

Medetomidina-Ketamina-Midazolam e Butorfanolo (MKMB) per l'anestesia intramuscolare nella tartaruga comune (*Caretta caretta*)

RIASSUNTO

Dieci tartarughe marine (6 adulti, 4 sub-adulti), soccorse nel mare Adriatico, sono state sottoposte ad anestesia per diverse procedure cliniche e chirurgiche. Tutti i soggetti erano affetti da patologie di varia natura ed entità, ma in nessun soggetto si rilevavano condizioni critiche. L'obiettivo di questo studio era di valutare l'efficacia e gli effetti anestesiológicos di un protocollo anestetico nella tartaruga marina comune (*Caretta caretta*) che prevede l'uso di una combinazione di medetomidina, ketamina, midazolam e butorfanolo. Il monitoraggio anestesiológico includeva le misurazioni della frequenza cardiaca e respiratoria e la presenza/assenza di vari riflessi a intervalli regolari prima e durante le procedure. Al termine degli interventi, l'effetto dell'anestesia è stato parzialmente soppresso con atipamezolo. L'induzione, la durata dell'anestesia e i tempi di risveglio sono stati registrati. Il tempo di induzione è stato di $19,7 \pm 5,97$ minuti. La combinazione è stata in grado di garantire un piano anestetico chirurgico per una media di $65,7 \pm 26,1$ minuti. Il tempo di recupero dopo la somministrazione di atipamezolo è stato di $22,5 \pm 6,23$ minuti. La combinazione studiata ha fornito un'anestesia adeguata ad eseguire procedure diagnostiche e minori chirurgie, aggirando il bisogno di un'iniezione endovenosa e avendo una durata maggiore rispetto ad altri agenti anestetici iniettabili solitamente impiegati. Ulteriori studi sono necessari per determinare il reale effetto analgesico di questo protocollo.

**G. Nardini^a, S. Silveti^b, I. Magnelli^c,
N. Di Girolamo^d, M. Bielli^e**

^a DMV, PhD, Modena

^b DMV, Novara

^c DMV, Firenze

^d DMV, Roma

^e DMV, Novara

INTRODUZIONE

L'anestesia e l'analgesia sono procedure spesso richieste nella gestione medica delle tartarughe marine, tuttavia il monitoraggio anestesiológico e la valutazione della profondità anestesiológica sono problematici nei rettili.¹⁻³ Per l'anestesia dei cheloni sono stati proposti molti protocolli e attualmente le principali opzioni si basano sull'impiego di agenti iniettabili per via endovenosa per le procedure brevi, eventualmente seguiti dalla somministrazione di anestetici per inalazione per interventi chirurgici maggiori.⁴⁻⁷

Il propofolo al dosaggio di 4-8 mg/kg è utilizzato per l'immobilizzazione o come agente induttore in corso di anestesia chirurgica. I suoi principali vantaggi sono la rapida induzione, la breve durata di azione e la sicurezza.^{5,7,8} Il principale svantaggio del propofolo è la necessità della somministrazione endovenosa, non sempre fattibile nei rettili, e la breve durata di azione quando è richiesta un'anestesia prolungata.

Un'alternativa è l'anestetico neurosteroidale alfaxalone.^{9,10} In cheloni di varie specie, somministrato per via intracelomatica, ha mostrato un effetto anestetico soddisfacente,¹¹ ma iniettato per via intramuscolare ha dato risultati controversi¹²⁻¹⁴ e fortemente temperatura-dipendenti.¹⁴ Inoltre, il dosaggio di alfaxalone intramuscolare richiesto per raggiungere un piano chirurgico soddisfacente può essere molto elevato.¹⁴ Il suo effetto analgesico non è stato definitivamente dimostrato nei rettili. Di conseguenza l'uso dell'alfaxalone, come del propofolo è essenzialmente inteso come agente di induzione o per anestesi brevi in cui non vengano applicati stimoli algici.

Per ovviare alle limitazioni di propofolo e alfaxalone e abbreviare i tempi di induzione e di recupero della semplice combinazione di medetomidina e ketamina, gli autori hanno valutato l'efficacia di una miscela di medetomidina, ketamina, midazolam e butorfanolo, iniettata per via intramuscolare come agente di induzione nelle tartarughe marine.

