come evidenziato in precedenza, la termoregolazione dei testicoli è un aspetto fondamentale per la loro corretta funzionalità.

Tale meccanismo fisiologico è garantito dallo scroto, dal muscolo cremastere (muscolo striato che ricopre i testicoli), dalle arterie e dalle vene testicolari; nello specifico la conformazione dell'arteria testicolare circondata dal plesso pampiniforme è caratterizzata da un meccanismo di scambio di calore controcorrente che gioca un ruolo fondamentale nella termoregolazione testicolare.

Inoltre nei mammiferi in generale, quando la temperatura si abbassa il cremastere e la tonaca muscolare si contraggono portando ad una sollevazione dei testicoli e all'ispessimento della parete scrotale; al contrario, in presenza di temperature elevate i muscoli si rilasciano e i testicoli discendono all'interno della parete dello scroto pendulo.

Quest'ultimo meccanismo però non si verifica negli alpaca e nei camelidi sudamericani, che sono dotati di uno scroto non pendulo ed aderente al corpo, con conseguenze negative sulla loro capacità riproduttiva e sulla loro fertilità.

Una conseguenza importante negli alpaca relativa alla presenza di temperature elevate e a condizioni di stress da caldo è l'insorgenza di gonfiore scrotale acuto (*acute scrotal swelling*) accompagnato dallo sviluppo di idrocele grave, che possono essere evidenziati e localizzati facilmente attraverso le immagini ecografiche.

Il gonfiore scrotale è riconducibile ad un accumulo focale di materiale ipoecogeno all'interno delle tuniche vaginali e tale accumulo persistente di liquido (idrocele) può portare ad un aumento del volume testicolare (indipendentemente dalla presenza di cisti testicolari), può portare all'alterazione della corretta produzione spermatica e può causare una ridotta fertilità riconducibile ad un processo di termoregolazione anormale ed alterato del testicolo colpito.

L'esatta fisiopatologia di tale problematica non è stata ancora ben compresa; i fattori che possono contribuire sono molteplici, come l'incapacità del plesso pampiniforme e dell'arteria testicolare di far fronte al ricambio di liquidi, oppure il danno termico vascolare che può portare all'alterazione della permeabilità delle

pareti e al travaso di proteine intramuscolari, elettroliti e liquidi nell'interstizio (Tibary et al., 2008).

Attraverso le ecografie è possibile analizzare il testicolo alterato e comprendere al meglio la causa di tale gonfiore: il testicolo affetto da una condizione di gonfiore e dall'accumulo anomalo di liquidi a livello scrotale presenta un'area ipoecogena attorno al parenchima testicolare, che nelle immagini ecografiche appare con una colorazione grigio scura tendente al nero.

6. CONCLUSIONI

La valutazione ecografica del tratto riproduttivo degli alpaca maschi (*Vicugna pacos*) è un aspetto fondamentale nell'analisi della solidità riproduttiva, in quanto consente di rilevare la presenza di diverse condizioni patologiche, permette di analizzare il diverso livello di ecogenicità di un tessuto testicolare normale e affetto da particolari alterazioni anomale e consente indirettamente una valutazione dell'efficienza riproduttiva del maschio.

Sulla base di questi aspetti è possibile pensare ad una potenziale applicabilità di tale protocollo ecografico e studio delle immagini ottenute all'interno del Breeding Soundness Evaluation (BSE).

Un aspetto fondamentale di cui tener conto però è la temperatura ambientale; infatti vista l'influenza delle condizioni ambientali sull'ecogenicità testicolare, la valutazione della solidità riproduttiva (Breeding Soundness Evaluation) deve essere effettuata preferibilmente nei periodi più freddi.

Questo perché la presenza di elevate temperature può portare all'insorgenza di idrocele, con conseguente alterazione della tessitura ecogenica testicolare e delle reali dimensioni testicolari.

