

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA SPECIALISTICA IN MEDICINA VETERINARIA**

TESI DI LAUREA

APPLICAZIONE DI CAMPO DELLA BIOPSIA ECO-GIUDATA PER IL PRELIEVO DI TESSUTO EPATICO E ADIPOSO PERIVISCERALE IN BOVINE DA LATTE AD ALTA PRODUZIONE

RELATORE: CH. MO PROF. MASSIMO MORGANTE

CORRELATORI: DOTT. ENRICO FIORE

DOTT. MARCELLO LORA

LAUREANDO: DANIELE CIMMIERI

MATRICOLA N. 556443

ANNO ACCADEMICO 2010-2011

INDICE

<u>1. PREMESSA</u>	<u>5</u>
<u>2. INTRODUZIONE</u>	<u>7</u>
2.1 Il periodo di transizione	7
2.2 Tecniche di biopsia epatica	11
2.2.1 <i>Principali utilizzi della biopsia epatica</i>	11
2.2.2 <i>Tecniche di biopsia epatica per aspirazione</i>	11
2.2.3 <i>L'Ethmoid Rongeurs come strumento per la biopsia epatica</i>	19
2.2.4 <i>Tecniche di biopsia epatica mediante ago Tru Cut</i>	20
2.2.5 <i>Confronto tra le tecniche per aspirazione e mediante ago Tru Cut</i>	22
2.2.6 <i>Possibili effetti collaterali e lesioni secondarie alla tecnica bioptica</i>	23
2.3 Esame ecografico del fegato	26
2.3.1 <i>Scopi di utilizzo dell'ecografia epatica</i>	26
2.3.2 <i>Tecnica di esecuzione dell'ecografia epatica</i>	27
2.3.3 <i>Caratteristiche ecografiche del fegato</i>	28
2.3.4 <i>Fattori influenzanti le caratteristiche fisiche del fegato</i>	32
2.3.5 <i>Principali alterazioni ecografiche rilevabili</i>	32
<u>3. MATERIALI E METODI</u>	<u>35</u>
3.1 Caratteristiche delle Aziende	35
3.2 Scelta degli animali	35
3.3 Rilevazione del BCS	36

3.4 Prelievi bioptici eco-guidati	36
3.4.1 <i>Materiale utilizzato per effettuare le biopsie eco-guidate</i>	36
3.4.2 <i>Tipi di biopsia effettuati</i>	39
3.4.3 <i>Tecnica bioptica utilizzata</i>	40
3.4.4 <i>Raccolta dei campioni bioptici</i>	49
3.4.5 <i>Analisi delle immagini ecografiche</i>	52
3.5 Analisi statistica	54
<u>4. RISULTATI</u>	<u>55</u>
<u>5. DISCUSSIONE</u>	<u>63</u>
5.1 Analisi descrittiva della tecnica bioptica eco-guidata	63
5.2 Analisi dei risultati ottenuti	64
5.3 Confronto con le altre tecniche bioptiche	66
5.4 Possibili utilizzi delle biopsie epatiche e di tessuto adiposo periviscerale	67
<u>6. CONCLUSIONI</u>	<u>69</u>
<u>BIBLIOGRAFIA</u>	<u>73</u>
<u>RINGRAZIAMENTI</u>	<u>81</u>

1. PREMESSA

Il fegato e il tessuto adiposo periviscerale hanno un ruolo fondamentale nel corso dei processi metabolici che avvengono durante il periodo di transizione della bovina da latte, il quale si estende da tre settimane prima del parto fino alla terza settimana di lattazione. Durante questa fase, l'animale può entrare in uno stato di deficit energetico causato, sia da un calo dell'ingestione di sostanza secca, che da un rapido aumento dei fabbisogni energetici legati alla lattazione. Questo periodo è caratterizzato dalla presenza di una quota elevata di acidi grassi non esterificati (NEFA) a livello sierico e da un'eccessiva produzione di corpi chetonici con conseguente accumulo di trigliceridi a livello epatico e riduzione dell'attività di enzimi cruciali per la gluconeogenesi epatica. Questi fattori, uniti alla produzione e alla secrezione di sostanze ad azione proinfiammatoria da parte del tessuto adiposo periviscerale, possono influenzare negativamente lo stato di salute e il benessere dell'animale dopo il parto.

La presente Tesi di Laurea ha lo scopo di definire una tecnica bioptica eco-guidata che permetta di raccogliere campioni di tessuto epatico e adiposo periviscerale in maniera rapida, semplice e sicura, da potersi effettuare direttamente in campo, in bovine da latte giunte nelle fasi terminali della propria gestazione.

Tale tecnica bioptica deve permettere di ottenere dei campioni adatti a essere successivamente sottoposti a specifici studi istologici e molecolari, al fine di studiare tali tessuti per definire meglio il loro ruolo durante il periodo di transizione.

Prima di entrare nel dettaglio del lavoro svolto, illustrerò brevemente i meccanismi metabolico-endocrini che si verificano durante la fase di transizione. In seguito, tratterò gli utilizzi che fino a oggi sono stati fatti delle biopsie epatiche e descriverò le più importanti tecniche di biopsia epatica messe a punto dai primi anni '40 fino ai giorni odierni, discutendo i possibili effetti collaterali e le lesioni secondarie alla tecnica bioptica. Quindi, affronterò l'argomento dell'esame ecografico del fegato, descrivendo la tecnica di esecuzione dell'ecografia epatica, i fattori influenzanti le caratteristiche ecografiche del fegato e le principali alterazioni rilevabili.

2. INTRODUZIONE

2.1 Il periodo di transizione

Il periodo di transizione, che comprende le tre settimane precedenti il parto e si estende fino alla terza settimana di lattazione, rappresenta senza dubbio, nella bovina da latte, il periodo maggiormente a rischio per quanto riguarda l'insorgenza di numerose malattie metabolico-nutrizionali dovute a profondi cambiamenti metabolici ed endocrini. Infatti, le vacche da latte, come la maggior parte dei mammiferi, immediatamente dopo il parto entrano in un periodo nel quale si verifica uno spostamento della richiesta metabolica. In questa fase, si passa da un incremento delle riserve di principi attivi che sono necessari allo sviluppo fetale e mammario, a una rapida mobilitazione dei depositi proteici e lipidici per il metabolismo energetico e il supporto alla produzione latte. A questa nuova domanda di energia non corrisponde però l'assunzione di ulteriori sostanze nutritive, anzi. Si entra così in una fase cosiddetta di bilancio energetico negativo, causata da un lato da un calo dell'ingestione di sostanza secca e dall'altro dal rapido aumento dei fabbisogni energetici legati alla lattazione (Butler, 2000; Drackley *et al.*, 2001; Overton and Waldron, 2004).

L'animale, di fronte a questo deficit energetico, mobilita e catabolizza parte delle proprie riserve di tessuto adiposo, incrementando la quota di acidi grassi non esterificati (NEFA) presenti a livello sierico. Questo comporta però un'eccessiva produzione di corpi chetonici e un possibile stato di chetosi clinica o subclinica (Duffield *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2003; Bradford and Allen, 2005).

Inoltre, l'aumento della concentrazione di NEFA nel sangue implica un'estrazione di questi ultimi da parte del fegato, in misura direttamente proporzionale alle concentrazioni circolanti. I NEFA possono, in questa sede, essere accumulati a livello intracellulare come trigliceridi oppure venire ossidati a fini energetici o parzialmente a corpi chetonici. L'ingrassamento della bovina in questa serie di processi, che vedono il fegato come perno centrale, è un aspetto fondamentale: vacche ipercondizionate, cioè con un body condition score (BCS) superiore a 4,

vanno incontro a un accumulo di trigliceridi in sede epatica superiore a quelle più magre. Inoltre, l'ipercondizionamento interferisce con l'ossidazione degli acidi grassi, favorendo un ulteriore accumulo di trigliceridi epatici e riducendo l'attività di enzimi cruciali per la gluconeogenesi (Butler, 2003; Druckley *et al.* 2005).

L'attività del fegato, come appena detto, ha un ruolo molto importante nel corso dei processi metabolici sopra nominati. Essa, al pari della produzione di sostanze ad azione proinfiammatoria secrete dal tessuto adiposo periviscerale, è controllata attraverso l'espressione coordinata di un gran numero di geni (Columbano and Ledda-Columbano, 2003).

I fattori che sono in grado di contribuire ai cambiamenti di questa espressione genica sono diversi: si va da quelli ambientali, a quelli nutritivi, autocrini, endocrini e, infine, paracrini. Le biotecnologie genomiche, decisamente sensibili alle variazioni del bilancio energetico durante il periodo di asciutta, risultano particolarmente utili, soprattutto per identificare numerosi meccanismi di adattamento omeostatico di tutto l'organismo. Allo stato attuale della ricerca, per evitare o limitare forme di chetosi, si punta a massimizzare l'ingestione e aumentare nella dieta la quantità di energia prima del parto (Grummer *et al.*, 2004).

Alcuni lavori più recenti, tuttavia, suggeriscono che anche le bovine, che sono sovralimentate durante il periodo di asciutta (> 140,00% del fabbisogno energetico netto), pur senza ingrassare, presentano un maggior rischio di insorgenza di patologie nel post-partum che comportano, tra le numerose conseguenze, anche un peggioramento dell'efficienza riproduttiva, aspetto fondamentale nell'allevamento di questa specie animale (Dann *et al.*, 2005; Dann *et al.*, 2006).

Inoltre, secondo alcuni studi, certe diete per bovine da latte in asciutta, caratterizzate da un'elevata densità energetica ottenuta incrementando i carboidrati senza fibra o dei grassi, non prevengono le condizioni patologiche correlate alla fase di transizione, ma provocano nell'animale solamente un incremento eccessivo dello stato di ingrassamento (Grummer, 2008).

A tal proposito, è stato accertato che, nell'uomo, l'obesità è strettamente correlata alla "sindrome metabolica", condizione patologica caratterizzata dalla presenza simultanea di diversi disordini metabolici quali dislipidemia, insulino-resistenza,

diabete mellito di tipo 2, ipertensione arteriosa e malattie cardiovascolari (Kim *et al.*, 2003).

Ricerche condotte in ambito umano hanno inoltre dimostrato l'esistenza di una relazione tra la "sindrome metabolica" e alcuni parametri ematologici e biochimici, tra cui fibrinogeno (Imperatore *et al.*, 1998), proteina C reattiva (Santos *et al.*, 2005), interleuchina 6, leptina (Yanagawa *et al.*, 2007), adiponectina e grelina (Elbatarny *et al.*, 2007). Alcuni tra questi parametri sono stati rilevati anche nel cane, ma ulteriori studi saranno necessari per stabilire delle relazioni certe con lo stato di ingrassamento (Jeusette *et al.*, 2005; Ishioka *et al.*, 2006; Ishioka K *et al.*, 2006).

Sempre nell'uomo, anche l'attività del tessuto adiposo bianco, ossia quello composto da adipociti con complessità strutturale bassissima, citoplasma occupato in gran parte da un grande e unico vacuolo lipidico e scarsi mitocondri, risponde a una moltitudine di stimoli (Trujillo and Scherer, 2006).

Esso è distinguibile in grasso sottocutaneo e grasso viscerale. Oltre a questa distinzione anatomica e di sede, queste due tipologie di tessuto si comportano anche funzionalmente in modo diverso: ciò che cambia significativamente nei due tipi di deposizione grassa è che, posto in condizioni di iperalimentazione, il tessuto adiposo viscerale va incontro a una crescita dimensionale prevalentemente ipertrofica, mentre il sottocutaneo tende a dare una risposta iperplastica (Xu *et al.*, 2003).

A parità di obesità, nel caso di quella viscerale, cambia radicalmente il comportamento funzionale dell'adipocita. Questa, infatti, rappresenta un fattore di rischio importante per la progressione diabetica e la principale causa di complicanze durante la "sindrome metabolica" (Sethi and Vidal-Puig, 2007).

Il tipo di aumento volumetrico del pannicolo adiposo nell'obesità viscerale porta a un'alterazione strutturale e funzionale dei singoli adipociti e, in particolare, all'alterazione del profilo di secrezione delle adipochine, cioè di tutte le molecole sintetizzate e secrete dal tessuto adiposo (Shimomura *et al.*, 1999).

Un adipocita, infatti, produce molte molecole di natura ormonale e altre con effetti proinfiammatori. Tra questi vi sono la leptina, l'adiponectina e numerose citochine infiammatorie. La quantità relativa e la scelta tra quali adipochine produrre è fatta dall'adipocita in base al suo stato funzionale: l'ipertrofia aumenta la produzione di leptina e viceversa riduce la produzione di adiponectina.

All'obesità, in particolar modo a quella viscerale, corrisponde un'alterazione nella produzione di adipochine (Wellen and Hotamisligil, 2005).

Lo stato di normalità del tessuto adiposo è quello di essere non ipertrofico: l'ipertrofia e il conseguente danno a singole cellule portano a una condizione proinfiammatoria. Le cellule particolarmente ipertrofiche vanno più facilmente incontro a necrosi e ciò porta alla produzione e liberazione di molecole proinfiammatorie e al richiamo di fattori dell'infiammazione. Questo lo si può vedere misurando il numero di macrofagi nei due tipi di grasso: nel caso di progressiva obesità questo valore aumenta nel grasso viscerale, ma non nel grasso sottocutaneo (Arkan, 2005).

Si ha perciò una combinazione negativa tra il comportamento alterato dell'adipocita, il danno da ipertrofia e l'infiammazione. Nell'obesità viscerale le molecole secrete dal tessuto adiposo e dai macrofagi infiltrati cambiano in modo complesso. In particolare, le alterazioni importanti sono: l'aumento della secrezione di leptina, la produzione di mediatori infiammatori e la riduzione della produzione di adiponectina, che ha azione molto benefica nel far consumare il grasso periferico (Colombo *et al.*, 2002).

Sembra che anche nella bovina da latte lo stato d'ingrassamento e, in particolare, la quantità del tessuto adiposo periviscerale, possano influenzare lo stato di salute e il benessere degli animali dopo il parto in maniera simile a quanto rilevato da studi di medicina umana (Dann *et al.*, 2006; Mukesh *et al.*, 2010).

Vista quindi la centralità del tessuto adiposo durante il periodo di transizione, sarebbero necessarie, a questo proposito, ricerche più approfondite sul possibile impiego di metodologie diagnostiche atte a definire la quantità del tessuto adiposo periviscerale delle bovine da latte e a identificare e rilevare l'eventuale influenza della condizione corporea sullo stato del metabolismo energetico e sul rischio di insorgenza delle diverse patologie metabolico-nutrizionali tipiche della bovina da latte. Lo studio dell'assetto metabolico della madre tramite queste tecniche è molto importante, visto che questo influenza fortemente l'espressione genica nel nascituro e può condizionare l'intera vita dell'animale. Lo stato di ingrassamento delle madri può, infatti, dettare il grado di espressione epigenetica del nascituro e, di conseguenza, modificare permanentemente il metabolismo energetico e le sue capacità d'adattamento.

2.2 Tecniche di biopsia epatica

2.2.1 Principali utilizzi della biopsia epatica

La biopsia rappresenta una tecnica di prelievo di campioni di tessuto da animali vivi molto utile per studi istologici e molecolari. In particolare, quella epatica è stata utilizzata per studi che riguardano la determinazione delle concentrazioni epatiche di nutrienti, minerali, metalli pesanti, vitamine, chemioterapici e trigliceridi sia nella bovina da latte che in quella da carne (Anderson *et al.*, 1962; Chapman *et al.*, 1963).

La biopsia permette di acquisire informazioni preziose che non potrebbero essere ottenute mediante l'esame obiettivo generale dell'animale, analisi del sangue o altri esami di diagnostica collaterale. Inoltre, è una metodica estremamente poco invasiva e rischiosa che consente di operare sul vivo (Reid, 1980; Swanson *et al.*, 1999).

Gli strumenti e le tecniche per l'esecuzione di biopsie epatiche, che sono stati descritti in letteratura nel corso degli ultimi decenni, sono diversi. Volendo tentare una classificazione delle più importanti tecniche messe a punto fino a oggi, possiamo individuare due grandi gruppi. Il primo, più datato, è composto dalle tecniche di biopsia epatica per aspirazione, mentre il secondo, più recente, comprende le tecniche di biopsia mediante ago Tru-Cut. Le differenze tra queste metodologie verranno ora descritte e gli strumenti utilizzati in ciascuna saranno oggetto di confronto.

2.2.2 Tecniche di biopsia epatica per aspirazione

La tecnica per aspirazione è stata la prima a essere sviluppata ed è stata utilizzata per molti anni da numerosi operatori.

Questa procedura fu messa a punto per la prima volta da Dick nel 1944 in Australia per la determinazione dei valori epatici di rame nella pecora. Tale metodo fu adattato a partire da una tecnica di biopsia ideata da Iverson e Roholm nel 1939 in campo umano (Dick, 1944).

Lo strumento descritto e utilizzato da Dick è costituito da un trocar, una siringa e una cannula. Originariamente le componenti dello strumento erano di ferro, successivamente venne usato l'acciaio inossidabile per diminuire la contaminazione dei campioni prelevati con tracce di metallo. La camicia della siringa è costituita da vetro e l'adattatore per l'ago, posizionato a livello della porzione terminale di questa, è stato sostituito con un altro sistema di attacco in acciaio inossidabile, su cui è possibile agganciare facilmente, oltre all'ago, anche la cannula. Questo permette di effettuare biopsie multiple una volta posizionato l'ago sulla porzione di tessuto da prelevare (Dick, 1952).

In seguito, questa tecnica è stata modificata da vari Autori, tra cui i più importanti sono stati Erwin *et al.* nel 1956 e Hugues nel 1962.

Il metodo proposto e descritto da Erwin *et al.* prevede di utilizzare una cannula di acciaio di 16,00 cm di lunghezza e con un diametro interno pari a 8,00 mm. Il trocar viene ricavato da un tondino d'acciaio, di diametro sufficientemente più piccolo di quello della cannula in modo tale da poter scorrere all'interno di essa senza opporre eccessivo attrito. All'estremità prossimale della cannula viene collegata una siringa da 20 ml, anch'essa in acciaio. La giuntura tra queste due componenti è molto importante perché è fondamentale non perdere pressione dalla siringa una volta che la cannula e il trocar vengono inseriti all'interno dello spazio intercostale. Per ottenere ciò Erwin *et al.* utilizzano un meccanismo di bloccaggio con l'interposizione di una guarnizione di gomma (Erwin *et al.*, 1956).

Questo differisce dal meccanismo di attacco tra cannula e siringa adottato da altri Autori, tra i quali Dick, che prevedeva semplicemente degli adattatori tra queste due componenti volti unicamente a permettere lo scivolamento della siringa all'interno della cannula. In questo modo la pressione negativa all'interno della siringa veniva occasionalmente persa e non era possibile estrarre il campione, soprattutto se la bovina si agitava e si muoveva durante la manualità (Dick, 1952; Seghitti and Marsh, 1953; Bone, 1954).

