

CORNER DIAGNOSTICO

Medicina degli animali non convenzionali



PRESENTAZIONE CLINICA

Un esemplare di sesso maschile di testuggine russa (*Testudo horsfieldii*) di 7 anni d'età e di 380 grammi di peso è stato portato in visita per inappetenza e abbattimento. I sintomi erano presenti da dieci giorni, in corrispondenza del risveglio dallo stato di ibernazione invernale, durato da fine ottobre a fine marzo 2023. La tartaruga era stata acquistata già adulta un anno prima in una fiera di animali esotici. Il soggetto era stato stabulato all'esterno ed era libero di muoversi in un terreno di circa 450 mq. Il letargo veniva effettuato in una zona riparata in cui la temperatura invernale non precipitava al di sotto dei 5°C di minima e non superava i 12°C di massima. Il proprietario riferiva di aver posseduto un soggetto della stessa specie, età, sesso e provenienza, deceduto improvvisamente la primavera dell'anno seguente. Non sono stati eseguiti accertamenti per indagare le cau-

Stefano Cusaro
Med Vet, GpCert(ExAP), GpAdvCert(SMP)
ACCR. FNOVI «Medicina e Chirurgia di rettili e anfibi»

Jacopo Casalini
Med Vet, MSc
Libero Professionista

Martina Gavezzoli
MedVet
Libero Professionista

se del decesso. La tartaruga si alimentava con erbe spontanee del giardino; settimanalmente, veniva offerto un mix di insalata (radicchio, lattuga, rucola e tarassaco) e frutta di stagione. La tartaruga effettuava un esame coprologico annualmente pre-letargo e veniva sverminata con febendazolo (posologia non riportata dal proprietario) per una moderata presenza di ossiuri nelle feci. L'animale è sempre stato considerato in buona salute e in buono stato di nutrizione alle visite periodiche effettuate dal veterinario curante.

Alla visita clinica il soggetto si presentava moderatamente disidratato e gravemente abbattuto. Lo stato di nutrizione era scadente. Le narici risultavano pervie. All'ispezione del cavo orale è stata evidenziata una grave stomatite con presenza di placche necrotico difteroidi (Figura 1) di colore biancastro a livello di epitelio linguale. Il soggetto deambulava solamente se stimolato.

Sono state eseguite radiografie in proiezione dorso-ventrale (DV) (fascio verticale), latero-laterale (LL) e cranio-caudale (CC) (fascio orizzontale) che non hanno rilevato alterazioni patologiche. Sono stati prelevati 1,5 ml di sangue venoso dalla vena giugulare al fine di effettuare un esame biochimico ed un esame emocromocitometrico. L'esame emocromocitometrico ha evidenziato una moderata eterofilia. (Tabella 1). L'esame biochimico ha evidenziato un grave aumento di AST (884 U/L) (VN: 12-32 U/L), ALT (661 U/L) (VN: 12-32 U/L), ALP (341 U/L) (VN: 12-32 U/L), CK (1200 U/L) (VN: 12-32



Figura 1 - *Testudo horsfieldii*, ispezione del cavo orale. Sono evidenti placche biancastre a livello di epitelio linguale (freccia) e mucosa del cavo orale.

Tabella 1 - Valori ematologici di *Testudo horsfieldii* riscontrati rispetto ai valori di riferimento presi in considerazione per la specie¹.

	Paziente (valore riscontrato)	VN (Valore Normale)
PCV (%)	44	(22-34)
RBC (10 ⁶ /μL)	1	(-)
Hgb (g/dL)	5	(-)
MCV (fL)	NC (non calcolato)	(-)
MCH (pg)	NC (non calcolato)	(-)
MCHC (g/dL)	NC (non calcolato)	(-)
WBC (10 ³ /μL)	17.2	(5-12.5)
Eterofili (10³/μL)	5.5	(1.3-4.6)
Linfociti (10 ³ /μL)	4	(3.6-7.6)
Monociti (10 ³ /μL)	1.8	(0-0.02)
Eosinofili (10 ³ /μL)	0.6	(0.02-0.06)
Basofili (10 ³ /μL)	0.3	(0.02-0.08)

U/L), acido urico (8.2 mg/dL) (0.8-3.9 mg/dL), rispetto ai valori di riferimento riportati per la specie¹. È stato eseguito un esame citologico per spazzolamento dell'epitelio linguale del cavo orale (Figura 2).