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato effettuato su 10 esemplari (4 subadulti e 6 adulti) di tartaruga comune (*Caretta caretta*) con un peso variabile da 8 a 74 kg. Tutti i soggetti sono stati soccorsi nel mare Adriatico dal Centro di recupero della Fondazione Cetacea Onlus (Riccione, RN, Italia) 2006-2012 (Tab. I).

L'esame clinico eseguito su tutte le tartarughe includeva la misurazione del peso, della temperatura cloacale, della frequenza cardiaca (FC) mediante uso di doppler vascolare, della frequenza respiratoria (FR) a

"Articolo ricevuto dal Comitato di Redazione il 31/10/2013, accettato il 10/01/2014 e pubblicato dopo revisione".

riposo, la valutazione della condizione corporea e di eventuali lesioni superficiali, nonché l'esame neurologico nei casi in cui era evidente o sospetto un trauma cranico.

Si eseguivano prelievi dalla vena giugulare in tutti gli esemplari per le determinazioni dell'ematocrito (PCV), dei solidi plasmatici totali (TS), della glicemia (GLU), ed è stato valutato uno striscio di sangue per la stima totale dei globuli bianchi (WBC), il conteggio differenziale dei leucociti e la morfologia delle cellule del sangue. I campioni ematici si prelevavano con siringhe da 2,5 ml e si trasferivano immediatamente in provette contenenti litio-eparina.

Le tartarughe incluse erano affette da varie malattie, ma in nessuna erano evidenti condizioni critiche. Il gruppo, pertanto, non è omogeneo in termini di dimensioni, età, sesso e condizione clinica. I dettagli sono riportati nella Tabella I.

Tutti i soggetti sono stati mantenuti a digiuno per almeno 12 ore prima dell'anestesia e in quei pazienti in cui era stata prevista una scansione di tomografia computerizzata veniva posizionato un catetere endovenoso giugulare.

Il protocollo anestesiológico comprendeva la somministrazione di midazolam (Midazolam - Hameln, Hameln Pharmaceuticals GmbH, Hameln, Germania) 1,5 mg/kg e butorfanolo (Dolorex, Intervet Int BV, Boxmeer, Nederland) 0,5 mg/kg combinati nella stessa siringa ed iniettati nel muscolo deltoide. A distanza di 15 minuti venivano iniettati nel deltoide controlaterale medetomidina (Domitor, Orion Corporation, Espoo, Finlandia), 0,18 mg/kg e ketamina (Imalgene 1000, Merial SpA, Milano, Italia), 8 mg/kg, miscelati nella stessa siringa. Al termine delle procedure si somministrava nel muscolo deltoide atipamezolo (Antisedan, Orion Corporation, Espoo, Finlandia) al dosaggio di 1,8 mg/kg.

Dopo l'induzione tutte le tartarughe sono state sistematicamente intubate con un tubo tracheale di Rusch di diametro appropriato in base alla dimensione dell'animale, senza insufflare la cuffia, e collegate a un circuito di Bain per la somministrazione di ossigeno ad una velocità di 100 - 150 ml/kg/h. Nei casi in cui l'intervento chirurgico o diagnostico si è protratto per oltre 100 minuti, l'anestesia è stata mantenuta mediante la somministrazione di una miscela di isoflurano al 2-4% e ossigeno). La decisione di aggiungere isoflurano veniva presa quando FC e FR aumentavano oltre 20 e 10, rispettivamente, per almeno tre intervalli consecutivi di 5 minuti. Durante tutta la procedura, la temperatura corporea è stata mantenuta tra 28 e 32°C mediante un materassino a ricircolo di acqua calda (Pompa T - 500, Gaymar Industries Inc., Orchard Park, NY, 14127 Stati Uniti). Il monitoraggio della temperatura corporea avveniva a livello cloacale con un termometro digitale (6450, Barotherm, 20148 Milano, MI, Italia).