Anche l'impugnatura della siringa viene modificata: nella parte della camicia più vicina allo stantuffo viene posizionato un tondino di 2,00 cm di lunghezza, perpendicolarmente alla siringa stessa. Questo permette di poter applicare una forza maggiore allo stantuffo al momento della sua risalita (Figura 1).

Tali modifiche offrono, inoltre, la possibilità di ottenere una pressione maggiore, di mantenerla più a lungo e quindi di avere a disposizione una maggiore pressione negativa una volta posizionato lo strumento sulla porzione di fegato da prelevare, incrementando l'accuratezza e la velocità con cui vengono effettuati i campioni (Erwin *et al.*, 1956).

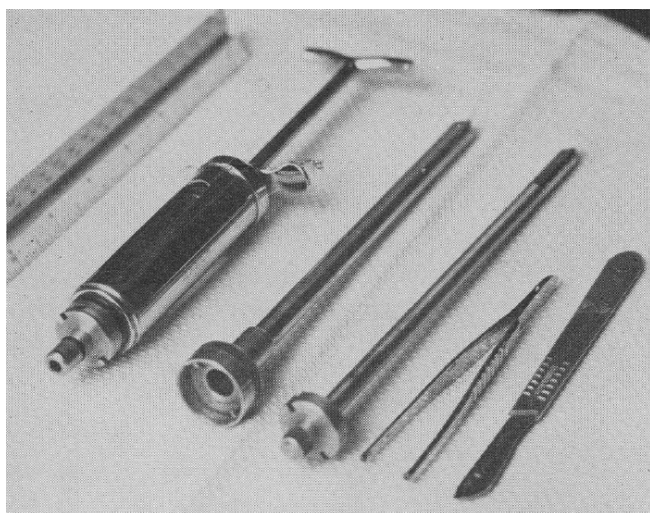


Figura 1.

Strumenti utilizzati per la tecnica biptica (Erwin *et al.*, 1956).

Preparato correttamente tutto il materiale, si effettua la tricotomia e la disinfezione di una porzione di cute a cavallo dell'ultimo spazio intercostale sul lato destro della vacca. Non si esegue nessun tipo di anestesia: a questo proposito gli Autori affermano che è stata tentata in alcuni animali un'anestesia locale mediante l'utilizzo di procaina, ma spiegano che questa procedura è stata ritenuta controproducente, a causa dell'eccitamento che si verificava nell'animale e anche per la perdita di tempo. Quindi, si effettua un'incisione della cute mediante bisturi. Il punto di incisione deve essere a livello del dodicesimo spazio intercostale, di circa 1,50 cm di lunghezza, parallelo alle coste, a circa 15,00 cm di distanza dalla linea mediana del dorso. Per localizzare velocemente il punto esatto di incisione, Erwin *et al.* propongono di individuare l'ultima costa con la mano che non regge l'apparecchiatura per la biopsia. In seguito, è necessario procedere anteriormente, palpare il dodicesimo spazio intercostale e posizionarsi a una spanna di distanza dalla linea mediana del dorso. Una volta effettuata l'incisione con il bisturi, si posiziona il trocar e la cannula all'interno della cute e della muscolatura intercostale. Non essendo previsto l'utilizzo dell'ecografo, il fegato deve essere individuato basandosi unicamente sulle

conoscenze anatomiche di questa regione. Per questo motivo il trocar deve essere inclinato ventralmente di 45° rispetto a un immaginario piano orizzontale e, anteriormente, sempre di 45° rispetto a un piano immaginario sagittale. Come descritto dagli Autori, la posizione del fegato può variare da un animale a un altro e, per questo motivo, diventa importante riuscire a distinguere con l'esperienza la resistenza che il fegato offre alla penetrazione del trocar, per distinguere il parenchima epatico dagli altri tessuti. Una volta posizionato correttamente il trocar, esso viene rimosso velocemente. La cannula deve restare in posizione e deve essere mossa il meno possibile. Quindi, la siringa viene attaccata alla cannula e si fa avanzare quest'ultima all'interno del parenchima epatico per 3,00-4,00 cm mediante un movimento rotatorio. A questo punto lo stantuffo della siringa può essere ritirato: la pressione negativa che si viene a creare all'interno della camicia di acciaio della siringa, permetterà l'aspirazione del campione di tessuto epatico. Terminata l'aspirazione, tutto lo strumentario viene rimosso dalla parete addominale della bovina. La breccia cutanea non viene suturata (Erwin *et al.*, 1956) (Figura 2).

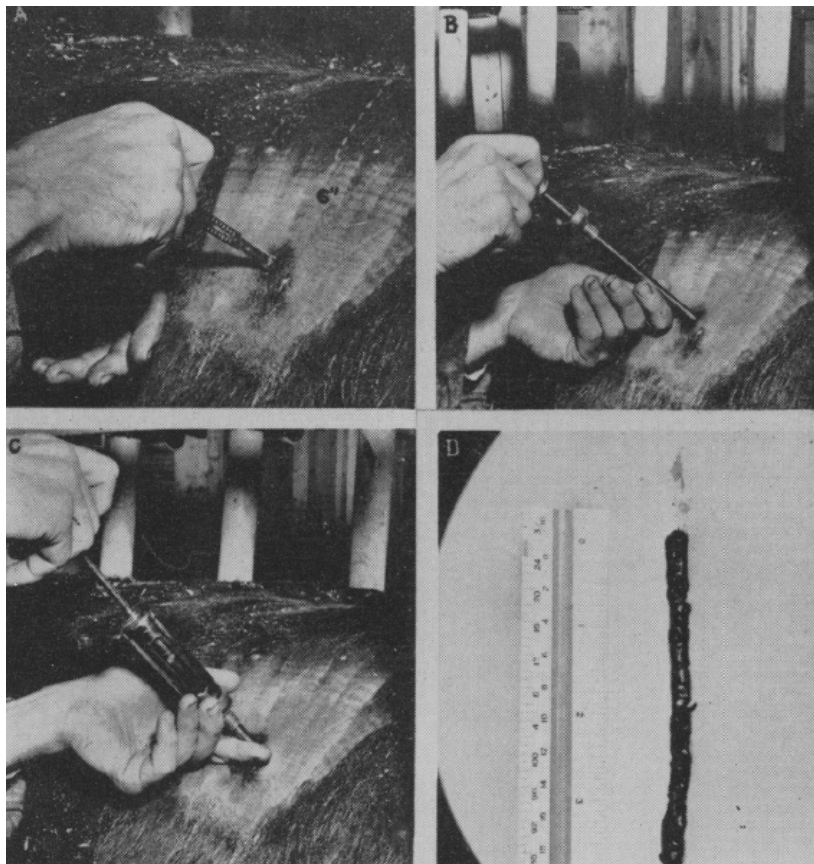


Figura 2.

Procedura per effettuare la biopsia epatica.

- A. Punto di incisione.
- B. Rimozione del trocar dalla cannula.
- C. Attacco della siringa alla cannula. Lo stantuffo viene ritirato ottenendo in questo modo una pressione negativa all'interno della cannula.
- D. Esempio di biopsia epatica ottenuta (Erwin *et al.*, 1956).

La carota di tessuto ottenuta è lavata dal sangue, asciugata su di un filtro di carta e quindi congelata. Con questa tecnica si ottengono campioni di 1,00-1,25 g di peso. Per poter essere portata a termine, questa procedura richiede circa 15 minuti per animale (Erwin *et al.*, 1956).

Un altro strumento utile per le biopsie epatiche è stato descritto da Hughes. Questo strumento non prevede l'utilizzo di una siringa per creare all'interno della cannula la pressione negativa. Quest'ultima viene infatti creata grazie alla presenza di un anello costituito da una particolare plastica (neoprene) e posizionato alla base della cannula. Eccetto l'anello di neoprene, tutte le altre componenti sono in acciaio. La cannula avvolge il trocar e alla sua base è presente l'anello di neoprene che la circonda strettamente e garantisce una chiusura ermetica a questo livello. Quando il trocar viene tirato indietro, si ottiene un vuoto parziale all'interno della cannula e questo permette l'aspirazione del campione di fegato. Essa può presentare due diversi diametri, ma una lunghezza costante. Esiste una cannula di 31,00 cm di lunghezza, con il diametro esterno pari a 11,51 mm e quello interno di 9,53 mm, oppure un'altra di lunghezza pari a 31,00 cm, con il diametro esterno di 9,53 mm e quello interno di 7,94 mm. Il trocar, invece, ha una lunghezza costante di 34,50 cm. Esso è quindi leggermente più lungo della cannula e il suo diametro è solo un po' più piccolo, quel tanto che basta per scivolare senza troppi attriti al di sotto della cannula. La parte terminale del trocar è zigrinata per rendere più salda l'impugnatura dello strumento (Hughes, 1962) (Figura 3).

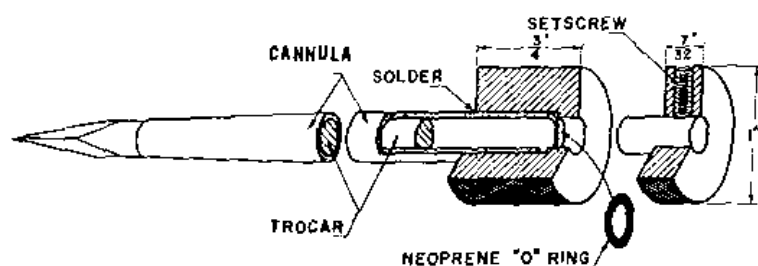


Figura 3.

Trocar dotato di anello in neoprene alla base della cannula.

L'anello di neoprene garantisce una chiusura ermetica tra il trocar e la cannula. Quando il trocar viene ritirato, si crea un vuoto parziale che permette l'aspirazione del campione di fegato (Hughes, 1962).

Per quanto riguarda la tecnica bioptica, anche in questo caso è necessario eseguire la tricotomia e la disinfezione della cute. Prima di introdurre lo strumento si esegue un'incisione di circa 1,50 cm mediante bisturi, parallela alle coste e distante 15,00-20,00 cm dalla linea del dorso. Nemmeno in questo caso è previsto alcun tipo di anestesia. Hughes afferma che gli ultimi tre spazi intercostali possono essere utilizzati indifferentemente, a patto che la direzione data al trocar cambi. Se si effettua la biopsia a livello di decimo spazio intercostale, il trocar deve essere direzionato posteriormente verso il ginocchio (questo potrebbe causare la perforazione del diaframma, ma non sono stati riscontrati effetti negativi in seguito a questa manovra). Se si utilizza l'undicesimo spazio, il trocar deve essere inserito in avanti verso la spalla opposta della bovina. Invece, nel caso in cui si incida il dodicesimo spazio, l'ago deve essere diretto verso l'interno del torace a livello della spalla. Una volta inserito il trocar all'interno del parenchima epatico, esso viene ritirato per circa 10,00 cm, permettendo di ottenere una pressione negativa all'interno della cannula. Quest'ultima viene poi fatta avanzare per 5,00-7,00 cm all'interno del parenchima mediante un movimento rotatorio. Una volta ottenuto il campione, lo strumento viene rimosso dalla parete addominale della bovina. La soluzione di continuo cutanea non viene suturata. Con questa tecnica si ottengono campioni di 3,80-5,11 grammi di peso, a seconda del diametro dello strumento che si utilizza (Hughes, 1962).

Una variante alla tecnica bioptica per aspirazione utilizzata da Erwin *et al.* è quella descritta da Chapman *et al.* nel 1963. La tecnica presentata da questi Autori si effettua a livello dell'undicesimo spazio intercostale e ha come particolarità quella di penetrare il diaframma per raggiungere il fegato. Lo strumento utilizzato è costituito da un trocar di una lunghezza pari a 33,65 cm e di diametro pari a 1,27 cm, mentre la cannula è lunga 20,32 cm. Essa è posizionata al di sopra del trocar e ha un diametro leggermente superiore a esso. Tutto lo strumentario è di acciaio, eccetto l'impugnatura del trocar, che è di legno (Chapman *et al.*, 1963) (Figura 4).

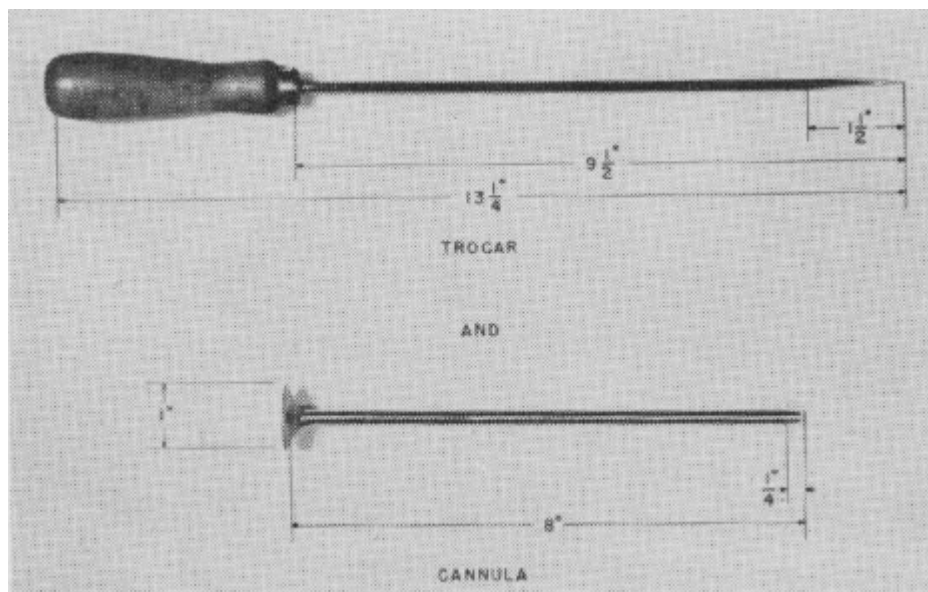


Figura 4.

Trocar e cannula utilizzati per la tecnica biptica per aspirazione (Chapman *et al.*, 1963).

La vacca viene immobilizzata all'interno di un travaglio e si raso un'area sul fianco destro di 20,00 cm di lato, che comprende gli ultimi tre spazi intercostali, posizionata approssimativamente 30,00 cm ventralmente la linea mediana del dorso. Non si effettua alcun tipo di anestesia. L'area priva di pelo viene lavata e disinfettata e si incide la cute mediante bisturi per una lunghezza pari a circa 1,00 cm a livello dell'undicesimo spazio intercostale, 15,00-20,00 cm ventralmente la linea mediana del dorso. Se la vacca tende ad essere irrequieta e a muoversi in avanti e indietro, può essere utile utilizzare una lama di rasoio, anziché il bisturi, per effettuare l'incisione cutanea (Chapman *et al.*, 1963).

Quest'operazione può essere utile perché la lama del rasoio è afferrata direttamente dal pollice e l'indice, permettendo in tal modo di avere un maggior controllo di fronte a movimenti improvvisi dell'animale. Una volta effettuata l'incisione cutanea, il trocar, con sopra posizionata la cannula, viene inserito nell'undicesimo spazio intercostale, attraverso il tessuto connettivo che sostiene le coste, in direzione anteriore. La lunghezza del trocar e la direzione con cui esso viene introdotto causano la penetrazione del diaframma. Appena questo avviene, il trocar deve essere rimosso velocemente dalla cannula e quest'ultima deve essere fatta avanzare ulteriormente all'interno del parenchima epatico mediante un movimento rotatorio.

L'avanzamento della cannula deve proseguire fino a che la resistenza offerta dal parenchima epatico non si fa eccessiva. A questo punto si deve creare la pressione negativa che permette l'aspirazione del campione di fegato all'interno della cannula. Si ottiene una tale condizione chiudendo con il pollice l'estremità prossimale della cannula e ritirandola con delicatezza dal parenchima epatico. Secondo Chapman *et al.* l'uso del pollice, invece della siringa, evita l'aspirazione di sangue o di altri fluidi che possono inquinare la biopsia epatica. Conclusa la tecnica bioptica, l'incisione non viene suturata (Chapman *et al.*, 1963) (Figura 5).

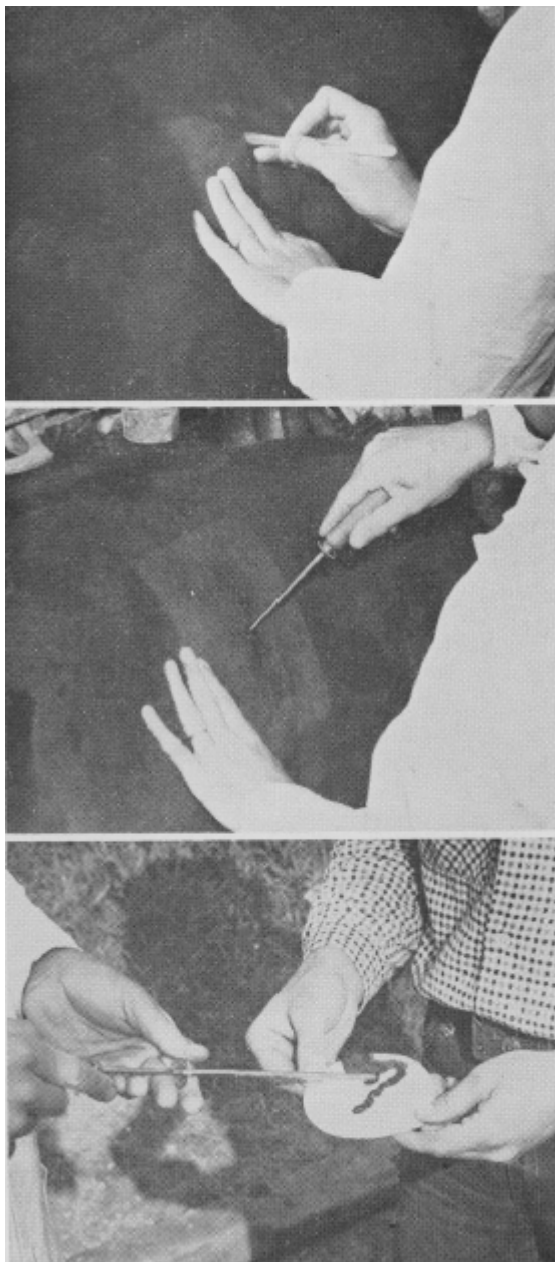


Figura 5.

Incisione dell'animale, penetrazione dello strumento bioptico all'interno dell'undicesimo spazio intercostale e tipico esempio di un campione bioptico epatico ottenuto (Chapman *et al.*, 1963).