Il soggetto è stato sottoposto ad eutanasia su richiesta del proprietario a causa di un peggioramento delle condizioni generali a 48 ore circa dal ricovero. L'esame autotico ha rivelato glossite, faringite, una moderata iperemia del parenchima polmonare ed epatomegalia. Il fegato appariva inoltre di colore giallastro, di consistenza friabile.

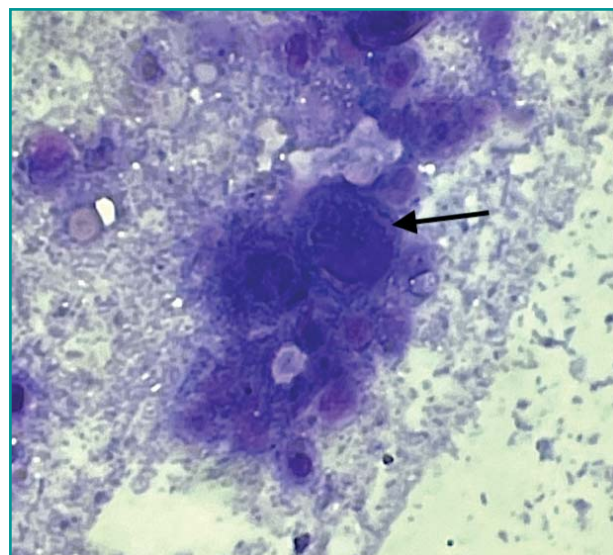


Figura 2 - Preparato citologico ottenuto per spazzolamento del cavo orale del paziente. La cromatina nucleare di un cheratinocita infettato presenta la tipica marginazione visibile come un anello color viola chiaro alla colorazione rapida Colorazione Diff Quick® 1000X (freccia) dovuta alla presenza di inclusione virale. Sono visibili, inoltre, numerosi aggregati batterici sul fondo del preparato.

Domande

- 1) Osservando l'immagine del preparato citologico (Figura 2), cosa osservi all'interno di una cellula epiteliale della mucosa orale?
- 2) Tenendo conto dell'anamnesi presentata, dei risultati dell'esame citologico, biochimico e della sintomatologia descritta, quali sono le più probabili diagnosi differenziali?

RISPOSTE

- 1) Presenza di corpo incluso intranucleare acidofilo e marginazione della cromatina nucleare.
- 2) Infezione da *Testudinis herpesvirus* (TeVHV), Testudine Intranuclear Coccidiosis (TINC), infezione da Ranavirus, *Mycoplasma* spp., stomatite/glossite batterica o micotica.

DISCUSSIONE

L'esame citologico ottenuto tramite spazzolamento (cytobrush) della mucosa del cavo orale e colorato con colorazione rapida Diff Quick® ha evidenziato la presenza di numerosi gruppi di cheratinociti talvolta aventi caratteri di atipia cellulare (anisocariosi, anisocitosi, cromatina addensata). All'interno del nucleo di alcuni di essi, erano evidenti corpi inclusi acidofili con marginazione della cromatina visibile come un anello più chiaro perinucleare, come descritto da Vetere e colleghi in un recente studio prospettico². Sul fondo del preparato erano presenti, inoltre, numerosi batteri coccoidei e bastoncellari facenti parte della flora batterica del cavo orale. Dalla PCR eseguita da tampone del cavo orale è emersa positività per *Testudinis herpesvirus*¹ (TeVHV1). I virus appartenenti alla famiglia Herpesviridae sono virus a DNA non provvisti di envelope, che possono evadere il sistema immunitario dell'ospite entrando in latenza all'interno dei gangli del sistema nervoso centrale. I segni clinici sono generalmente aspecifici ed includono letargia, anoressia, dispnea e scolo oculonasale^{2,3}. La replicazione virale all'interno delle cellule epiteliali causa spesso fenomeni di necrosi, che a livello linguale si manifestano con la formazione di placche necrotico-difteroidi di colore biancastro^{2,3}. La trasmissione virale avviene per via orizzontale da soggetti infetti a soggetti sani^{2,3,4}. Ad oggi, la trasmissione verticale non è stata dimostrata^{2,3}. La comparsa di sintomi clinici associata allo sviluppo di lesioni più o meno gravi (glossite, stomatite, epatite) è spesso correlata alla scarsa efficienza del sistema immunitario dell'ospite in corrispondenza del risveglio della tartaruga dal letargo invernale, che permette al virus di riemergere dallo stadio di latenza^{3,4,5}. L'eterofilia rilevata all'esame emocromocitometrico è da correlarsi probabilmente alla concomitante infezione virale/presenza di infezioni batteriche ad irruzione secondaria⁴. Un grave incremento di AST, ALT, ALP, CK, è compatibile con danni epatici severi (epatite) o sofferenza tissutale legata alla massiva replicazione virale e conseguente necrosi cellulare^{3,4}. TeHV1 sembra essere comune nelle testuggini russe rispetto ad altri ceppi (TeVHV3) associato a gravi epidemie nelle *Testudo graeca* e *Testudo hermanni*^{2,3,4,5}. L'ipotesi più accreditata è una co-evoluzione tra il ceppo virale e la specie ospite, che ha acquisito negli anni una minor