Il monitoraggio clinico dell'anestesia includeva la valutazione dei riflessi palpebrali, del riflesso di retrazione a livello degli arti posteriori, dei riflessi cloacale e corneale a intervalli di 5 minuti, dando un punteggio soggettivo da 0 a 3 (0 = assente, 1 = molto debole, 2 = debole, 3 = vigoroso). Il monitoraggio strumentale dell'anestesia si eseguiva tramite Doppler (811 - B, Parks Medical Electronics Inc., Aloha, OR, USA) con il sensore posizionato alla base del collo sopra l'arteria carotide comune per il flusso di sangue e la frequenza cardiaca (FC), e tramite capnografo (602-14, Criticare Systems Inc., Waukesha, WI, USA). I valori di FC, FR e ET-CO₂ si misuravano ogni 5 minuti durante l'anestesia dall'intubazione al risveglio.

Per ogni animale, si registravano il tempo di induzione, la durata dell'anestesia, la somministrazione di atipamezolo e i tempi di risveglio. Il tempo di in-

TABELLA I

Caratteristiche della popolazione di tartarughe marine (*Caretta caretta*) incluse nello studio. Gli asterischi indicano i casi in cui le procedure si estendevano oltre la durata del protocollo anestesiológico iniettivo e si rendeva necessaria la somministrazione di isoflurano. M: Maschio; F: Femmina; Nd: Non determinato; Ad: Adulto; Sub-ad: Subadulto; TC: Tomografia computerizzata.

Caso #	Sesso	Età	Peso (kg)	Indicazioni per l'anestesia
1	M	Ad	40	TC, broncoscopia
2	F	Ad	74	TC, chirurgia minore per fratture del cranio
3	Nd	Sub-ad	13	TC, chirurgia minore per fratture del cranio
4	F	Ad	65	TC, controllo per guarigione ferita
5	Nd	Sub-ad	15	Rimozione corpo estraneo esofageo
6*	Nd	Sub-ad	8	Gastroscoopia per rimozione corpi estranei gastrici ed esofagei
7	M	Ad	65	Exeresi granuloma della pinna
8*	F	Ad	50	TC, broncoscopia con biopsie multiple
9	Nd	Sub-ad	13	Radiografie e biopsie cutanee
10	F	Ad	48	TC, enucleazione

duzione è stato classificato come il tempo impiegato dalla somministrazione di medetomidina e ketamina al raggiungimento di un'adeguata sedazione, i.e., quando il riflesso di retrazione podale era arrivato a livello 0 o 1 e il tono della mandibola era perso rendendo l'intubazione facilmente eseguibile. Il tempo di risveglio è stato calcolato dalla somministrazione dell'iniezione di atipamezolo al ripristino del punteggio 2 del riflesso di retrazione podale. La durata dell'anestesia veniva conteggiata dall'intubazione alla somministrazione di atipamezolo.

Analisi statistica

Si valutava la distribuzione dei dati ottenuti mediante istogrammi di frequenza. Si utilizzava un test t di Student per dati appaiati a due code per confrontare FC e FR prima e dopo l'induzione (minuto 10), considerando significativo un valore $\leq 0,05$.

RISULTATI

La combinazione MKMB è risultata efficace in tutti i casi riportati. L'induzione è stata agevole e relativamente rapida con un tempo medio di 19,7 \pm 5,94 minuti (range 14-34 minuti).

La combinazione MKMB garantiva un piano anestetico chirurgico per tutte le tartarughe per una media di 65,7 minuti (range 36-109 minuti), indipendentemente dalla procedura eseguita.

In tutti i casi, 10 minuti dopo l'induzione è stata osservata una significativa diminuzione di FC e FR rispetto ai livelli degli animali coscienti, con valori medi da 39 a 16,6 ($P < 0,001$, t-test), e da 16,4 a 7,2 ($P < 0,001$, t-test), rispettivamente.

La ventilazione manuale è stata applicata in soli

due casi (caso #1, caso #9) quando la FR era inferiore a 5 atti al minuto.

In due casi su dieci (caso #6, caso #8), l'intervento chirurgico si protrasse oltre l'attività della combinazione iniettabile e il mantenimento dell'anestesia è stato possibile mediante la veicolazione di isoflurano nel flusso di ossigeno dopo 109 e 100 minuti, rispettivamente. La decisione di aggiungere isoflurano è stata presa quando FC e FR aumentavano rispettivamente oltre i valori di 22 e 10.