2.2.3 L'Ethmoid Rongeurs come strumento per la biopsia epatica

Un altro strumento utile per effettuare biopsie epatiche, descritto da Swanson *et al.* nel 2000, è l'Ethmoid Rongeurs. Si tratta di uno strumento utilizzato in chirurgia artroscopica ed è caratterizzato da due terminazioni smussate, ma con bordi taglienti (Figura 6). L'Ethmoid Rongeurs si impugna come una forbici e la ganaschia viene aperta e subito richiusa, quando si raggiunge la faccia parietale del fegato. In questo modo, i bordi taglienti effettuano sul parenchima epatico una sorta di "morso" che permette di ottenere il campione. Il peso del campione ottenibile si aggira attorno ai 20,00-50,00 mg. Questa tecnica presenta diversi vantaggi: la semplicità di utilizzo dello strumento e la velocità con cui viene effettuato il campione. Tuttavia le terminazioni smussate dello strumento rendono difficile la penetrazione dei tessuti. Per questo motivo si rende necessaria, oltre alla solita incisione cutanea, un'ulteriore soluzione di continuo a livello peritoneale. Vengono così incrementate le probabilità di emorragia e aumentati i tempi di recupero. A ciò si aggiungono le difficoltà nel capire se la penetrazione dello strumento sta interessando o meno il parenchima epatico e, inoltre, le eccessive lesioni che l'Ethmoid Rongeurs può, in alcuni casi, provocare sulla capsula e sul parenchima epatici (Swanson *et al.*, 2000).



Figura 6.
Ethmoid Rongeurs, strumento utilizzato
in chirurgia artroscopia.

2.2.4 Tecniche di biopsia epatica mediante ago Tru-Cut

Questa tipologia di tecnica è stata descritta per la prima volta da Pearson e Craig nel 1980.

L'ago da biopsia Tru-Cut è costituito da uno stiletto avvolto esternamente da una cannula, in maniera simile allo strumento per l'aspirazione. Le dimensioni dell'ago possono variare, ma solitamente il diametro è pari a 14 G (2,10 mm) e la lunghezza è di 15,00 cm. Lo stiletto possiede un incavo all'interno del quale viene raccolto il campione di fegato e la cannula può essere fatta avanzare in avanti rispetto allo stiletto. Quando lo strumento è "carico", cioè pronto per effettuare la biopsia, lo stiletto è completamente ricoperto dalla cannula e, di conseguenza, l'incavo non è visibile. Al termine della cannula è posizionato un collare che deve essere appoggiato alla cute al fine di migliorare la fermezza con cui viene effettuata la biopsia. Una volta individuata la sede da campionare, l'ago viene immobilizzato e lo stiletto viene fatto avanzare oltre la cannula, permettendo in tal modo all'incavo di riempirsi di tessuto. Quindi, mediante un pistone, la cannula viene a sua volta fatta scattare in avanti, tranciando in questo modo il campione e coprendo l'incavo dello stiletto. Questo movimento della cannula permette, inoltre, di evitare la fuoriuscita del campione dall'incavo quando l'ago viene rimosso (Figura 7). Una volta individuato l'undicesimo spazio intercostale, si procede alla tricotomia e disinfezione di un'area di cute di circa 10,00 cm di lato, posizionata circa 30,00 cm ventralmente la linea mediana del dorso, sul lato destro della bovina. Non si compie alcun tipo di anestesia. Si effettua un'incisione con bisturi di 1,00-1,50 cm. Quindi, si inserisce l'ago Tru-Cut "caricato" attraverso la cute e la muscolatura intercostale. Si avanza all'interno della cavità peritoneale e si penetra il fegato per una profondità di 1,00-3,00 cm. Si fa avanzare lo stiletto in modo tale da riempire l'incavo di tessuto. A questo punto si fa scattare in avanti la cannula mediante il pistone e si ritira all'esterno l'ago. L'incisione cutanea effettuata con il bisturi non viene suturata (Pearson and Craig, 1980; Buckley *et al.*, 1986).

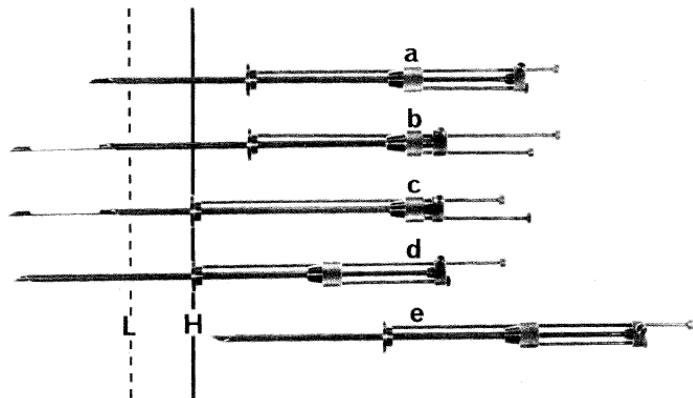


Figura 7.

H = cute (hide), L = fegato (liver)

- A. Penetrazione all'interno del fegato con stiletto coperto dalla cannula.
- B. Avanzamento dello stiletto all'interno del parenchima epatico.
- C. Il collare viene appoggiato alla cute.
- D. Avanzamento della cannula al di sopra dello stiletto.
- E. Lo strumento viene ritirato, con il campione all'interno dell'incavo dello stiletto
(Buckley *et al.*, 1986).

Gli aghi Tru-Cut che vengono commercializzati e utilizzati oggi sono sostanzialmente uguali a quelli descritti da Pearson e Craig nel 1980. Le uniche differenze riguardano l'assenza del collare alla base della cannula e la lunghezza maggiore dello strumento, solitamente pari a 20,00 cm.(Figura 8).



Figura 8.

Ago per biopsia istologica semiautomatico della Zamar s.r.l.®, modello Ultimate®, di diametro pari a 14 G e lunghezza pari a 20,00 cm. Si tratta di un sistema semiautomatico per biopsia dotato di impugnatura, ago trocar a punta tranciante, cannula centimetrata, mandrino non estraibile con incavo per la cattura del campione e punta penetrante a triplice affilatura. Lo strumento è a ghigliottina, con fermo di sicurezza e dotato di marker ecogeno interno per una migliore visualizzazione ecografica.

Il peso del campione, che può essere ottenuto con questa tecnica, è pari a 10,00-15,00 mg.

2.2.5 Confronto tra le tecniche per aspirazione e mediante ago Tru-Cut

Confrontando le tecniche di biopsia epatica ottenuta per aspirazione, con quelle che prevedono l'utilizzo di Tru-Cut, si possono notare alcune differenze.

I campioni che le tecniche per aspirazione permettono di avere sono di dimensioni maggiori rispetto a quelli ottenibili mediante ago Tru-Cut. Questi ultimi possono, infatti, essere in alcuni casi non idonei ad alcune prove laboratoristiche. Tuttavia, con le tecniche per aspirazione che prevedono l'utilizzo della siringa, si può talvolta avere la perdita del campione che si sta tentando di raccogliere a causa della mancanza di pressione negativa all'interno della siringa. Questo sembra essere dovuto, nella maggior parte dei casi, a difetti nell'attacco tra siringa e cannula. Inoltre, l'eccessiva aspirazione che si esercita può causare la macerazione dello stesso (Buckley *et al.*, 1986).

Sempre con la tecnica per aspirazione, si può determinare un eccessivo sanguinamento proveniente dal parenchima epatico, causato dalla penetrazione di vasi di diametro elevato, soprattutto se si introduce la cannula a livello di ilo portale. La causa di tale evento è da imputare alla profonda penetrazione del parenchima epatico, durante la raccolta del campione epatico (Hughes, 1962).

Inoltre, l'utilizzo del trocar può creare alcuni problemi. Esso è più difficile da controllare e meno preciso nel corso della biopsia rispetto all'ago Tru-Cut e crea maggiori lesioni nel parenchima epatico dovute alle sue dimensioni mediamente maggiori (Swanson *et al.*, 2000).

Infine, con la tecnica illustrata da Chapman *et al.*, c'è la possibilità di causare un pneumotorace, nel caso in cui il trocar venga rimosso prima di far passare la cannula attraverso il diaframma. Questo può avvenire per il passaggio di aria dalla cavità addominale a quella toracica (Buckley *et al.*, 1986).

2.2.6 Possibili effetti collaterali e lesioni secondarie alla tecnica bioptica

Gli effetti collaterali e le lesioni che si possono riscontrare in seguito alla tecnica bioptica non sono molti. In generale, tutte le tecniche illustrate precedentemente, sia quelle che utilizzano uno strumento per aspirazione, sia quelle che impiegano l'ago Tru-Cut o l'Ethmoid Rongeurs, possono essere ritenute sicure. È importante sottolineare che nessuna delle metodologie descritte finora è eco-guidata.

I risultati riportati in letteratura confermano che queste metodologie non comportano, nella quasi totalità delle bovine, diminuzioni dell'ingestione della sostanza secca o cali nella produzione di latte (Reid, 1980).

I rari effetti indesiderati che si possono eventualmente manifestare sono ben descritti e riassunti da Smart e Northcote nel 1985. Costoro utilizzano per il loro studio una tecnica per aspirazione con strumento costituito da trocar, cannula e siringa come descritto da Dick nel 1952. La sede di penetrazione scelta è l'undicesimo spazio intercostale. Smart e Northcote riportano che circa lo 0,20 % di animali sottoposti a biopsia presentava un leggero dolore addominale in seguito alla procedura, ma questo si risolveva in due o tre giorni in assenza di trattamenti. Se, invece, alcuni animali manifestavano un calo dell'ingestione di sostanza secca o febbre, un trattamento antibiotico sistemico per cinque giorni era sufficiente a risolvere i segni clinici. Altre possibili complicazioni descritte sono: l'aspirazione di un ascesso, la biopsia di rene e di pancreas anziché di fegato (0,50%), la dispnea e la respirazione a bocca aperta (0,50%). Quest'ultima condizione si è poi risolta autonomamente in circa 30-60 minuti e la causa è stata attribuita ad un pneumotorace temporaneo, non confermato a causa della rapidità con cui la bovina è tornata ad una respirazione normale. Una complicazione più comune, che ha colpito il 5,00% di vacche sottoposte a biopsia, è stata la penetrazione di rami della vena epatica o della vena porta con conseguente emorragia testimoniata dall'aspirazione di sangue all'interno della siringa (Smart and Northcote, 1985).

Altre complicazioni conseguenti alla tecnica bioptica per aspirazione eseguita a livello degli ultimi tre spazi intercostali possono essere: peritonite biliare causata dalla penetrazione di grossi vasi biliari e peritonite settica da aspirazione di un ascesso.

L'incidenza di questi effetti collaterali hanno interessato lo 0,60% degli animali (Hughes, 1962).

Quindi, le conseguenze che si possono avere più facilmente in animali sottoposti a biopsia epatica sono: abbattimento dello stato del sensorio e possibile febbre, dispnea, prelievo di tessuto renale o pancreatico anziché epatico, emorragia in seguito alla penetrazione di grossi vasi ematici, aspirazione di ascessi con conseguente possibile peritonite settica data dalla diffusione di batteri anaerobi e peritonite biliare causata dalla penetrazione di vasi biliari. È importante sottolineare che la probabilità con cui queste conseguenze negative possono verificarsi nel corso di un prelievo bioptico sono esigue, poiché la maggior parte delle fonti presenti in letteratura non fa alcun riferimento a effetti collaterali. Nel caso in cui siano stati constatati effetti negativi, questi hanno riguardato un numero di animali sicuramente minimo (meno del 5,00%) (Smart and Northcote, 1985).

L'insorgenza di tali conseguenze negative diminuisce se si utilizza la tecnica Tru-Cut invece della tecnica per aspirazione, per via delle minori dimensioni dello strumento e, quindi, del minor trauma a cui viene sottoposto il parenchima epatico (Buckley *et al.*, 1986).

L'Ethmoid Rongeurs presenta lo svantaggio di provocare lesioni sostanziali a carico della capsula e del parenchima epatici. Per queste ragioni questo strumento non viene normalmente utilizzato (Swatson *et al.*, 2000).

Per quanto riguarda le possibili lesioni in corrispondenza del sito di ingresso cutaneo operato dallo strumento/ago da biopsia la letteratura non riporta effetti negativi. In nessun caso sono documentate complicazioni quali cicatrici o ascessi, nemmeno quando l'unica preparazione della cute consisteva nella tricotomia, senza successivamente effettuare alcun tipo di disinfezione (Smart and Northcote, 1985).

Inoltre, la letteratura riporta che non sono evidenziabili lesioni a livello del parenchima epatico in bovine sottoposte a biopsia epatica e successivamente inviate al macello. Il punto di entrata dell'ago all'interno del fegato macroscopicamente non rivela mai la presenza di ascessi o adesioni, nemmeno nei casi in cui siano state effettuate ripetute biopsie dallo stesso punto (Ames *et al.*, 1980; Hickok *et al.*, 1996).

Da un punto di vista istologico, il sito di biopsia epatica può rilevare nella maggioranza dei casi la presenza di una cicatrice in corrispondenza della capsula

glissoniana e un mantenimento della normale architettura epatica ventralmente a questa, oppure la presenza di una cicatrice a carico della capsula al di sotto della quale l'architettura epatica è persa. In corrispondenza di questo punto, si nota la presenza di tessuto fibroso che, estendendosi dalla capsula epatica, si infiltra all'interno del parenchima epatico in corrispondenza del sito di ingresso dello strumento biptico. Questo tessuto fibroso, che si approfondisce per 3,00-4,00 mm, non presenta vascolarizzazione, né si osservano cellule infiammatorie in corrispondenza dell'area fibrotica (Smart and Northcote, 1985).

2.3 Esame ecografico del fegato

2.3.1 Scopi di utilizzo dell'ecografia epatica

L'esame ecografico del fegato nella vacca da latte può essere eseguito durante l'esame clinico dell'animale per analizzare direttamente alcune caratteristiche specifiche dell'organo e per riscontrare eventuali alterazioni. Quest'ultime risultano spesso difficilmente indagabili solo mediante la determinazione di enzimi epatospecifici con analisi del sangue. Da qui viene l'utilità, all'interno dell'iter diagnostico, di un esame diretto del fegato tramite ecografo (Braun, 1996).

Durante l'esame ecografico del fegato, devono essere valutate le dimensioni, forma e posizione dell'organo, il pattern e l'ecogenicità del parenchima, la localizzazione dei vasi sanguigni, la presenza di strutture neoformate quali ascessi, tumori o metastasi, la presenza di aree diffuse o localizzate nel parenchima del fegato di infiltrazioni lipidiche anomale, colestasi o calcificazioni dei dotti biliari (Itabisashi *et al.*, 1987; Lechtenberg and Nagaraja, 1991; Braun and Pusterla, 1995).

L'ecografia del fegato, oltre che per una sua valutazione in toto, viene anche utilizzata per effettuare alcune manualità eco-guidate che prevedono cioè la contemporanea visualizzazione ecografica del fegato alla tecnica che si vuole mettere in atto. Tra queste, sono state descritte la biopsia epatica eco-guidata per analisi istologiche, citologiche e batteriologiche, la colecistocentesi e aspirazione di bile per la determinazione di acidi biliari e per l'analisi microscopica della bile per la ricerca di uova di trematodi quali *Fasciola hepatica* e *Dicrocoelium dendriticum*, la centesi della vena porta per fini sperimentali (Braun and Gerber, 1992; Braun *et al.*, 2003).

Inoltre, l'ecografia del fegato è una tecnica che è stata utilizzata anche per la diagnosi di trombosi della vena cava caudale e la dilatazione dei dotti biliari attribuibili a ostruzione del dotto coledoco (Braun and Gerber, 1992; Braun 2003).

2.3.2 Tecnica di esecuzione dell'ecografia epatica

La tecnica ecografica applicata allo studio del fegato si esegue sul lato destro dell'animale mantenuto in stazione. Si analizza un'area della parete toracica compresa tra il settimo e il dodicesimo spazio intercostale. Questi rappresentano le finestre acustiche per la penetrazione delle onde sonore. In realtà, gli spazi intercostali compresi tra il settimo e il nono spazio non permettono un'ottimale visualizzazione del fegato a causa dell'interposizione di tessuto polmonare. Quindi, a questo livello, difficilmente si riescono a visualizzare particolari strutture epatiche, per cui ci si limita unicamente a una valutazione soggettiva del parenchima. In definitiva, gli spazi intercostali utili ai fini dell'esame ecografico del fegato sono il decimo, l'undicesimo e il dodicesimo (gli ultimi tre) per una larghezza in senso dorso-ventrale pari a 20,00-30,00 cm (Braun, 1990).

Quest'area deve quindi essere rasata e sgrassata mediante l'uso di alcool al fine di evitare l'interposizione di aria tra i peli e allontanare detriti e sporcizia dalla cute che potrebbero ostacolare una corretta visualizzazione ecografica. Solitamente si effettua la tricotomia per uno spazio che si estende dal settimo spazio intercostale fino ad un palmo di mano caudalmente il dodicesimo. Si applica, quindi, il gel per ultrasonografia e si posiziona la sonda (Braun, 2003).

In generale, durante un esame ecografico la scelta della sonda da utilizzare varia a seconda della profondità e della risoluzione che si vogliono ottenere. Queste due grandezze, infatti, sono inversamente correlate: diminuendo la frequenza di onde sonore emessa dalla sonda, aumenta la loro capacità di penetrazione, ma diminuisce la risoluzione con cui sono visualizzate le immagini ecografiche. Al contrario, aumentando la frequenza, diminuisce la loro capacità di penetrazione, ma si migliora la risoluzione dell'immagine ecografica. Quindi, con sonde che emettono frequenze di 5,0-7,5 e 10,0 MHz è possibile analizzare strutture più vicine alla parete costale della bovina, mentre con una sonda da 2,5 MHz si valutano organi e tessuti che distano più di 20,00 cm dalla parete (Wrigley, 1985).

Per lo studio del fegato è consigliata una sonda convex da 3,5 MHz che permette una penetrazione delle onde sonore per circa 17,00 cm. Con questa profondità si può analizzare correttamente la maggior parte del parenchima dell'organo.

È importante ricordare però che l'esame ultrasonografico del fegato in vacche ben nutrite e, quindi, con una parete toracica più spessa, a causa della maggiore deposizione di grasso sottocutaneo, è più complicato perché la profondità di penetrazione, che può raggiungere la sonda da 3,5 MHz, può essere insufficiente. In questi casi è consigliata una frequenza pari a 2,5 MHz (Braun, 1996).

Il movimento che la sonda compie in corrispondenza dello spazio intercostale deve cominciare dorsalmente e dirigersi ventralmente per un'ampiezza di circa 15,00 cm. Vengono individuati i margini dorsale e ventrale del fegato e si rapportano con la linea mediana del dorso. Questo permette di determinare le dimensioni dell'organo in un dato spazio intercostale. Infatti, sottraendo la distanza che intercorre tra il margine dorsale del fegato e la linea mediana del dorso alla distanza che intercorre tra il margine ventrale del fegato e la linea mediana del dorso, è possibile ottenere la dimensione del fegato in quello specifico spazio intercostale. Effettuando queste misurazioni su più spazi intercostali, ovvero dal settimo al dodicesimo, è possibile acquisire le dimensioni dell'organo in toto. Lo stesso principio può esser applicato per determinare la profondità a cui si trova la vena cava caudale e la vena porta e per conoscere il loro diametro a livello di undicesimo spazio intercostale (Braun and Gerber, 1994).