BIBLIOGRAFIA

- Ahmed W.M. e Nada A.R. (1993), *Some pathological affections of testis and epididymis of slaughtered camels (Camelus dromedarius)*, in International Journal of Animal Sciences, vol. 8, pp. 33–36.
- Bravo P.W. (2007), *Breeding Soundness Examination of the male llama and alpaca*, in Current Therapy in Large animal Theriogenology (Seconda Edizione), capitolo 16, pp. 865-868
- Bravo P.W., Moscoso R., Alarcon V. e Ordoñez C. (2002), *Ejaculatory process and related semen characteristics*, in Archives of Andrology, vol. 48, pp. 65-72
- Bravo P.W. e Johnson L.W. (1994), *Reproductive physiology of the male camelid*, in Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice, vol. 10, pp. 259-264
- Bravo P.W., Flores U., Garnica J. e Ordoñez C. (1997), *Collection of semen and artificial insemination of alpacas*, in Theriogenology, vol. 47, pp. 619-626
- Chenoweth P.J. e Lorton S.P. (2014), *Animal Andrology: theories and applications*, Cabi
- El-Wishy A.B. (1988), *Reproduction in the male dromedary (Camelus dromedarius): a review*, in Animal Reproduction Science, vol. 17, pp. 217–241
- Fernandez-Baca S. e Calderon W. (1966), *Métodos de coleccion de semen de la alpaca*, in Revista Facultad de Medicina Veterinaria de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, vol. 18–20, pp. 13–26
- Ferreira T. e Rasband W. (2012), *ImageJ User Guide*, <https://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/user-guide.pdf>
- Flower M.E. (1998), *Medicine and surgery of South American camelids: Llama, Alpaca, Vicuna, Guanaco*, Blackwell Publishing

- Galloway D.B. (2000), *The development of the testicles in alpacas in Australia*, in Proceedings of the Australian alpaca industry conference, Canberra, pp. 21-23
- Garnica J., Achata R. e Bravo P.W. (1993), *Physical and biochemical characteristics of alpaca semen*, in Animal Reproduction Science, vol. 32, pp. 85–90
- Hazra S., Ghosh S., Maity S.P. e Rahaman H. (2016), *A new FPGA and programmable SoC based VLSI architecture for histogram generation of grayscale images for image processing applications*, in Procedia Computer Science, vol. 93, pp. 139-145
- Kubicek J. (1974) *Samentnahme beim Alpaca durch eine Harnrohrenfistel*, in Zeitschrift für Tierzüchtung und Züchtungsbiologie, vol. 90, pp. 335–351
- Mattoon J.S. e Nyland T.G. (2016), *Trattato di ecografia del cane e del gatto*, Edra, Terza Edizione
- Medan M.S. e Abd El-Aty A.M. (2010), *Advances in ultrasonography and its applications in domestic ruminants and other farm animals reproduction*, in Journal of Advanced Research, vol. 1, pp. 123-128
- Merlian C.P., Sikes J.D., Read B.W., Boever W.J. e Knox D. (1986) *Comparative characteristics of spermatozoa and semen from a bactrian camel, dromedary camel and llama*, in Journal of Zoo Animal Medicine, vol. 10, pp. 22–25
- Norton P.L., Gold J.R., Russell K.E., Schulz K.L. e Porter B.F. (2014), *Camelid heat stress: 15 cases (2003-2011)*, in Can Vet J (The Canadian Veterinary Journal), vol. 55, pp. 992-996
- Novoa C. (1970), *Reproduction in Camelidae*, in Journal of Reproduction and Fertility, vol. 22, pp. 3-20
- Orlacchio A. (2010), *Ecografia*, <https://art.torvergata.it/bitstream/2108/34136/1/03%20Ecografia.pdf>, in Compendio di radiologia, Terza Edizione, pp. 25-40