In questi due casi, FC e FR diminuivano nuovamente durante la somministrazione dell'anestesia inalatoria fino a valori medi rispettivamente di 17,5 e 7,5; FC e FR misurate durante la somministrazione di isoflurano non sono state incluse nel presente studio. A questi pazienti è stato somministrato atipamezolo alla fine dell'anestesia per inalazione e il tempo di risveglio è stato calcolato da quel momento.

Tra i riflessi monitorati, i riflessi cloacale e di retrazione podale sono stati i primi a svanire in tutti i pazienti tranne nella tartaruga #1, che faceva registrare uno score da 0 a 2, a 20 minuti dall'induzione per poi rimanere assente per tutta la durata dell'anestesia. Il ripristino di entrambi i riflessi, cloacale e di retrazione podale, è stato evidente solo durante la fase di risveglio. Il riflesso palpebrale mostrava uno score da 0 a 1 a 30 minuti dopo l'induzione in tutti i soggetti. Nei casi #3, #4, #9 e #10, era assente dopo 25 minuti.

In tutte le tartarughe il riflesso corneale si è mantenuto a un livello 1 per tutta la durata dell'anestesia. In tutti i casi, non è stato osservato nessun aumento significativo di FC, FR o dei livelli dei riflessi quando venivano applicati stimoli dolorosi. I valori di $ETCO_2$ si sono rivelati altamente variabili in tutti i soggetti con valori com-

TABELLA 2

Parametri valutati nello studio. Gli asterischi indicano i casi in cui le procedure si estendevano oltre la durata del protocollo anestesiológico iniettivo e si rendeva necessaria la somministrazione di isoflurano. RR: frequenza respiratoria; HR: frequenza cardiaca; SD: deviazione standard.

Caso #	Tempo di induzione (min.)	Durata dell'anestesia (min.)	Tempo di risveglio (min.)	RR Prima/durante	HR Prima/durante
1	34	48	14	15/5	36/12
2	18	32	24	22/8	48/14
3	14	63	22	16/7	40/12
4	16	26	27	24/8	42/16
5	19	78	18	12/7	36/18
6*	16	109 (+45)	12	17/8	38/18
7	26	80	28	15/6	36/20
8*	23	100 (+37)	34	16/7	40/16
9	15	48	23	13/6	34/18
10	16	73	23	14/10	40/22
Media \pm SD	19,7 \pm 5,94	65,7 \pm 26,1	22,5 \pm 6,23	16,4/7,2 \pm 3,61/1,33	39/16,6 \pm 3,82/3,1

presi tra 28 - 35 mmHg all'inizio dell'anestesia e durante il risveglio, e in un intervallo di 6-15 mmHg durante l'anestesia. Il risveglio dall'anestesia è stato veloce e senza incidenti in tutti i casi, anche in quelli in cui è stata necessaria la supplementazione di isoflurano per prolungare l'anestesia. Il tempo di recupero medio è stato di $22,5 \pm 6,23$ minuti (range 12-34 minuti). Tutte le tartarughe sono state in grado di tornare in vasche aperte entro le successive 24 ore.

DISCUSSIONE

L'anestesiologia dei rettili è una branca in rapida evoluzione e scarsamente compresa, soprattutto a causa della variabile di risposta inter-specifica ai diversi farmaci e alla mancanza di studi controllati. Inoltre, le caratteristiche anatomiche e fisiologiche delle tartarughe marine, comuni ad altre specie di rettili, comportano l'abilità di sopportare lunghi periodi di ipossia e di far fronte a squilibri acido-base che sarebbero letali per i mammiferi o per gli uccelli^{15,16} rendendo il monitoraggio dell'anestesia incoerente e difficoltoso.

La combinazione MKMB valutata in questa serie di casi è risultata adeguata per l'esecuzione di procedure diagnostiche e chirurgiche di breve e media durata, in maniera analoga a simili combinazioni usate in precedenza.^{4,17-20} Per l'esecuzione di procedure chirurgiche di lunga durata (>100 minuti), potrebbe essere necessario il mantenimento in isoflurano. Mentre le proprietà sedative e anestetiche del midazolam nei cheloni sono discutibili quando viene usato da solo,^{4,21,22} le sue proprietà sono efficaci quando è usato in combinazione con altri farmaci⁴ ed i nostri risultati concordano.