2.3.3 Caratteristiche ecografiche del fegato

Il pattern ecografico di un fegato normale consiste in numerosi echi deboli distribuiti omogeneamente su tutta l'area del fegato. L'ecogenicità del parenchima è media (ipoecogeno rispetto alla milza, leggermente iperecogeno rispetto alla corticale del rene). I margini appaiono lisci e acuti. Le dimensioni normali del fegato, misurate come precedentemente descritto, appaiono pressoché uguali nell'undicesimo e nel dodicesimo spazio intercostale ($24,90 \pm 3,89$ cm e $26,90 \pm 2,94$ cm), mentre tendono a diminuire nel decimo spazio intercostale ($20,70 \pm 3,11$ cm) a causa della conformazione distale dell'organo. Quando le dimensioni in corrispondenza del dodicesimo spazio intercostale superano i 35,00 cm, si può sospettare una epatomegalia (Braun, 1994) (Tabella 1).

Lo spessore del fegato è misurato, in corrispondenza degli ultimi tre spazi intercostali, al di sopra della vena cava caudale e della vena porta (Shirai *et al.*, 2005).

Una volta memorizzata l'immagine ecografica in corrispondenza del picco inspiratorio della bovina, si determina la distanza tra la faccia diaframmatica del fegato e la vena cava caudale e tra la faccia diaframmatica e la vena porta. Comparando questi due valori ottenuti con quelli descritti dagli Autori, si può misurare lo spessore dell'organo. In particolare questo valore, al di sopra della vena cava caudale, non deve superare i 14,10 cm nel dodicesimo spazio, i 12,00 cm nell'undicesimo e i 10,90 nel decimo. Invece, al di sopra la vena porta, non deve superare i 15,40 cm nel dodicesimo spazio intercostale, i 14,80 cm nell'undicesimo e i 14,30 cm nel decimo (Braun, 1990).

Valori maggiori di questi possono essere indicativi di uno stato di epatomegalia. Le vene porta ed epatica possono essere viste all'interno del parenchima epatico e il loro lume appare anaecogeno e quindi nero. Questi due vasi si differenziano eventualmente sulla base dell'ecogenicità della parete oppure a livello di ilo portale (Braun, 1990).

La parete della vena porta è caratterizzata da una maggiore ecogenicità e questo la rende facilmente riconoscibile. Il secondo metodo per differenziare i due vasi è quello di cercare l'ilo portale, che si trova posizionando la sonda sull'undicesimo spazio intercostale, 30,00 cm distalmente alla linea mediana del dorso. In questa sede la vena porta, a differenza di quella epatica, appare caratterizzata da ramificazioni stellate (Braun, 1990).

Talvolta la vena porta e la vena cava caudale, visibili entrambe a carico degli ultimi due spazi intercostali, sono distinguibili misurando il loro diametro: quello della vena porta è sempre maggiore rispetto a quello della vena cava caudale. In particolare, il diametro della vena porta è variabile tra 3,00 e 4,00 cm (3,50 cm a livello di dodicesimo spazio intercostale e 3,60 cm nell'undicesimo in media), mentre il diametro della vena cava caudale è variabile tra 2,80-3,50 cm (3,20 nel dodicesimo e 3,00 nell'undicesimo spazio intercostale in media). Se il primo vaso citato supera il diametro di 4,50 cm o se il secondo supera i 4,00 cm si sospetta una dilatazione dovuta, per esempio, a stasi venosa. Entrambi i vasi sono visibili solitamente a livello

degli ultimi due spazi intercostali: più cranialmente non sono indagabili a causa dell'interposizione di tessuto polmonare.

La direzione che la vena cava caudale assume, va da caudodorsale a cranioventrale, allo stesso modo del margine dorsale del fegato. La distanza tra il margine dorsale della vena cava caudale e la linea mediana del dorso dell'animale è mediamente di $19,90 \pm 2,27$ cm nel dodicesimo spazio intercostale e $21,50 \pm 2,55$ cm nell'undicesimo. La vena porta, invece, dista mediamente $26,80 \pm 2,54$ cm nel dodicesimo spazio intercostale e $30,10 \pm 2,35$ cm nell'undicesimo. Quindi il suo decorso è più ventrale di quello della vena cava caudale (mediamente 7,00-13,00 cm al di sotto), pur essendo parallelo a quello di quest'ultima (Braun, 1996).

Il dotto biliare comune si trova ventralmente alla vena porta, mentre i dotti biliari intraepatici non sono normalmente visibili. La cistifellea può essere visualizzata unicamente a livello del dodicesimo spazio intercostale. Essa è una struttura cistica periforme, facilmente riconoscibile, anecogena, con margini ecogeni, di dimensioni variabili, circonferenza mediamente pari a 20,90 cm, lunghezza $8,50 \pm 2,50$ cm, larghezza $3,90 \pm 1,60$ cm. Il margine dorsale è posizionato a una distanza dalla linea mediana del dorso della bovina pari a 42,20 cm in media. Il valore medio della circonferenza della cistifellea è molto variabile a causa del suo stato di replezione, che è soggetto a variazioni quotidiane legate all'ingestione di alimento. Normalmente, essa si estende oltre il margine ventrale del fegato ed è immediatamente adiacente alla parete addominale (Braun and Pusterla, 1996).

		10° spazio intercostale	11° spazio intercostale	12° spazio intercostale
Fegato	dimensioni ⁽¹⁾ (cm)	20,70	24,90	26,90
	spessore al di sopra della vena cava caudale ⁽²⁾ (cm)	10,90	12,00	14,10
	spessore al di sopra della vena porta ⁽³⁾ (cm)	14,30	14,80	15,40
Vena cava caudale	margine dorsale ⁽⁴⁾ (cm)	non visibile	21,50	19,90
	diametro (cm)	non visibile	3,00	3,20
Vena porta	margine dorsale ⁽⁵⁾ (cm)	non visibile	30,10	26,80
	diametro (cm)	non visibile	3,60	3,50
Cistifellea	margine dorsale ⁽⁶⁾ (cm)	non visibile	non visibile	42,20
	lunghezza (cm)	non visibile	non visibile	8,50
	larghezza (cm)	non visibile	non visibile	3,90
	circonferenza (cm)	non visibile	non visibile	20,90

Tabella 1.

Tabella riassuntiva dei valori medi ottenibili effettuando le misurazioni durante l'esame ecografico del fegato.

- (1) Calcolate sottraendo la distanza che intercorre tra il margine dorsale del fegato e la linea mediana del dorso alla distanza che intercorre tra il margine ventrale del fegato e la linea mediana del dorso.
- (2) Distanza tra la faccia diaframmatica del fegato e la vena cava caudale.
- (3) Distanza tra la faccia diaframmatica del fegato e la vena porta.
- (4) Distanza tra il margine dorsale della vena cava caudale e la linea mediana del dorso dell'animale.
- (5) Distanza tra il margine dorsale della vena porta e la linea mediana del dorso dell'animale.
- (6) Distanza dalla linea mediana del dorso dell'animale.

2.3.4 Fattori influenzanti le caratteristiche fisiche del fegato

Solitamente, le vacche più pesanti (da 608 a 760 kg p.v.) e che hanno una produzione di latte maggiore (da 59 a 92 q.li in 305 giorni di lattazione), tendono ad avere un fegato di dimensioni e di spessore maggiori rispetto ad animali più leggeri (da 410 a 607 kg p.v.) e con una produzione latte giornaliera minore (da 32 a 58 q.li in 305 giorni di lattazione). Lo stadio di gravidanza, invece, è positivamente correlato con il diametro della vena cava caudale e negativamente correlato con quello della vena porta. Quindi, con il progredire dello stato di gestazione, la vena cava caudale tende ad aumentare di diametro, mentre la vena porta diminuisce progressivamente. Tale processo sembra dovuto a un maggiore afflusso di sangue proveniente dalle vene uterine all'interno della vena cava caudale, man mano che la gravidanza avanza e le dimensioni del feto aumentano (Braun and Gerber, 1994).

La diminuzione di diametro della vena porta è, invece, dovuta alla diminuzione della quantità di energia che l'animale riceve durante l'asciutta. Ciò causa una diminuzione del flusso di sangue drenato dalle vene mesenteriche all'interno della vena porta. L'età e la razza dell'animale non sembrano influenzare le caratteristiche fisiche dell'organo (Iwao, 1987; Braun and Gerber, 1994).

2.3.5 Principali alterazioni ecografiche rilevabili

Dal punto di vista diagnostico, è importante sapere riconoscere ecograficamente le aree di fegato caratterizzate da infiltrazioni di tessuto adiposo eccessive, le quali sono generalmente localizzate a livello periportale (visibile attraverso l'undicesimo spazio intercostale), vicino alla cistifellea. Dal punto di vista ecografico, esse sono caratterizzate da un aumento dell'ecogenicità. Inoltre, non sono sferiche, non sporgono oltre i margini del fegato e non causano alterazioni topografiche dei vasi adiacenti (Braun and Pusterla, 1996).

Una volta riscontrata una simile area, è necessario porre in diagnosi differenziale una lesione occupante spazio, una metastasi e un tumore. La diagnosi differenziale, nei confronti di tutte le lesioni occupanti spazio e le metastasi, si effettua solitamente

sulla base dell'aspetto sferico che queste hanno a differenza delle aree di steatosi e osservando i loro bordi, che di solito sporgono dalle aree circostanti di parenchima normale. La diagnosi differenziale del tumore può essere effettuata, invece, analizzando il pattern vascolare: esso sarà alterato in corrispondenza della neoplasia. In ogni caso la sede in cui la steatosi epatica è solitamente riscontrabile (area periportale, visibile attraverso l'undicesimo spazio intercostale, vicino alla cistifellea) è molto caratterizzante e questo aiuta nell'effettuare una diagnosi corretta (Mohamed and Oikawa, 2004).

3. MATERIALI E METODI

Lo studio oggetto della presente Tesi è stato effettuato in 6 Aziende di bovine da latte situate nel Nord Italia, nelle quali sono stati testati un totale di 36 animali nel periodo di transizione. Per ciascun animale è stato stimato il body condition score (BCS) e sono stati eseguiti i prelievi bioptici eco-guidati di tessuto epatico e adiposo periviscerale.

3.1 Caratteristiche delle Aziende

Le Aziende allevano bovine di razza Frisona. Si tratta di allevamenti intensivi ad alto livello produttivo, pari a circa 90 q.li di latte per capo in 305 giorni di lattazione, con una percentuale di grasso e proteine di circa 3,64% e di 3,42%. Le Aziende prese in esame presentano le seguenti caratteristiche comuni: un livello produttivo elevato, un numero di capi in lattazione pari a circa 120 animali, stabulazione libera con sistema di rastrelliera ad autocattura, suddivisione delle bovine in gruppi, una durata dell'asciutta di circa 50-60 giorni, distribuzione dell'alimento con tecnica unifeed a base di insilati una volta al giorno.

3.2 Scelta degli animali

Le biopsie eco-guidate sono state effettuate su 36 bovine da latte gravide di razza Frisona. Sono state scelte vacche pluripare, prive di alcuna sintomatologia clinicamente evidente. I prelievi sono stati eseguiti a 15 ± 5 giorni prima della data prevista del parto.

3.3 Rilevazione del BCS

Per prima cosa su ciascuna bovina è stato determinato il body condition score (BCS), secondo la procedura di Edmondson *et al.* (1989).

Il BCS è una valutazione visiva e tattile mediante la quale viene stabilito lo stato nutrizionale, di ingrassamento e lo sviluppo delle masse muscolari di animali in allevamento, basandosi su una scala da 1 a 5. Il punteggio 1 corrisponde a uno stato di estrema magrezza ed emaciazione, mentre il punteggio 5 coincide con uno stato di eccessivo ingrassamento. Il punteggio può avere uno scarto minimo di un quarto di punto (0,25) (Edmondson *et al.*, 1989).

La valutazione è stata effettuata analizzando sistematicamente l'animale sia lateralmente che posteriormente, dalla parte più rostrale a quella più caudale osservando attentamente i profili dei processi spinosi, il profilo tra i processi spinosi e quelli trasversi, quello soprastante il fianco, le tuberosità ischiatiche e coxali, la regione fra natica e anca, il profilo tra le anche e l'area fra l'attacco della coda e la punta delle natiche.

Nel corso della sperimentazione il BCS è stato valutato appena prima dei prelievi bioptici di tessuto epatico e adiposo periviscerale.

3.4 Prelievi bioptici-eco guidati

3.4.1 Materiale utilizzato per effettuare le biopsie eco-guidate

Per eseguire la tricotomia dell'area cutanea è stato utilizzato un rasoio monouso, mentre per effettuare la disinfezione e la preparazione chirurgica della cute sono stati indossati guanti sterili e, successivamente, sono stati effettuati cinque passaggi alternati con alcool e iodio iodoforo (Betadine[®]), utilizzando garze sterili. Per l'incisione della cute è stata utilizzata una lama da bisturi n°10. Per l'anestesia locale sono stati impiegati 10 ml di lidocaina al 2,00%. Per effettuare le biopsie è stato usato un ago Tru-Cut da biopsia istologica per tessuti molli, modello Ultimate[®] della Zamar s.r.l.[©], con diametro pari a 14 G (2,10 mm) e lunghezza di 20,00 cm.

La raccolta dei campioni è avvenuta all'interno di cassette per istologia e in provette crioresistenti CryoVial® (Figura 9).

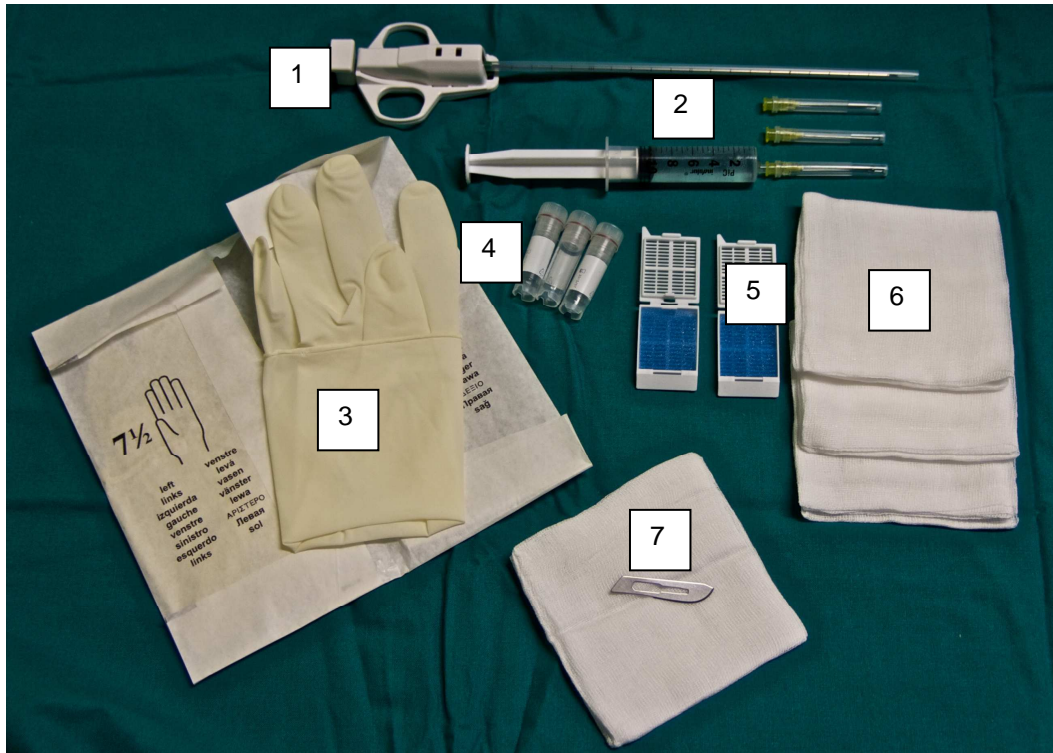


Figura 9.

Elenco dei materiali utilizzati.

- | | |
|---|----------------------------|
| 1: Ago Tru-Cut da biopsia istologica per tessuti molli. | 5: Cassette per istologia. |
| 2: Siringa contenente 10 ml di lidocaina al 2,00%. | 6: Garze sterili. |
| 3: Guanti sterili. | 7: Lama da bisturi n°10. |
| 4: Provette crioresistenti. | |

L'ecografia epatica e del tessuto adiposo periviscerale è stata effettuata grazie all'impiego dell'ecografo portatile MyLab™One Vet® della Esaote S.p.A.®, sistema portatile "arm-held" (Figura 10).

A questo è stata collegata una sonda convex SC3421® multifrequenza da 2,2-4,3-6,6 MHz della Esaote S.p.A.® (Figura 11).



Figura 10.
Ecografo portatile MyLab™One Vet®
della Esaote S.p.A.® .



Figura 11.
Sonda convex SC3421® multifrequenza
da 2,2-4,3-6,6 MHz della Esaote S.p.A.® .

3.4.2 Tipi di biopsia effettuati

Le biopsie effettuate su ciascun animale sono state sei: quattro di tessuto epatico e due di tessuto adiposo periviscerale.

Le biopsie di tessuto adiposo periviscerale sono state realizzate a livello di grande omento. Una delle quattro biopsie epatiche è stata posizionata all'interno di apposita cassetta per istologia e quindi conservata in soluzione acquosa al 4,00% di formaldeide (formalina al 4,00%), mentre le rimanenti tre sono state inserite in apposite provette crioresistenti CryoVial[®], immerse in azoto liquido durante il trasporto e quindi conservate, in attesa delle analisi, a temperatura di -80 °C in congelatore.

Per quanto riguarda le biopsie di tessuto adiposo periviscerale, ne è stata conservata una in formalina al 4,00%, mentre la rimanente è stata immersa in azoto liquido e quindi trasferita e conservata successivamente a temperatura di -80 °C, allo stesso modo delle biopsie epatiche.

3.4.3 Tecnica bioptica utilizzata

Ciascuna biopsia è stata eseguita da unico punto a livello dell'undicesimo spazio intercostale, circa 20,00-25,00 cm dorsalmente alla linea inferiore del Vogel, sul fianco destro dell'animale (Figura 12).