- Oztutar Stelletta F., Daskin A., Tekin K., Vivanco Mackie H.W. e Stelletta C. (2022), *Breeding soundness evaluation in alpaca (Vicugna pacos) males: a long retrospective study of the effects of cystic masses and environmental temperatures on scrotal measures*, (non pubblicato e sottomesso in Journal of Veterinary Science)
- Peng S., Fu E., Lee S. e Tsai S. (2019), *Methods to ameliorate heat stress in non-native alpaca, Vicugna pacos*, in Small Ruminant Research, vol. 175, pp. 90-95
- Quispe F. (1987), *Evaluacion de las características físicas del semen de la alpaca durante la epoca de empadre*, BSc thesis, Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional del Altiplano, Puno
- Ribes R., Luna A. e Ros P.R. (2008), *Learning diagnostic imaging: 100 essential cases*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Prima Edizione
- Riccitelli S. (2014), *Esecuzione dell'esame ecografico dell'addome sup. regolazione dell'ecografo, posizione della sonda, orientamento dell'immagine*, <http://www.siemg.it/files/IV-Congresso-Nazionale/COME%20SI%20ESEGUE%20L%27ESAME%20DELL%27ADDOME%20SUPERIORE.pdf>, Scuola Ecografia SIEMG, Santa Margherita di Pula (Ca)
- Schwalm A., Gauly M., Erhardt G. e Bergman M. (2007), *Changes in testicular histology and sperm quality in llamas (Lama glama), following exposure to high ambient temperature*, in Theriogenology, vol. 67, pp. 1316-1323
- Smith C.L., Peter A.T. e Pugh D.G. (1994), *Reproduction in llamas and alpacas: a review*, in Theriogenology, vol. 41, pp. 573-592
- Stelletta C. e Oztutar Stelletta F. (2016), *Long-Term retrospective analysis (2004-2015) of reproductive and health management of South American Camelids breed in Italy*, ICAR satellite meeting on camelids reproduction

- Sumar J. (1983), *Studies on reproductive pathology in alpacas*, M.Sc. Thesis, Swedish University of Agrarian Sciences, Department of obstetric and gynecology Veterinary Medicine Faculty, pp. 90
- Sumar J. (1985), *Reproductive physiology in South American camelids*, in Genetics of reproduction in sheep, pp. 81-95
- Sumar J. (1996), *Reproduction in llamas and alpacas*, in Animal Reproduction Science, vol. 42, pp. 405-415
- Tibary A. (2003), *Male reproduction*, in The Complete Alpaca Book, pp 323–350
- Tibary A. (2004), *Testicular biopsy*, in Proceedings of the North American Veterinary Conference, Orlando, Florida, January 17–21, 2004, pp 297–298
- Tibary A. e Anouassi A. (1997), *Theriogenology in camelidae: anatomy, physiology and artificial breeding*, Marocco, Actes
- Tibary A. e Vaughan J. (2006), *Reproductive physiology and infertility in male South American camelids: A review and clinical observations*, in Small Ruminant Research, vol. 61, pp. 283-298
- Tibary A., Anouassi A. e Memon M.A. (2001) *Approach to infertility diagnosis in camelids: retrospective study in alpacas, llamas and camels*, in Journal of Camel Practice and Research, vol. 8, pp. 167–179
- Tibary A., Anouassi A. e Sghiri A. (2005) *Factors affecting reproductive performance of camels at the herd and individual level NATO*, in Science Series: Life and Behavioural Sciences, vol. 362, pp 97–114
- Tibary A., Anouassi A., Sghiri A. e Khatir H. (2007), *Current knowledge and future challenges in camelid reproduction*, in Society of Reproduction and Fertility Supplement, vol. 64, pp. 297-313
- Tibary A., Rodriguez J. e Sandoval S. (2008) *Reproductive emergencies in camelids*, in *Theriogenology*, vol. 70, pp. 515–534
- Vaughan J.L. (2003), *Artificial insemination in alpacas (Lama pacos)*, in Publication n° 03/104, RIRDC Project N° AAA-1A, pp 67–73

- Waheed M.M., Ghoneim I.M. e Hassieb M.M. (2011), *Development and validation of testicular biopsy for diagnosis of infertility in camels (Camelus dromedarius)*, in Clinical Theriogenology, vol. 3, pp. 105–114