sensibilità nei confronti dello stesso. Attualmente, non esiste una terapia efficace contro le infezioni da TeHV^{4,5}. Farmaci antivirali come gancyclovir, acyclovir e valacyclovir possono essere utilizzati per ridurre la carica virale durante la fase replicativa. Infezioni batteriche secondarie devono essere trattate con terapia antibiotica dopo esecuzione di esame batteriologico ed antibiogramma^{2,4,5}. Terapie di supporto come fluidoterapia, alimentazione assistita/forzata tramite applicazione di una sonda esofagostomica e l'utilizzo di integratori vitaminici ed epatoprotettori sono da considerarsi essenziali al fine di supportare la funzionalità renale, epatica e supportare il sistema immunitario del paziente². Nonostante le cure intensive, nella maggior parte dei casi sintomatici, la prognosi non è favorevole^{2,5}. Il medico veterinario dovrebbe quindi valutare attentamente le condizioni generali del paziente e prendere in considerazione l'eutanasia in caso di evidente stato di sofferenza dell'animale colpito. L'introduzione di un soggetto infetto all'interno di una collezione può essere devastante e portare all'infezione o al decesso di tutti gli esemplari nel tempo^{2,4}. È di fondamentale importanza istruire il proprietario (che sia un allevatore amatoriale o chiunque si appresti all'acquisto o all'introduzione di un nuovo soggetto nella propria collezione) di eseguire un periodo di quarantena più lungo possibile durante il quale verranno eseguiti almeno due test molecolari (il primo all'ingresso e il secondo al termine della quarantena) che dovranno risultare entrambi negativi per patologie infettive trasmissibili, come ad esempio Herpesvirus, *Mycoplasma* spp., Ranavirus e Testudine Intranuclear Coccidiosis (TINC). Infatti, benché tramite l'esame citologico per spazzolamento del cavo orale vengano osservati talvolta corpi inclusi intranucleari nelle infezioni più gravi, essi possono non essere identificati in infezioni latenti o nella fase non replicativa virale².

BIBLIOGRAFIA

1. Knotková Z, Doubek J, Knotek Z, et al. Blood cell morphology and plasma biochemistry in Russian tortoises (*Agryonemys horsfieldi*). Acta Veterinaria Brno 71(2):191-8, 2002.
2. Vetere A, Bertocchi M, Pelizzone I, et al. Cytobrushing of the oral mucosa as a possible tool for early detection of testudinid herpesvirus in Horsfield's tortoises with nonspecific clinical signs. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation 33(1):116-119, 2021.
3. Marenzoni ML, Santoni L, Felici A, et al. Clinical, virological and epidemiological characterization of an outbreak of Testudinid Herpesvirus 3 in a chelonian captive breeding facility: lessons learned and first evidence of TeHV3 vertical transmission. PLoS one May 10;13(5):e0197169, 2018.
4. Origgi F, et al. Diagnostic tools for herpesvirus detection in chelonians. Abstract presented at: 7th Assoc Reptilian and Amphibian Veterinarians (ARAV) Annual Conf; Reno, NV; October 2000:127-129.
5. Gaio C, Rossi T, Villa R, et al. Pharmacokinetics of acyclovir after a single oral administration in marginated tortoises, *Testudo marginata*. Journal of Herpetological Medicine and Surgery 7(1):8-11, 2007.