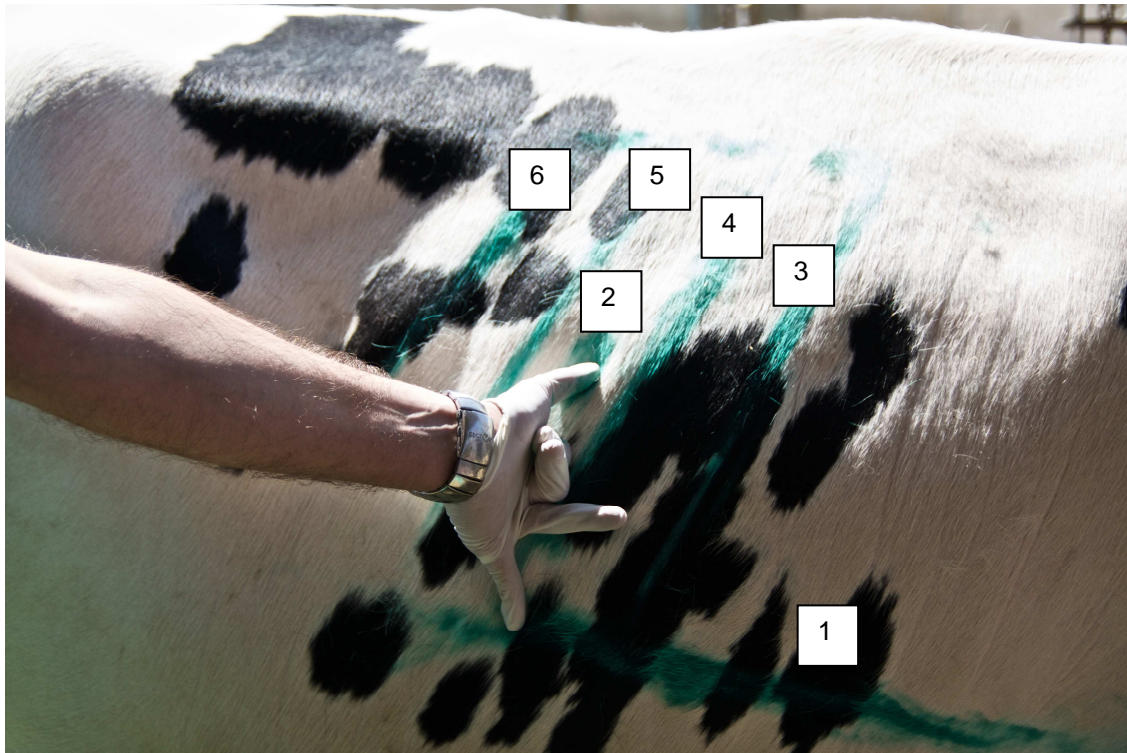


Figura12.

Illustrazione del punto in cui è stato inserito l'ago bioptico.

- 1: Linea inferiore del Vogel.
- 2: Punto di inserimento dell'ago da biopsia, a livello dell'undicesimo spazio intercostale.
- 3: Decima costa.
- 4: Undicesima costa.
- 5: Dodicesima costa.
- 6: Tredicesima costa.

La procedura è cominciata contenendo la bovina, ponendola all'interno dell'autocattura e fissando la coda dorsalmente al garretto sinistro in maniera tale da evitare contaminazioni del campo operatorio precedentemente disinfettato (Figura 13).



Figura 13.

Contenimento della bovina. La vacca è stata posizionata all'interno della autocattura e la coda è stata fissata al garretto sinistro.

È stata eseguita una tricotomia di un'area delle dimensioni di circa 20,00 cm per 20,00 cm in corrispondenza degli ultimi tre spazi intercostali sul fianco destro della bovina. Quest'area è stata realizzata in modo tale da contenere centralmente il punto di inserimento dell'ago bioptico precedentemente individuato (Figure 14 e 15).

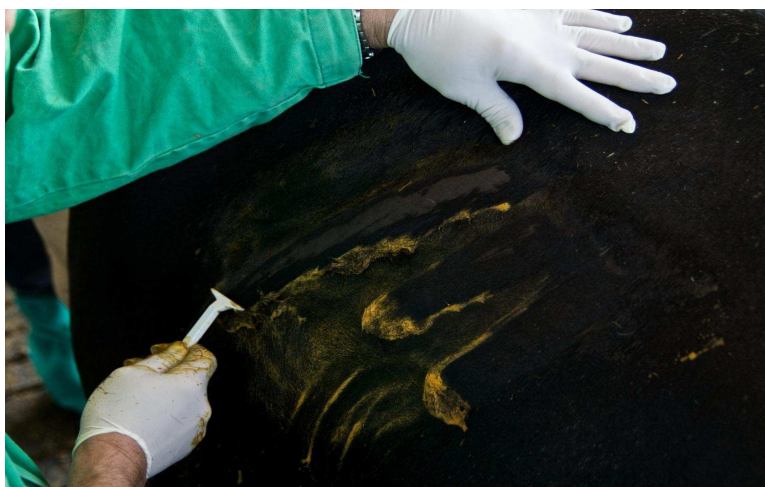


Figura 14.

Tricotomia in corrispondenza degli ultimi tre spazi intercostali sul fianco destro dell'animale.



Figura 15.
Risultato della tricotomia.

Successivamente, è stata visualizzata ecograficamente l'area, apponendo del gel da ecografia sulla porzione di cute rasata e muovendosi con direzione dorso-ventrale a livello del decimo, undicesimo e dodicesimo spazio intercostale (Figura 16).

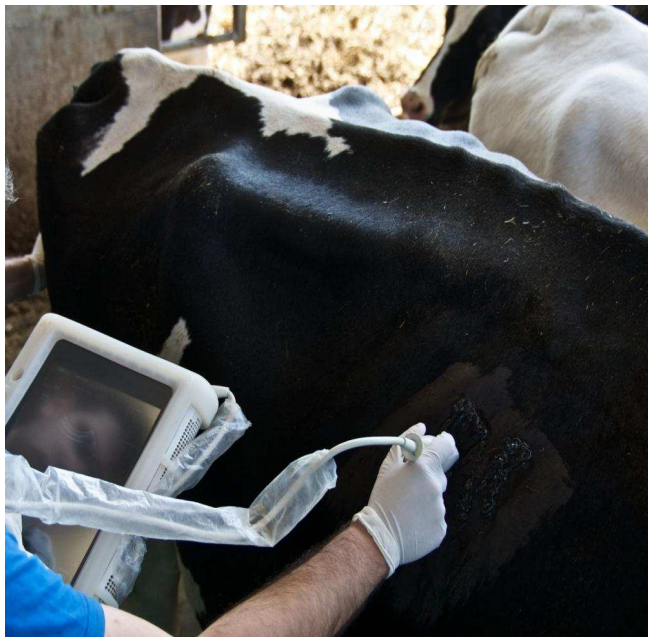


Figura 16.
Visualizzazione ecografica dell'area rasata, attraverso gli spazi intercostali.

L'uso dell'ecografo ha permesso di individuare e di valutare il parenchima epatico e il tessuto adiposo periviscerale del grande omento, oltre che visualizzare la vascolarizzazione epatica, in particolare la vena porta e la vena epatica.

Per riconoscere queste strutture la sonda è stata inclinata ventralmente di circa 45° gradi rispetto ad un immaginario piano orizzontale ed è stata utilizzata una frequenza compresa tra 2,5 e 3,5 MHz, variabile a seconda della bovina in esame. La profondità massima che è stata raggiunta è stata pari a 19,00 cm. Una volta ispezionata ecograficamente l'area di interesse, sono stati indossati guanti sterili ed è stata eseguita una preparazione chirurgica della cute mediante passaggi alternati di iodio iodoforo (Betadine®) ed alcool, ripetuti cinque volte (Figura 17).

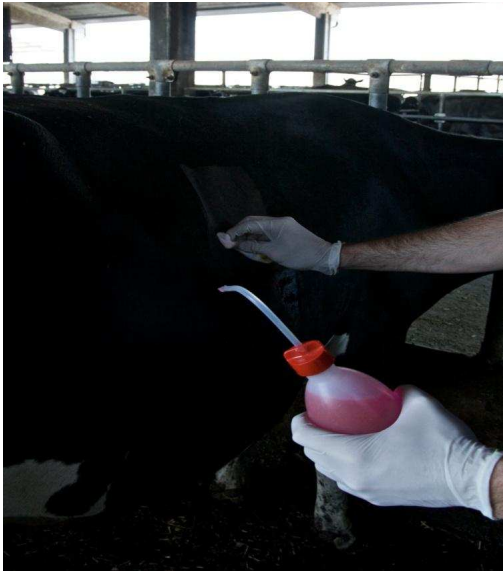


Figura 17.

Disinfezione cutanea mediante alcool e Betadine®.

Terminata la disinfezione della cute si è effettuata un'infiltrazione di anestetico, utilizzando 10 ml di lidocaina al 2,00% (Figura 18).



Figura 18.

Anestesia locale mediante lidocaina al 2,00%.

Si è proceduto, allora, con un'incisione, parallela alle coste, di 1,00-1,50 cm di lunghezza a livello dell'area precedentemente disinfettata per mezzo di una lama da bisturi n°10 afferrata con il pollice e l'indice. Con tale manualità sono stati incisi i piani cutaneo e sottocutaneo, al fine di facilitare la successiva penetrazione dell'ago bioptico Tru-Cut (Figure 19 e 20).

Il punto esatto di incisione di cute e sottocute e, di conseguenza, di inserimento dell'ago è stato deciso sulla base del punto di repere precedentemente descritto e sulla base dei rilievi ecografici.



Figura 19.

Incisione di cute e sottocute mediante lama da bisturi n°10.

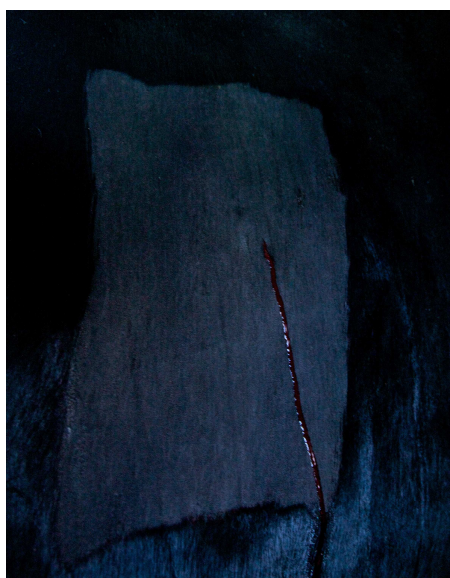


Figura 20.

Incisione di cute e sottocute. Attraverso questa soluzione di continuo verrà successivamente inserito l'ago Tru-Cut.

Prima dell'inserimento dell'ago bioptico all'interno della breccia operatoria, si è messa in tensione la molla del Tru-Cut, tirando il pistone fino a sentire un primo e un secondo scatto. Si è passati, quindi, all'inserimento dell'ago bioptico, nel punto di incisione precedente effettuato, con lo stiletto completamente ritirato (cioè con l'incavo per il contenimento del campione completamente ricoperto dalla cannula) (Figura 21).

Sono stati così trapassati i muscoli intercostali, esterno e interno, e il peritoneo. Procedendo ulteriormente si è penetrato il tessuto epatico, a una profondità mediamente pari a 145,80 mm.

Una volta avuta la conferma ecografica dell'effettivo inserimento del Tru-Cut a carico del fegato, il fermo di sicurezza è stato tolto e il pistone è stato spinto con il pollice per far avanzare lo stiletto nel tessuto da prelevare, riempiendo in questo modo l'incavo di campione. Si è spinto il pistone fino a fine corsa: in questo modo la cannula è scattata in avanti automaticamente, tagliando e racchiudendo il campione nell'incavo dello stiletto.

La stessa procedura è stata ripetuta per i prelievi di tessuto adiposo periviscerale. In questo caso, però, la profondità raggiunta dall'ago bioptico è stata maggiore rispetto al prelievo di tessuto epatico. In questo caso si è inserito l'ago fino a un valore mediamente pari a 166,07 mm.

Per poter eseguire questa manualità sono stati necessari due operatori: il primo ha effettuato la raccolta dei campioni bioptici, mentre il secondo ha eco-guidato il prelievo, ponendo la sonda a fianco dell'ago bioptico in corrispondenza dell'undicesimo spazio intercostale. Questo ha permesso di fornire utili indicazioni sulla profondità e sull'inclinazione che doveva essere data allo strumento e sulla natura del tessuto che si stava prelevando (Figure 22, 23, 24 e 25).



Figura 21.

L'ago da biopsia Tru-Cut viene inserito attraverso la parete toracica dell'animale.



Figura 22.

Biopsia eco-guidata.

Un operatore inserisce l'ago bioptico attraverso l'undicesimo spazio intercostale, mentre l'altro eco-guida il prelievo bioptico.

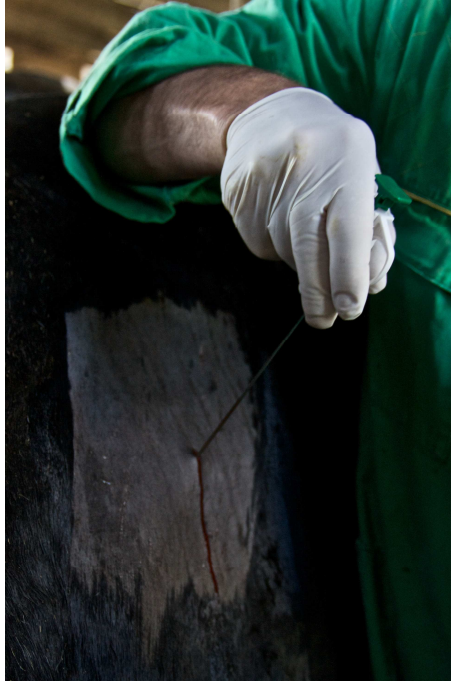


Figura 23.

L'ago da biopsia Tru-Cut viene sfilato dalla parete toracica dell'animale.



Figura 24.

Visualizzazione ecografica dell'ago bioptico durante il prelievo di tessuto epatico.

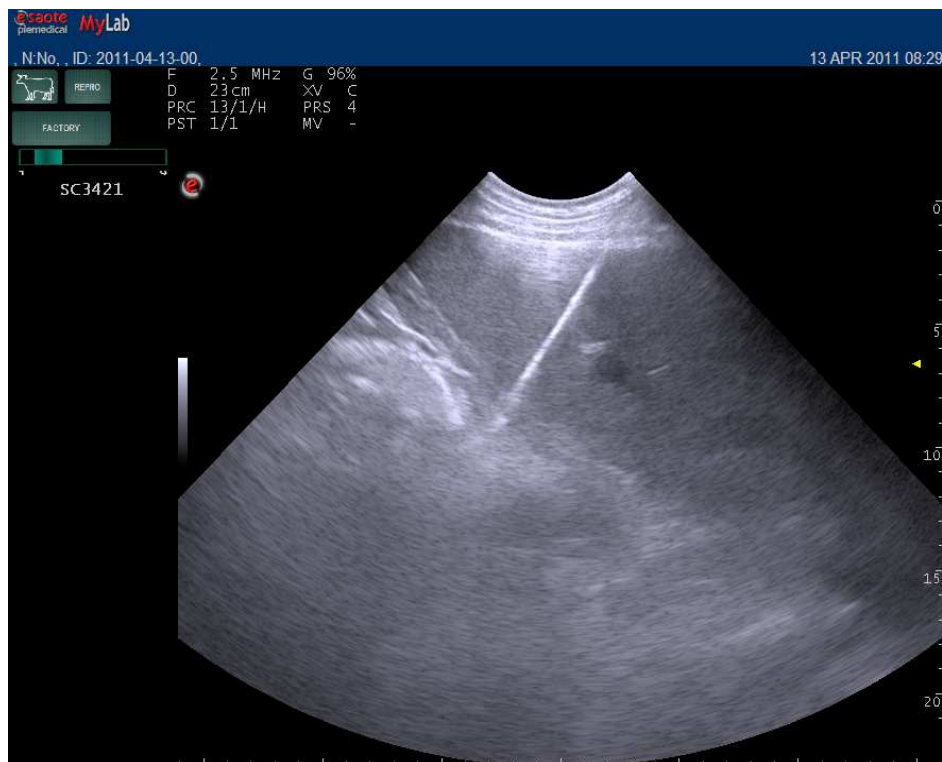


Figura 25.

Visualizzazione ecografica dell'ago biptico durante il prelievo di tessuto adiposo periviscerale.

3.4.4 Raccolta dei campioni bioptici

Una volta estratto l'ago bioptico dallo spazio intercostale, il pistone è stato tirato all'indietro fino a sentire il secondo scatto e, successivamente, è stato spinto in avanti esponendo l'incavo contenente il campione. È stato quindi effettuato un primo prelievo di tessuto epatico: il frammento ottenuto è stato riposto all'interno di una cassetta per istologia, identificata con il numero progressivo corrispondente all'animale in esame (Figure 26, 27 e 28). La cassetta è stata chiusa e immersa in formalina al 4,00% (Figura 29).

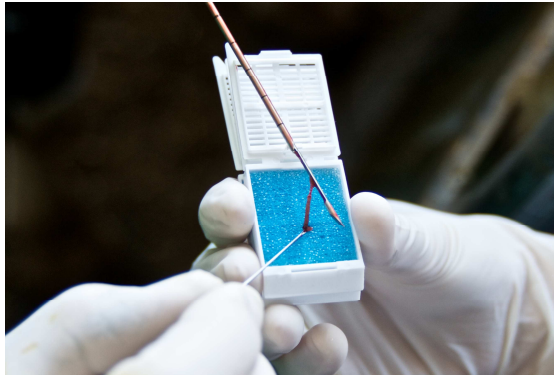


Figura 26.

Posizionamento del tessuto epatico ottenuto all'interno della cassetta per istologia, mediante l'aiuto di un ago.



Figura 27.

Esempio di biopsia epatica ottenuta, all'interno della cassetta per istologia.

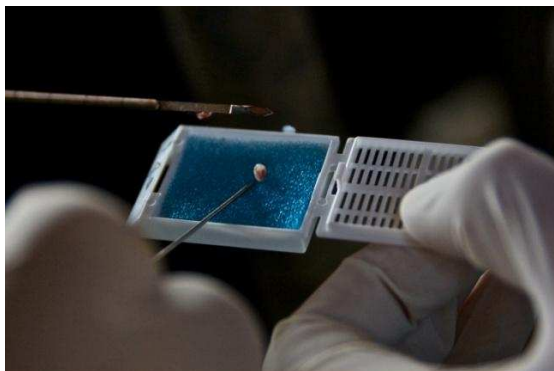


Figura 28.

Posizionamento del tessuto adiposo periviscerale ottenuto all'interno della cassetta per istologia mediante l'aiuto di un ago.



Figura 29.

La cassetta per istologia viene immersa nella formalina al 4,00%.

La medesima procedura è stata ripetuta per altre tre volte al fine di ottenere quattro campioni. Tuttavia, in questi casi, il frammento non è stato riposto all'interno della cassetta per istologia, ma all'interno di provette crio-resistenti, che successivamente sono state immerse in azoto liquido, contenuto in apposito bidone con cestelli estraibili, in attesa di essere conservate in congelatore a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Figure 30, 31 e 32).



Figura 30.

Posizionamento del tessuto epatico ottenuto all'interno della provetta crio-resistente.



Figura 31.

Esempio di campione bioptico epatico ottenuto.



Figura 32.

La provetta crioresistente viene immersa in azoto liquido.

Anche per i campioni biotici di tessuto adiposo periviscerale sono risultate valide le stesse procedure descritte per il parenchima epatico, con le uniche differenze che un solo campione è stato immerso in formalina al 4,00% e uno solo in azoto liquido. I campioni ottenuti misurano 1,80 cm di lunghezza per 2,00 mm di diametro e pesano 10,00- 5,00 mg.

Conclusi i prelievi biotici non è stata effettuata alcuna sutura del punto di incisione effettuato con la lama da bisturi e di entrata dell'ago biotico e la ferita è stata lasciata guarire per seconda intenzione (Figura 33).



Figura 33.

Punto di entrata dell'ago biotico, al termine della raccolta dei campioni.

3.4.5 Analisi delle immagini ecografiche

Le immagini ecografiche memorizzate sul disco rigido dell'ecografo, durante le biopsie eco-guidate, sono state utilizzate per effettuare alcune misurazioni riguardanti il tessuto epatico, la sua vascolarizzazione e il tessuto adiposo periviscerale, al fine di comprendere meglio la disposizione delle strutture anatomiche rilevate a livello dell'undicesimo spazio intercostale.

Queste misurazioni sono state realizzate utilizzando il software, MyLab™ Desk della Esaote S.p.A[®], fornito in dotazione all'ecografo.

Le ecografie hanno rilevato la presenza delle seguenti strutture: parenchima epatico, tessuto adiposo periviscerale, vena porta e vena epatica. Quest'ultima, a questo livello, presenta una ramificazione in due vasi di dimensioni minori (Mohamed *et al.*, 2002; Braun *et al.*, 2003; Shirai *et al.*, 2005) (Figure 34 e 35).

In particolare, in base all'immagine ecografica, sono stati valutati:

- profondità del fegato: definita come la distanza esistente tra il margine ventrale del muscolo intercostale interno e il margine dorsale del tessuto adiposo periviscerale, passante per il centro della vena porta;
- spessore del tessuto adiposo periviscerale: misurato ventralmente alla vena porta;
- profondità del tessuto adiposo periviscerale: definita come la distanza esistente tra il margine ventrale del muscolo intercostale interno e il margine ventrale del tessuto adiposo periviscerale, passante per il centro della vena porta;
- diametro della vena porta;
- diametro della vena epatica;
- profondità della vena porta: definita come la distanza esistente tra il margine ventrale del muscolo intercostale interno e il centro del vaso;
- profondità della vena epatica: definita come la distanza che va dal margine ventrale del muscolo intercostale interno alla biforcazione della vena epatica.

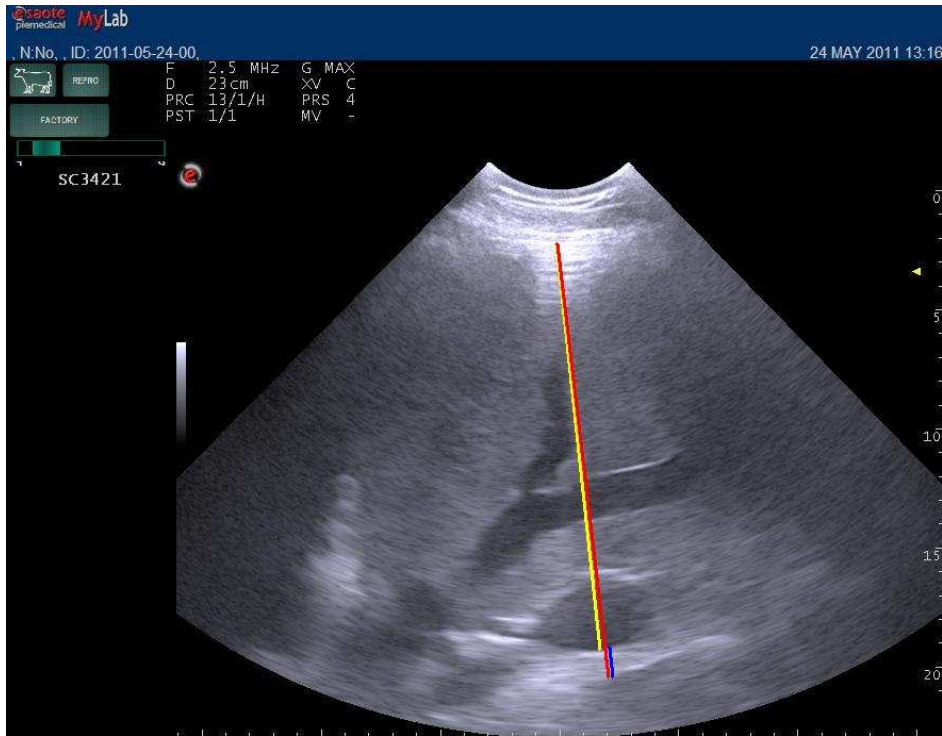


Figura 34.

Viene illustrato come sono stati calcolati la profondità del fegato (linea gialla), lo spessore del tessuto adiposo periviscerale (linea blu) e la profondità del tessuto adiposo periviscerale (linea rossa).

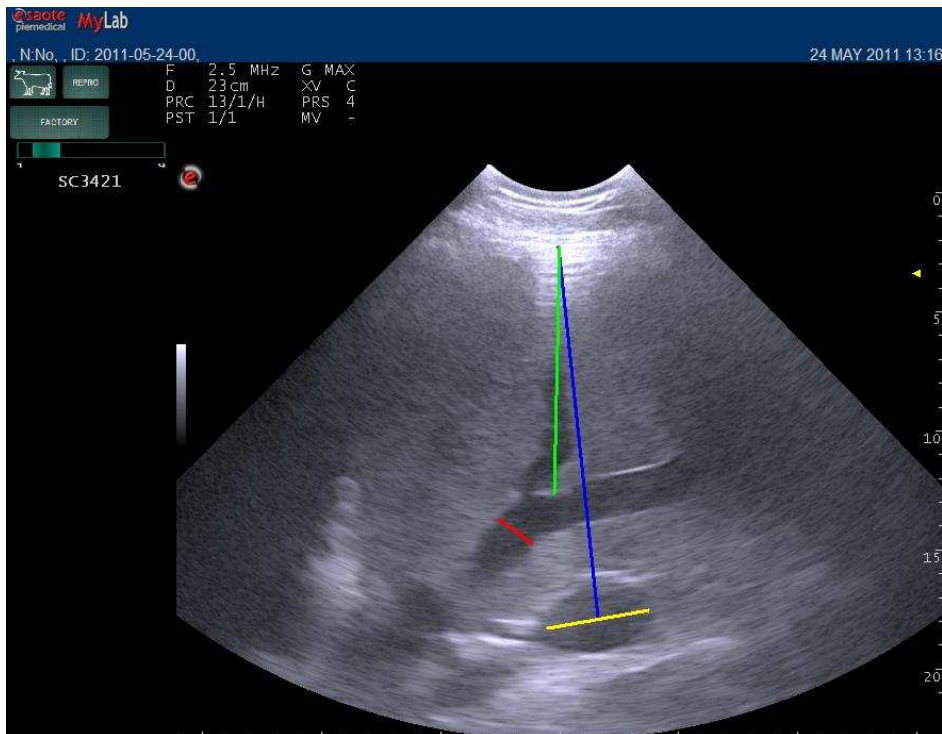


Figura 35.

Viene illustrato come sono stati calcolati i diametri della vena porta (linea gialla) e della vena epatica (linea rossa) e le profondità della vena porta (linea blu) e della vena epatica (linea verde).

3.5 Analisi statistica

I dati ottenuti dalle rilevazioni del BCS e dalle misurazioni ecografiche sono stati sottoposti ad analisi statistica attraverso l'uso del software Sigma Stat 3.05, il quale ha permesso di calcolare l'eventuale significatività ($P < 0,05$) ed il grado di correlazione tra tutti i parametri presi in considerazione.

4. RISULTATI

In totale sono stati presi in esame 36 animali. Su ciascuno di essi sono state eseguite 6 biopsie in totale, di cui 4 di tessuto epatico e 2 di tessuto adiposo periviscerale (Tabella 2).

Sono stati raccolti 108 campioni di tessuto epatico, di cui 36 sono stati immersi in formalina al 4,00% e 72 in azoto liquido. Per quanto riguarda il tessuto adiposo periviscerale, sono stati effettuati 72 prelievi bioptici, di cui 36 immersi in formalina al 4,00% e 36 in azoto liquido. In totale, quindi, sono stati compiuti 180 prelievi bioptici (Tabella 3).

Tipo di tessuto	N° campioni in formalina al 4,00%	N° campioni in azoto liquido
Epatico	1	3
Adiposo periviscerale	1	1

Tabella 2.

Tipi di biopsie effettuate su ciascun animale, distinte per tipo di tessuto campionato e per modalità di conservazione.

N° animali sottoposti a biopsia	36
N° campioni di tessuto epatico in formalina al 4,00 %	36
N° campioni di tessuto epatico in azoto liquido	72
N° campioni di tessuto adiposo periviscerale in formalina al 4,00%	36
N° campioni di tessuto adiposo periviscerale in azoto liquido	36
N° totale di campioni di tessuto epatico	108
N° totale di campioni di tessuto adiposo periviscerale	72
N° totale di campioni effettuati	180

Tabella 3.

Numero totale di animali sottoposti a biopsia, numero totale di biopsie eseguite per ciascun tipo di tessuto e per modalità di conservazione, numero totale di biopsie effettuate.

In Tabella 4 vengono riportati il BCS e l' intervallo temporale tra la data in cui sono state effettuate le biopsie eco-guidate e la data in cui la bovina ha partorito. Inoltre, vengono riassunti tutti i risultati ottenuti effettuando le misurazioni sulle immagini ecografiche, memorizzate durante la raccolta dei campioni biotici.

Per facilitare la comprensione di tale tabella e delle successive vengono elencate le abbreviazioni in esse presenti con i rispettivi significati.

- Int biop-parto: Intervallo tra la data di esecuzione delle biopsie eco-guidate e la data del parto della bovina;
- BCS: Body condition score;
- Prof feg: Profondità del fegato;
- Sp tess ad periv: Spessore del tessuto adiposo periviscerale;
- Prof tess ad periv: Profondità del tessuto adiposo periviscerale;
- Diam vena porta: Diametro della vena porta;
- Diam vena epatica: Diametro della vena epatica;
- Prof vena porta: Profondità della vena porta;
- Prof vena epatica: Profondità della vena epatica.

N° progr anim	BCS	Int biop-parto (giorni)	Prof feg (mm)	Sp tess ad periv (mm)	Prof tess ad periv (mm)	Diam vena porta (mm)	Diam vena epatica (mm)	Prof vena porta (mm)	Prof vena epatica (mm)
1	2,50	20	138,70	19,80	158,50	38,70	13,80	127,00	81,70
2	3,50	18	152,20	20,10	172,30	37,30	14,10	129,00	80,30
3	3,25	10	137,70	19,60	157,30	38,30	15,20	139,10	89,50
4	3,00	20	138,50	19,20	157,70	38,00	13,80	128,10	90,90
5	3,50	18	134,30	19,80	154,10	37,60	13,90	132,60	87,30
6	3,75	11	158,90	20,10	179,00	36,10	14,90	129,60	89,30
7	4,25	10	160,20	21,10	181,30	36,70	15,00	130,40	79,60
8	4,25	10	148,70	19,10	167,80	36,40	14,70	133,70	81,50
9	3,50	20	158,30	20,30	178,60	38,20	13,90	139,00	80,40
10	3,75	19	145,20	19,90	165,10	38,50	14,30	120,60	90,30
11	3,25	20	158,60	19,30	177,90	38,00	15,20	139,80	85,80
12	3,25	18	155,10	19,50	174,60	38,90	15,60	132,80	82,90
13	3,50	17	153,80	21,30	175,10	38,40	14,00	135,10	79,20
14	3,50	16	152,10	21,40	173,50	37,20	14,20	135,30	86,90
15	4,00	10	149,30	18,90	168,20	35,20	14,30	129,50	80,90
16	3,25	20	138,60	19,90	158,50	38,50	14,30	134,60	83,40
17	4,00	14	137,40	29,50	166,90	36,40	14,80	129,70	80,30
18	3,75	15	135,40	19,70	155,10	36,90	13,80	129,10	84,80

Tabella 4. Numero progressivo, BCS e intervallo biopsia-parto delle bovine sottoposte alle biopsie-ecoguidate e valori ottenuti effettuando le misurazioni sulle immagini ecografiche memorizzate durante le tecniche biotiche.

19	3,50	20	143,40	20,10	163,50	37,10	15,00	130,30	88,00
20	3,25	20	139,70	20,00	159,70	38,00	14,80	129,90	87,30
21	3,00	19	135,90	19,50	155,40	37,80	14,10	132,00	81,80
22	3,50	20	151,50	18,90	170,40	37,30	14,80	134,30	80,00
23	3,75	19	149,20	20,50	169,70	38,90	15,10	135,00	79,80
24	3,50	19	136,00	21,00	157,00	38,10	13,90	136,70	87,00
25	3,00	15	147,60	21,30	168,90	37,40	14,00	139,80	81,50
26	3,00	11	159,80	20,80	180,60	36,90	14,20	129,80	86,30
27	3,50	14	138,40	20,70	159,10	37,00	14,50	130,00	82,30
28	3,75	15	141,90	19,50	161,40	37,10	15,20	132,40	85,10
29	2,75	16	140,70	18,90	159,60	37,60	15,10	131,50	86,90
30	2,50	20	137,80	20,00	157,80	38,50	13,90	134,70	88,30
31	3,00	11	153,70	21,20	174,90	36,40	13,80	135,00	90,10
32	3,25	15	152,10	20,90	173,00	37,20	15,00	139,90	83,60
33	3,50	18	150,00	19,50	169,50	38,40	15,50	128,60	79,40
34	4,00	14	137,80	19,40	157,20	38,30	15,20	128,80	79,60
35	4,00	15	138,90	19,10	158,00	38,00	14,90	129,00	80,30
36	4,25	17	141,30	19,90	161,20	37,70	14,60	139,50	82,80

Tabella 4. Numero progressivo, BCS e intervallo biopsia-parto delle bovine sottoposte alle biopsie-ecoguidate e valori ottenuti effettuando le misurazioni sulle immagini ecografiche memorizzate durante le tecniche biotiche.

Di seguito vengono riportati in Tabella 5 i valori massimi, minimi e medi del BCS, dell'intervallo biopsia-parto e dei parametri misurati sulle immagini ecografiche delle bovine sottoposte alla tecnica bioptica.

	Valore massimo	Valore minimo	Media
BCS	4,25	2,50	3,47
Int biop-parto (giorni)	20,00	10,00	16,22
Prof feg (mm)	160,20	134,30	145,80
Prof tess ad periv (mm)	181,30	154,10	166,07
Sp tess ad periv (mm)	29,50	18,90	20,27
Diam vena porta (mm)	38,90	35,20	37,59
Diam vena epatica (mm)	15,60	13,80	14,54
Prof vena porta (mm)	139,90	120,60	132,56
Prof vena epatica (mm)	90,90	79,20	84,03

Tabella 5.

Valore massimo, minimo e media del BCS di ciascuna bovina sottoposta alla tecnica bioptica eco-guidata e di ogni parametro ottenuto dalle immagini ecografiche.

Una volta ottenute tutte le misurazioni dalle immagini ecografiche, queste sono state sottoposte ad analisi statistica, per trovare eventuali correlazioni. Quelle risultate statisticamente significative ($P < 0,05$) verranno riportate nei grafici 1-4.

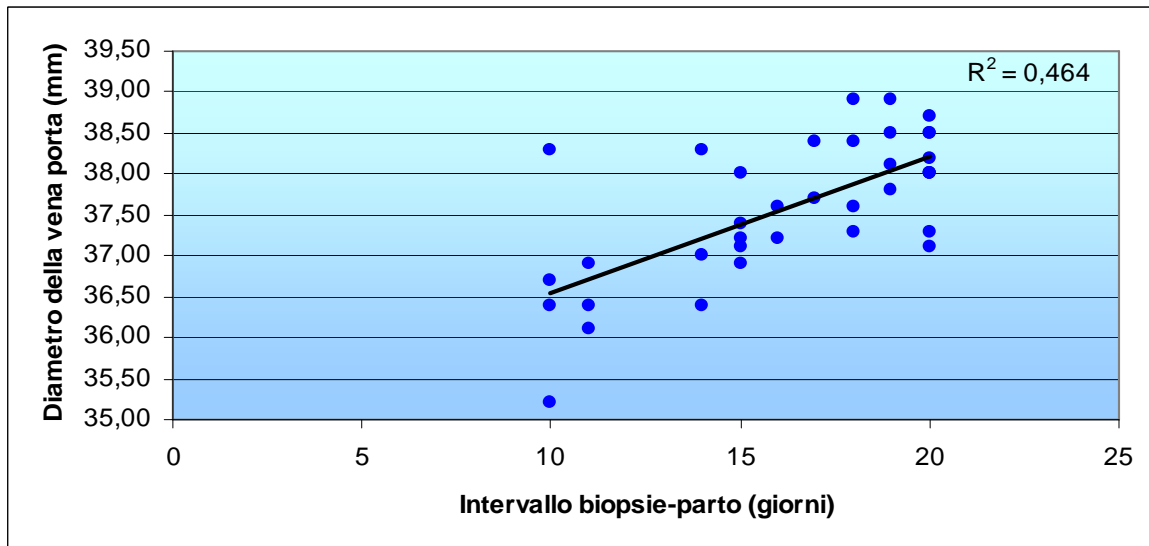


Grafico 1.

Correlazione semplice tra l'intervallo tra la data di esecuzione delle biopsie eco-guidate e la data del parto della bovina (variabile indipendente) e il diametro della vena porta (variabile dipendente). Indice di correlazione R^2 pari a 0,464.

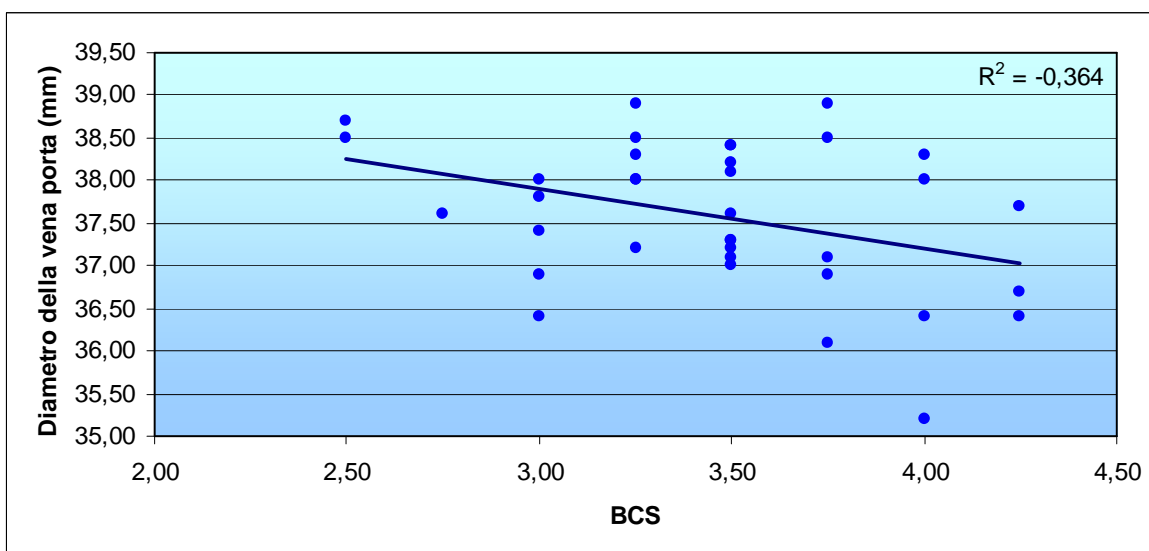


Grafico 2.

Correlazione semplice tra il BCS (variabile indipendente) della bovina e il diametro della vena porta (variabile dipendente). Indice di correlazione R^2 pari a -0,364.

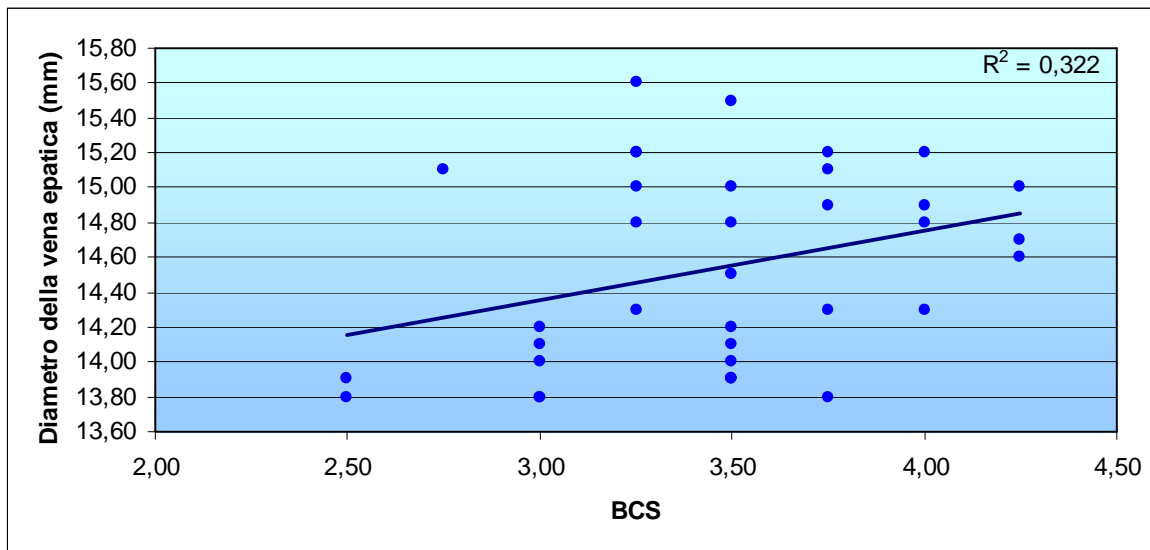


Grafico 3.

Correlazione semplice tra il BCS (variabile indipendente) della bovina e il diametro della vena epatica (variabile dipendente). Indice di correlazione R^2 pari a 0,322.

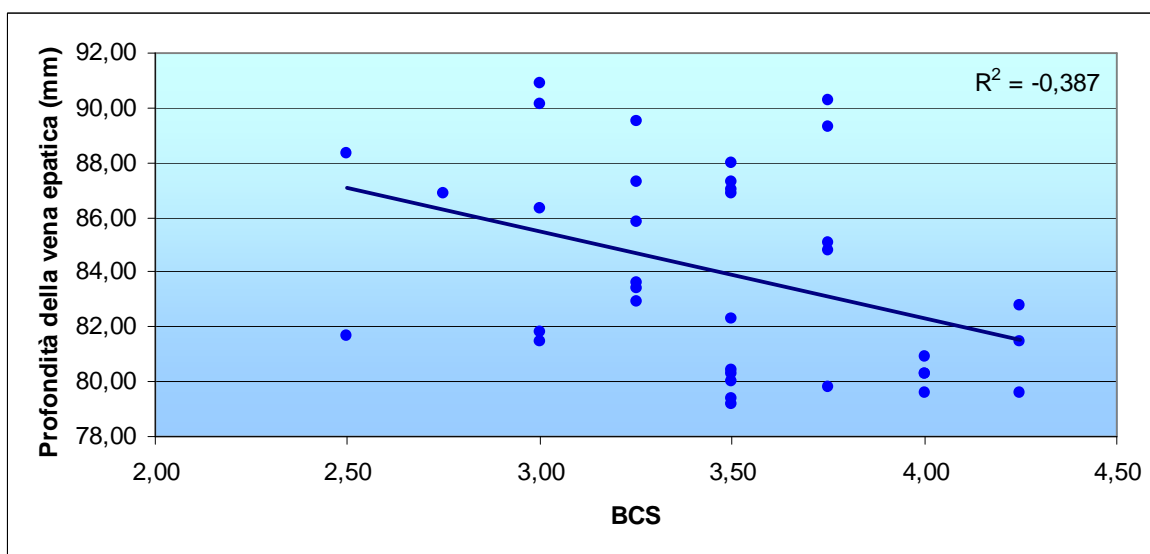


Grafico 4.

Correlazione semplice tra il BCS della bovina (variabile indipendente) e la profondità della vena epatica (variabile dipendente). Indice di correlazione R^2 pari a -0,387.

Osservando le correlazioni semplici rappresentate dai grafici 1-4, possiamo avere un'idea di come e quanto due parametri siano correlati tra loro (positivamente o negativamente a seconda che il valore sia positivo o negativo).

Il Grafico 1 permette di sottolineare l'esistenza di una correlazione positiva tra l'intervallo temporale, esistente tra la data di esecuzione delle biopsie eco-guidate e la data del parto della bovina, con il diametro della vena porta, di un valore pari a 0,464.

Analizzando il Grafico 2 si nota, inoltre, che il BCS della bovina e il diametro della vena porta sono inversamente correlati, di un valore pari a -0,364. Si nota infatti che all'aumentare del BCS, il diametro della vena porta diminuisce (Grafico 2).

All'aumentare del valore di BCS, invece, si osserva un aumento del diametro della vena epatica (0,322) (Grafico 3).

Anche il valore di BCS e la profondità della vena epatica sono inversamente correlati: all'aumentare del primo parametro, il secondo si riduce. Il valore di correlazione tra questi due parametri è pari a -0,387 (Grafico 4).

5. DISCUSSIONE

5.1 Analisi descrittiva della tecnica bioptica eco-guidata

Il tipo di contenimento che è stato messo a punto, si è rivelato all'altezza della metodica realizzata sugli animali. Solo in 2 bovine (5,56%) ci sono state difficoltà nell'effettuare l'infiltrazione di lidocaina a livello della parete toracica, ma questo non ha pregiudicato né le successive fasi della tecnica bioptica, né la qualità dei campioni prelevati. Inoltre, 3 prelievi di tessuto adiposo (4,17%) si sono rivelati critici, a causa della profondità eccessiva di quest'ultimo. Nonostante ciò, modificando la direzione di inserimento dell'ago bioptico sulla base delle informazioni fornite dall'ecografo, si è riusciti a prelevare il numero di campioni desiderato. In 5 casi (4,63%), il prelievo bioptico di tessuto epatico non è andato a buon fine a causa della perforazione di vasi sanguigni, rami della vena porta e della vena epatica. La procedura è comunque proseguita, variando anche in questo caso la direzione e la profondità date all'ago, rispettando il protocollo precedentemente descritto e riuscendo a ottenere il numero di campioni fissato. La bovina non ha manifestato sintomi né al momento e neppure nei giorni successivi, in accordo con quanto riportato in letteratura (Buckley *et al.*, 1986).

Nel corso di tutti i prelievi bioptici effettuati, il punto di inserimento dell'ago bioptico non è stato mai modificato a seconda del tipo di tessuto oggetto di prelievo. Le differenze riguardano la direzione data allo strumento da biopsia e la profondità alla quale esso è stato inserito. Quindi, per ciascun animale è stata perforata un'unica volta la parete toracica. Tale operazione, assieme all'incisione cutanea di dimensioni esigue (1,00-1,50 cm), ha permesso di non avere nessuna conseguenza a carico della parete toracica delle bovine al termine della procedura e nei giorni seguenti.

È stato molto importante prestare attenzione a non esercitare una pressione eccessiva sul pistone del Tru-Cut prima di aver posizionato l'ago in corrispondenza del tessuto da prelevare. Un'eccessiva pressione avrebbe, infatti, potuto provocare lo scatto in avanti dello stiletto con perdita del prelievo. È stato necessario, allora, prendere confidenza con lo strumento prima di eseguire i campioni.

Durante la biopsia di tessuto adiposo periviscerale si sono rivelate utili le indicazioni che derivavano dall'ecografia contemporaneamente eseguita. Poteva, infatti, accadere che l'animale presentasse delle quantità di tessuto adiposo periviscerale ridotte. In particolare, questo si è verificato in 2 bovine (5,56%): per tale motivo, è stato più difficile compiere il ritrovamento e il prelievo del tessuto. Per i due animali è stato allora proficuo valutare attentamente con l'ecografo la profondità alla quale si trovava il tessuto adiposo, in maniera tale da indirizzare e penetrare correttamente l'undicesimo spazio intercostale.

In nessun caso è stato perforato il diaframma, a differenza di quanto sostenuto da Chapman *et al.* (1963). Anche questo aspetto positivo è da imputare all'ausilio offerto dall'ecografo.

5.2 Analisi dei risultati ottenuti

Dalle misurazioni ottenute dalle ecografie, emergono alcuni dati importanti per l'esecuzione delle biopsie eco-guidate dei tessuti epatico e adiposo periviscerale. In particolare, risultano utili ai fini pratici soprattutto i valori medi riguardanti le profondità del fegato e del tessuto adiposo periviscerale, pari rispettivamente a 145,80 e 166,07 mm. Questi valori indicano che, per prelevare dei campioni bioptici di tessuto epatico, considerando come punto di inserimento dell'ago Tru-Cut quello usato in tale prova, lo strumento deve essere inserito a una profondità mediamente pari a 145,80 mm. Inoltre, per campionare del tessuto adiposo periviscerale l'ago deve essere spinto in profondità fino a 166,07 mm in media.

Grazie all'analisi delle immagini ecografiche memorizzate, emerge la presenza di due importanti vasi sanguigni, la vena porta e la vena epatica, che potrebbero essere perforati durante la manualità. Per evitare questa eventualità, la quale in ogni caso non crea nella bovina conseguenze gravi (Smart and Northcote, 1985; Buckley *et al.*, 1986), soprattutto se si utilizza uno strumento dal diametro ridotto come quello del Tru-Cut da noi adoperato, è importante conoscere i valori medi di profondità a cui si potrebbero incontrare tali vasi. La vena porta si trova mediamente a 132,30 mm di profondità, mentre la vena epatica a 83,15 mm.

Questo significa che quando inseriamo lo strumento in corrispondenza di questi valori di profondità, le probabilità di incontrare questi due vasi aumentano, soprattutto dato il loro diametro elevato: 37,65 mm in media per la vena porta e 14,55 mm per la vena epatica, valori sovrapponibili a quelli riportati in letteratura (Braun, 1990). Nonostante questo, l'effettiva penetrazione con l'ago di questi vasi nel corso del nostro lavoro è stata bassa (5,56%) e in nessun caso sono state registrate conseguenze negative per l'animale. La funzione di guida svolta dall'ecografo durante tutta la procedura di raccolta è stata fondamentale e ha permesso, nella quasi totalità dei casi (95,37%), di evitare la perforazione di queste strutture.

Per quanto riguarda le correlazioni trovate analizzando statisticamente i dati ottenuti nel corso di questo lavoro, risulta che l'intervallo temporale, esistente tra la data di esecuzione delle biopsie eco-guidate e la data del parto della bovina, è direttamente correlato con il diametro della vena porta. In altre parole, con il progredire dello stato di gestazione, il diametro di questo vaso diminuisce. L'apporto di energia che viene introdotta dalla bovina durante la fase di asciutta potrebbe spiegare l'esistenza di tale correlazione. Nelle Aziende in cui si è svolto questo lavoro viene applicata una fase di asciutta, di circa 50-60 giorni, durante la quale l'energia netta che è somministrata alla bovina è minore rispetto a quella della dieta da lattazione, visti i minori fabbisogni dell'animale. Inoltre, durante il periodo peripartale, l'assunzione di sostanza secca da parte della bovina tende a decrescere spontaneamente del 20,00-30,00% andando a ridurre ulteriormente la quota di energia introdotta (Andersen *et al.*, 2005). Tutto ciò comporta una progressiva riduzione dell'alimento presente a livello intestinale e, di conseguenza, del sangue drenato dalle vene mesenteriche all'interno della vena porta. A questo segue un abbassamento della portata all'interno di quest'ultimo vaso e, quindi, del suo diametro (Braun and Gerber, 1994).

Analizzando le altre correlazioni statisticamente significative si nota che all'aumentare del BCS della bovina diminuisce il diametro della vena porta, aumenta il diametro della vena epatica e diminuisce la profondità della vena porta. Queste correlazioni sono difficilmente spiegabili sulla base delle informazioni raccolte nel corso di questo lavoro e non trovano riscontro in bibliografia. Tuttavia, possono essere utili per avere un'idea di come mettere in pratica la tecnica bioptica, anche solo osservando la condizione corporea dell'animale.

5.3 Confronto con le altre tecniche bioptiche

Con la tecnica bioptica, messa a punto in questo lavoro abbiamo, da un lato, mantenuto alcune caratteristiche tipiche delle tecniche per aspirazione e mediante Tru-Cut e, dall'altro, abbiamo introdotto alcune modifiche importanti.

Innanzitutto tutti i tipi di prelievi bioptici sono stati effettuati introducendo l'ago attraverso l'undicesimo spazio intercostale sul fianco destro dell'animale. Questo spazio è stato scelto grazie all'uso dell'ecografo, che ha permesso di visualizzare quest'area e ha evidenziato la presenza sia del parenchima epatico, che del tessuto adiposo omentale. Si è quindi introdotto il Tru-Cut attraverso questo punto, a circa 20,00-25,00 cm al di sopra della linea inferiore del Vogel, in maniera tale da poter prelevare, attraverso un'unica breccia operatoria, sia tessuto epatico che adiposo periviscerale. Altri Autori in passato avevano effettuato le biopsie di tessuto epatico attraverso questo spazio intercostale (Hughes, 1962; Chapman *et al.*, 1963; Pearson e Craig nel 1980; Smart and Northcote, 1985), ma nessuno di essi aveva utilizzato questo punto di penetrazione anche per i prelievi di tessuto adiposo periviscerale.

Tutte le fasi di preparazione chirurgica della cute hanno previsto l'utilizzo di materiale sterile e monouso e sono sempre state effettuate in maniera accurata. Questo ha permesso di non avere mai alcuna alterazione a carico della parete toracica, durante il post-operatorio. A differenza delle altre tecniche messe a punto in passato, abbiamo scelto di effettuare l'anestesia locale mediante infiltrazione di lidocaina. Tale scelta è stata presa per aumentare il benessere dell'animale, la sicurezza dell'operatore e ridurre l'irrequietezza della bovina durante i prelievi bioptici, operando con più tranquillità e precisione.

L'incisione cutanea parallela alle coste, effettuata con la lama da bisturi, che ha avuto come obiettivo quello di facilitare la penetrazione del Tru-Cut attraverso il piano cutaneo e sottocutaneo, non ha richiesto, al termine dei prelievi, alcun tipo di sutura viste le ridotte dimensioni. Inoltre, l'uso della lama da bisturi non montata al manico, bensì afferrata direttamente con il pollice e l'indice della mano, ha consentito di avere una maggiore maneggevolezza durante l'incisione cutanea. In particolare, questo ha permesso di far fronte in modo più sicuro a movimenti improvvisi dell'animale, in

maniera simile a quanto riportato da Chapman *et al.* (1963), anche se in quel caso veniva utilizzata una lama di rasoio.

Per quanto riguarda l'ago bioptico, con questa tecnica, si è abbandonata la triade trocar, cannula e siringa tipica delle tecniche per aspirazione (Dick, 1944; Erwin *et al.*, 1956; Hughes, 1962; Chapman *et al.*, 1963) e si è adoperato uno strumento che racchiude in sé tutte le componenti indispensabili per la raccolta dei campioni. Di conseguenza, sono aumentate notevolmente l'efficienza e la velocità di raccolta dei campioni e diminuite le conseguenze negative legate alla manualità.

Infine, la più importante novità introdotta è stata l'impiego dell'ecografo, mai utilizzato in nessuna delle tecniche bioptiche di tessuto epatico e adiposo periviscerale presenti in bibliografia. Il contributo dato da questo strumento è stato fondamentale, sia nello studio preliminare della tecnica (scelta dello spazio intercostale e del punto esatto di inserimento dell'ago bioptico), sia durante la procedura di raccolta (visualizzazione ecografica dell'area rasata e eco-guida durante i prelievi di tessuto). Senza l'uso di questo strumento non sarebbe stato possibile prelevare da un unico punto entrambi i tipi di tessuto ed evitare tutte le più importanti complicazioni legate alla tecnica bioptica, riportate in bibliografia, ovvero abbattimento dello stato del sensorio e possibile febbre, dispnea, prelievo di tessuto renale o pancreatico anziché epatico, emorragia in seguito alla penetrazione di grossi vasi ematici, aspirazione di ascessi con conseguente possibile peritonite settica data dalla diffusione di batteri anaerobi e peritonite biliare causata dalla penetrazione di vasi biliari (Smart and Northcote, 1985).

5.4 Possibili utilizzi delle biopsie epatiche e di tessuto adiposo periviscerale

Sulle biopsie epatiche di bovino campionate durante la sperimentazione potranno essere determinati il grado di steatosi, l'infiltrazione di elementi infiammatori e il grado di fibrosi. La quantità di trigliceridi potrà essere quantificata secondo la scala proposta da Brunt (1999). Essa classifica il grado di steatosi affidando un punteggio per entità di questa patologia (espressa in percentuale), ballooning epatocitario e

infiammazione lobulare, mentre valuta il grado di fibrosi a seconda della sua distribuzione all'interno del parenchima epatico (Brunt *et al.*, 1999).

Inoltre, su preparati istologici di tessuto adiposo, si potranno quantificare il diametro medio adipocitario e l'infiltrazione macrofagica. Per quanto riguarda le determinazioni di biologia molecolare, dai prelievi bioptici di tessuto adiposo potrà essere estratto l'RNA totale, permettendo in tal modo di quantificare l'espressione genica di numerose adipochine mediante RT-PCR quantitativa real-time. In particolare, sarà importante considerare i geni coinvolti nella flogosi del tessuto adiposo e nella regolazione del bilancio energetico. Inoltre potranno essere misurati altri geni importanti nella regolazione dell'adipogenesi e nel metabolismo lipidico. Anche su biopsie di tessuto epatico sarà determinabile l'espressione di mRNA, mediante PCR quantitativa, dei geni coinvolti nel metabolismo lipidico e nella fibrosi epatica.

Da un punto di vista diagnostico, l'ecografia del fegato potrebbe essere utilizzata anche per visualizzare la presenza di steatosi e per cercare di determinarne il grado, in maniera simile a quanto riportato in medicina umana. Nell'uomo la classificazione del livello di steatosi viene distinta in 3 gradi, determinati sulla base della "brillantezza" del parenchima epatico ("bright liver"). L'aumento dell'ecogenicità è spiegabile, da un punto di vista fisico, dalla presenza di vacuoli intracitoplasmatici di grasso all'interno degli adipociti, responsabili di un incremento delle interfacce. Questo comporta, con l'aumentare della gravità della patologia, l'attenuazione del fascio ultrasonoro, la perdita di risoluzione dei dettagli strutturali, fino all'impossibilità di distinguere la vena porta (Saadeh *et al.*, 2002).

6. CONCLUSIONI

Nell'allevamento intensivo della bovina da latte il monitoraggio del periodo di transizione è di fondamentale importanza. Durante le settimane appena precedenti e successive al parto, lo stato funzionale del fegato e del tessuto adiposo periviscerale svolge un ruolo importante nel mantenere una buona condizione sanitaria dell'animale e nell'evitare patologie metaboliche che possono compromettere il rendimento produttivo e riproduttivo della bovina durante i mesi seguenti. In particolare, è indispensabile mantenere un'assunzione energetica, durante il periodo che va dal prepartum fino al parto, compatibile con la richiesta da parte del bovino. È inoltre fondamentale aumentare tale offerta di energia durante le prime fasi di lattazione, quando la domanda diventa massima. Se questo non accade, si instaura nell'animale una condizione di bilancio energetico negativo, spesso aggravata da una condizione di ipercondizionamento al momento del parto (Butler, 2000; Drackley *et al.*, 2001; Overton and Waldron, 2004). In questa situazione si verificano numerosi processi metabolici negativi, tra cui l'accumulo di NEFA circolanti sotto forma di trigliceridi in sede epatica e la riduzione degli enzimi necessari per la gluconeogenesi epatica (Duffield *et al.*, 2002; Reynolds *et al.*, 2003; Bradford and Allen, 2005).

A carico del tessuto adiposo si assiste, invece, al rilascio di citochine proinfiammatorie e al richiamo di cellule dell'infiammazione (Dann *et al.*, 2006; Mukesh *et al.*, 2010).

Vista la centralità del fegato e del tessuto adiposo periviscerale nel corso dei processi che caratterizzano il periodo di transizione, con la presente prova si è cercato di mettere a punto una tecnica in grado di permettere la raccolta di campioni di tessuti epatico e adiposo periviscerale adatti ad essere successivamente analizzati.

Le valutazioni si sono concentrate sulle analisi delle ecografie effettuate in campo, determinando in particolar modo alcuni parametri, al fine di mettere in pratica una procedura standardizzata che permettesse di eseguire i prelievi in maniera sicura, rapida e corretta in tutti gli animali oggetto della prova.

Dai risultati ottenuti possiamo dire che l'utilizzo del Tru-Cut da biopsia istologica per tessuti molli rappresenta un tipo di ago molto adatto a questo genere di prelievi. Le caratteristiche di questo strumento (14 G di diametro per 20,00 cm di lunghezza) si sono rivelate appropriate per tutti i tipi di prelievo, sia di tessuto epatico che adiposo periviscerale. Da un unico punto di ingresso, situato a livello dell'undicesimo spazio intercostale sul fianco destro della bovina, esso consente infatti, di raccogliere entrambi i tipi di tessuto.

Inoltre, l'uso dell'ecografo è stato di notevole importanza per due ragioni. In primo luogo esso ha permesso di realizzare una visualizzazione ecografica della porzione di cavità addominale indagabile attraverso l'undicesimo spazio intercostale prima dei prelievi bioptici. Questo ha facilitato l'individuazione sia del parenchima epatico che del tessuto adiposo periviscerale. Inoltre, è stato possibile effettuare alcune valutazioni e misurazioni che sono state utilizzate per ridurre ulteriormente le conseguenze negative di tale tecnica. In secondo luogo, la possibilità di eco-guidare l'intera procedura di raccolta dei campioni, ha permesso di orientare correttamente l'ago bioptico e di inserirlo a una profondità sufficiente per raccogliere correttamente il tessuto desiderato.

Tutto il protocollo di prelievo e di conservazione dei campioni, inoltre, non ha evidenziato punti critici che avrebbero potuto in qualche modo influenzare negativamente lo stato di salute degli animali sottoposti ai prelievi bioptici. Il fissaggio della coda al garretto sinistro, l'utilizzo di materiale sterile e monouso, le procedure di disinfezione e l'ausilio offerto dall'eco-guida sono state fondamentali. La sicurezza degli operatori è stata garantita dal contenimento dell'animale all'interno dell'autocattura e dall'utilizzo dell'anestesia locale a livello del punto di ingresso dell'ago bioptico. Infine, la qualità dei campioni conservati si è rivelata adeguata grazie anche all'immersione delle cassette per l'istologia in formalina al 4,00% e in azoto liquido, all'interno dell'apposito bidone, in attesa dello stoccaggio in congelatore a -80 °C. L'utilizzo di questa procedura si è dimostrata quindi di facile applicabilità in campo.

Nel complesso, la tecnica oggetto di studio rappresenta un valido sistema di raccolta di tessuti epatici e adiposo periviscerale attraverso un unico punto di ingresso dell'ago bioptico.

Questi campioni potranno essere successivamente messi a disposizione di numerose indagini laboratoristiche. Tali analisi avranno l'obiettivo di definire meglio il ruolo che il fegato e il tessuto adiposo svolgono nell'ambito del periodo di transizione, al fine di mettere in pratica nuove soluzioni per ridurre l'impatto del problema del bilancio energetico negativo sulla gestione dell'allevamento della bovina da latte.

BIBLIOGRAFIA

Ames NK, de Silva RB, Witehair CK. Instrumentation technique for obtaining percutaneous liver biopsies suitable clinical analysis in cattle. *Proc XI Int Cong on Diseases of Cattle*: 1438-1439, 1980.

Andersen JB, Madsen TG, Larsen T, Ingvarsten KL, Nielsen MO. The effects of dry period versus continuous lactation on metabolic status and performance in periparturient cows. *J Dairy Sci* 88: 3530-3541, 2005.

Anderson TA, Taylor RE, Diven RH, Hubbert F, Hale WH. Reliability of the liver biopsy technique for estimating hepatic Vitamin A. *J Anim Sci* 21: 369, 1962.

Arkan MC. IKK- β links inflammation to obesity-induced insulin resistance. *Nature Med* 11: 191-198, 2005.

Bone JF. A technique for aspiration liver biopsy in dairy cattle. *North Amer Vet* 35: 47, 1954.

Bradford BJ and Allen MS. Phlorizin administration increases hepatic gluconeogenic enzyme mRNA abundance but not feed intake in late-lactation dairy cows. *J Nutr* 35: 2206-2211, 2005.

Braun U. Ultrasonographic examination of the liver in cows. *Am J Vet Res* 51: 1522-1526, 1990.

Braun U and Gerber D. Percutaneous ultrasound-guided cholecystocentesis in cows. *Am J Vet Res* 53: 1079-1084, 1992.

Braun U and Gerber D. Influence of age, breed, and stage of pregnancy on hepatic ultrasonographic findings in cows. *Am J Vet Res* 55: 1201-1205, 1994.

Braun U, Pusterla N, Wild K. Ultrasonographic findings in 11 cows with a hepatic abscess. *Vet Rec* 137: 284-290, 1995.

Braun U. Ultrasonographic examination of the liver and gallbladder in cows. Part 1. Normal findings. *Comp Cont Educ Pract Vet* 18: 61-72, 1996.

Braun U and Pusterla N. Ultrasonographic examination of the liver and gallbladder in cows. Part 2. Abnormal findings. *Comp Cont Educ Pract Vet* 18: 1255-1270, 1996.

Braun U. Ultrasonography in gastrointestinal disease in cattle. *Vet J* 166: 112-124, 2003.

Braun U, Camenzind D, Ossent P. Ultrasound-guided catheterization of the portal vein in 11 cows using the Seldinger technique. *J Vet Med A* 50: 1-7, 2003.

Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 94: 2467-2474, 1999.

Buckley WT, Eigendorf GK, Dorward WJ. A liver biopsy instrument for large animals. *Can J Anim Sci* 66: 1137-1140, 1986.

Butler WR. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci* 60: 449-457, 2000.

Butler WR. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. *Livest Prod Sci* 83: 211-218, 2003.

Chapman HL, Cox DH, Haines CE, Davis GK. Evaluation of the liver biopsy technique for mineral nutrition studies with beef cattle. *J Anim Sci* 22: 733-737, 1963.

Colombo C, Cutson JJ, Yamauchi T, Vinson C, Kadowaki T, Gavrilova O, Reitman ML. Transplantation of adipose tissue lacking leptin is unable to reverse the metabolic abnormalities associated with lipoatrophy. *Diabetes* 51: 2727-2733, 2002.

Columbano A and Ledda-Columbano GM. Mitogenesis by ligands of nuclear receptors: an attractive model for the study of the molecular mechanisms implicated in liver growth. *Cell Death Differ Suppl* 1: S19-S21, 2003.

Dann HM, Morin DE, Bollero GA, Murphy MR, Drackley JK. Prepartum intake, postpartum induction of ketosis and periparturient disorders affect the metabolic status of dairy cows. *J Dairy Sci* 88: 3249-3264, 2005.

Dann HM, Litherland NB, Underwood JP, Bionaz M, D'Angelo A, McFadden JW, Drackley JK. Diets during far-off and close-up dry periods affect periparturient metabolism and lactation in multiparous cows. *J Dairy Sci* 89: 3563-3577, 2006.

Dick AT. Aspiration biopsy of the liver in sheep. *Aust Vet J* 20: 298, 1944.

Dick AT. Improved apparatus for aspiration biopsy of the liver in sheep. *Aust Vet J* 28: 234-235, 1952.

Drackley JK, Overton TR, Douglas GN. Adaptations of glucose and long-chain fatty acid metabolism in liver of dairy cows during the periparturient period. *J Dairy Sci* 84, Suppl E: E100-E112, 2001.

Drackley JK, Dann HM, Douglas GN, Janovick Guretzky NA, Litherland NB, Underwood JP, Looor JJ. Physiological and pathological adaptations in dairy cows that may increase susceptibility to periparturient diseases and disorders. *Ital J Anim Sci* 4: 323-344, 2005.

Duffield T, Bagg R, DesCoteaux L, Bouchard E, Brodeur M, Tremblay D, Keefe G, LeBlanc S, Dick P. Prepartum monensin for the reduction of energy associated disease in postpartum dairy cows. *J Dairy Sci* 85: 397-405, 2002.

Edmondson AJ, Lean IJ, Weaver LD, Farver T, Webster G. A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J Dairy Sci* 72: 68, 1989.

Elbatarny HS, Netherton SJ, Ovens JD, Ferguson AV, Maurice DH. Adiponectin, ghrelin, and leptin differentially influence human platelet and human vascular endothelial cell functions: implication in obesity-associated cardiovascular diseases. *Eur J Pharmacol* 558: 7-13, 2007.

Erwin ES, Dyer IA, Meyer TO, Scott KW. Uses of aspiration biopsy technique. *J Anim Sci* 15: 428, 1956.

Gröhn Y and Lindberg LA. Methodological aspect of the microscopy of bovine liver biopsies. *Comp Pat J* 92: 567-578, 1982.

Grummer RR, Mashek DG, Hayirli A. Dry matter intake and energy balance in the transition period. *Vet Clin Food Anim* 20: 447-470, 2004.

Grummer RR. Nutritional and management strategies for the prevention of fatty liver in dairy cattle. *Vet J* 176: 10-20, 2008.

Hickok D, Carlson M, Brink DR, Schneider N, Deutscher GH, Olson P. Multi-elemental analysis of bovine liver biopsies and whole liver. *Nebr Med J* 1: 18-20, 1996.

Hughes JP. A simplified instrument for obtaining liver biopsies in cattle. *Am J Vet Res* 23: 1111-1112, 1962.

Imperatore G, Riccardi G, Iovine C, Rivellese AA, Vaccaro O. Plasma fibrinogen: a new factor of the metabolic syndrome. A population-based study. *Diabetes care* 21: 649-654, 1998.

Ishioka K, Omachi A, Sagawa M, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. Canine adiponectin: cDNA structure, mRNA expression in adipose tissues and reduced plasma levels in obesity. *Res Vet Sci* 80: 127-132, 2006.

Ishioka K, Hosoya K, Kitagawa H, Shibata H, Honjoh T, Kimura K, Saito M. Plasma leptin concentration in dogs: effects of body condition score, age, gender and breeds. *Res Vet Sci* 82: 11, 2006.

Itabisashi T, Yamamoto R, Satoh M. Ultrasonogram of hepatic abscess in cattle inoculated with *Fusobacterium necrophorum*. *Jnp J Vet Sci* 49: 585-592, 1987.

Iwao T. Ultrasonographic appearance of diffuse changes in the bovine liver. *Jnp J Vet Res* 35: 130, 1987.

Jeusette IC, Detilleux J, Shibata H, Saito M, Honjoh T, Delobel A, Istasse L, Diez M. Effects of chronic obesity and weight loss on plasma ghrelin and leptin concentrations in obese dogs. *Res Vet Sci* 79: 169-175, 2005.

Kim SP, Ellmerer M, Van Citters GW, Bergman RN. Primacy of hepatic insulin resistance in the development of the metabolic syndrome induced by an isocaloric moderate-fat diet in the dog. *Diabetes* 52: 2453-2460, 2003.

Lechtenberg K and Nagaraja T. Hepatic ultrasonography and blood changes in cattle with experimentally induced hepatic abscesses. *Am J Vet Res* 52: 803-809, 1991.

Loosmore RM and Alcroft R. Technique and use of liver biopsy in cattle. *Vet Rec* 63: 414, 1951.

Mohamed T, Sato H, Kurosawa T, Oikawa S. Echo-guided studies on portal and hepatic blood in cattle. *J Vet Med Sci* 64: 23-28, 2002.

Mukesh M, Bionaz M, Graugnard DE, Drackley JK, Looor JJ. Adipose tissue depots of Holstein cows are immune responsive: inflammatory gene expression in vitro. *Domest Anim Endocrinol* 38: 168-178, 2010.

Overton T and Waldron M. Nutritional management of transition dairy cows: strategies to optimize metabolic health. *J Dairy Sci* 87: 105-119, 2004.

Pearson EG and Craig AM. The diagnosis of liver disease in equine and food animals. *Mod Vet Prat* 3: 233-237, 1980.

Reid IM. Incidence and severity of fatty liver in dairy cows. *Vet Rec* 107: 281-284, 1980.

Reynolds CK, Aikman PC, Lupoli B, Humphries DJ, Beever DE. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation to early lactation. *J Dairy Sci* 86: 1201-1217, 2003.

Saadeh S, Younossi ZM, Remer EM, Gramlich T, Ong JP, Hurley M, Mullen KD, Cooper JN, Sheridan MJ. The utility of radiological imaging in nonalcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* 123: 745-750, 2002.

Santos AC, Lopes C, Guimarães JT, Barros H. Central obesity as a major determinant of increased high-sensitivity C reactive protein in metabolic syndrome. *Int J Obes* 29: 1452-1456, 2005.

Seghitti L and Marsh H. Liver biopsy in cattle. *Am J Vet Res* 14: 9, 1953.

Sethi JK and Vidal-Puig AJ. Thematic review series: adipocyte biology. Adipose tissue function and plasticity orchestrate nutritional adaptation. *J Lipid Res* 48: 1253-1262, 2007.

Shimomura I, Hammer RE, Ikemoto S, Brown MS, Goldstein JL. Leptin reverses insulin resistance and diabetes mellitus in mice with congenital lipodystrophy. *Nature* 401: 73-76, 1999.

Shirai W, Sato T, Shibuya H, Naito K, Tsukise A. Three-dimensional vasculature of the bovine liver. *Anat Histol Embryol* 34: 354-363, 2005.

Smart ME and Northcote MJ. Liver biopsies in cattle. *Comp Cont Educ Pract Vet* 7: 327-332, 1985.

Swanson KS, Merchen NR, Erdman JW, Drackley JK, Orias F, Douglas GN, Huhn JC. Technical note: a technique for multiple liver biopsies in neonatal calves. *J Anim Sci* 78: 2459-2463, 2000.

Trujillo ME and Scherer PE. Adipose tissue-derived factors: impact on health and disease. *Endocr Rev* 27: 762-778, 2006.

Wellen KE and Hotamisligil GS. Inflammation, stress and diabetes. *J Clin Invest* 115: 1111-1119, 2005.

Wrigley R. Radiographic and ultrasonographic diagnosis of liver diseases in dog and cat. *Small Anim Pract* 15: 21-28, 1985.

Xu H, Glenn TB, Qing Y, Guo T, Daseng Y, Chieh JC, Jason S, Andrew N, Ross JS, Louis A. Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112: 1821-1830, 2003.

Yanagawa T, Taniguchi A, Fukushima M, Nakai Y, Nagasaka S, Ohgushi M, Matsumoto K, Kuroe A, Ohya M, Seino Y. Leptin, triglycerides, and interleukin 6 are independently associated with C reactive protein in Japanese type 2 diabetic patients. *Diabetes Res Clin Pract* 75: 2-6, 2007.

RINGRAZIAMENTI

Desidero ringraziare il Prof. Massimo Morgante, il dott. Enrico Fiore e il dott. Marcello Lora per la loro grande disponibilità e gentilezza mostrate nel corso della realizzazione di questa Tesi.

Ringrazio il dott. Matteo Giancesella per i preziosi consigli ricevuti durante la stesura di questo lavoro, per le uscite in allevamento e per gli incontri di area che mi hanno permesso di conoscere meglio il mondo della buiatria.

Ringrazio i tirocinanti di Medicina Veterinaria e di Scienze e Tecnologie Animali di questa Università per l'aiuto dato nel corso della raccolta dei campioni durante le uscite in campo.

Ringrazio la Dott.ssa Anna Ronzoni per le foto scattate durante i lavori in stalla.

Ringrazio i miei compagni di corso Veronica, Gregorio, Marta, Alessandro, Daniele, Giulia, Elisa, Francesco e Leonardo: la loro amicizia ha reso questi cinque anni indimenticabili.

Un grazie di cuore a mia sorella Valeria e ai miei Genitori.