L'accesso alle vie aeree è indispensabile per la ventilazione assistita, per la somministrazione di anestetici inalatori e permette il monitoraggio respiratorio. L'intubazione delle tartarughe marine coscienti è difficile e potenzialmente dannosa per il paziente e il personale¹ e presenta forti criticità sotto il profilo etico. Anche nelle tartarughe leggermente sedate, l'intubazione non è sempre facilmente attuabile.¹⁹

Lo stesso si potrebbe dire per le proprietà analgesiche del butorfanolo nei cheloni, così come in altre specie di rettili. Mentre alcuni autori, in studi di laboratorio, l'hanno trovato inefficace,^{23,24} altri ricercatori ottenevano un effetto analgesico e sedativo nei cheloni^{6,25} e nelle iguane.²⁶

Gli effetti sinergici dei quattro farmaci sembrano fornire un buon effetto analgesico come dimostrato dalla stabilità di FC, FR e dei livelli dei riflessi anche quando vengono applicati stimoli algici. Ciononostante, solo mediante uno studio randomizzato controllato, propriamente designato, si potrà determinare l'effetto analgesico di tale combinazione. I vantaggi di questa combinazione sono l'oppor-

tunità di evitare l'iniezione endovenosa, la possibilità di essere parzialmente antagonizzata con l'atipamezolo. Recentemente è stata dimostrata l'efficacia del tramadolo come analgesico nei cheloni.^{27,28} Potrebbe essere quindi interessante valutare la combinazione tramadolo-ketamina-medetomidina in tartarughe marine in un ulteriore studio prospettico.

Nonostante il dosaggio standard di atipamezolo per la soppressione della medetomidina sia riportato essere lo stesso volume della medetomidina (i.e., 5 volte la dose di medetomidina in mg),³ si è notato che una dose pari al doppio del volume della medetomidina (i.e., 10 volte la dose di medetomidina in mg) ha determinato un risveglio più veloce. La combinazione è anche particolarmente indicata in situazioni dove l'anestesia per inalazione non è disponibile. Inoltre, la mancata antagonizzazione della medetomidina potrebbe garantire un allungamento dei tempi di risveglio del paziente utile nelle situazioni in cui una tartaruga marina debba essere trasferita presso un'altra struttura a seguito di procedure cliniche o chirurgiche.

Ci sono diverse limitazioni nella presente serie di casi. Il nostro studio è stato basato su casi clinici e dato che tutti gli animali hanno subito vari gradi di lesioni, la variabilità di tali condizioni pone limiti evidenti allo studio. Vista la natura clinica, non è presente un gruppo di controllo in cui un differente protocollo anestesiologico poteva essere impiegato. Infine, la valutazione oggettiva della percezione algica nelle tartarughe non è stata possibile visto il design clinico della serie di casi. Ciononostante la presente serie di casi fornisce un utile spunto per futuri studi randomizzati controllati sull'impiego della combinazione di farmaci descritta.

Parole chiave

Anestesia, analgesia, *Caretta caretta*, butorfanolo, ketamina, medetomidina, midazolam, tartarughe marine

Medetomidine-Ketamine-Midazolam and Butorphanol (MKMB) as intramuscular injectable combination for anesthesia in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*)

Summary

Ten loggerhead sea turtles (six adult, four sub-adult), rescued in the Adriatic Sea, underwent anesthesia for various clinical and surgical procedures. The rescued turtles were all in good to acceptable body condition but suffered various degrees of diseases or injury. Opportunity was taken to assess reliability and physiological effects of an anesthetic protocol in loggerhead sea turtles using a combination of medetomidine, ketamine,

midazolam and butorphanol. The combination was administered with two separate injections at room temperature in the left and right deltoideus muscle and the body temperature of the turtles was maintained in a range between 28 and 32°C throughout the procedures. Heart and respiratory frequencies and various reflexes were recorded at regular intervals prior and during the procedures. At the end of the procedures, anesthesia was partially reversed with atipamezole. Induction, duration of anesthesia and recovery times were recorded. Induction time was 19.7 ± 5.97 minutes. The combination was able to warrant a surgical anesthetic plan for a mean of 65.7 ± 26.1

minutes. Recovery time after atipamezole administration was 22.5 ± 6.23 minutes. Analgesia was considered good even when painful stimuli were applied. The combination studied provided a reliable anesthesia bypassing the need for intravenous injection and lasting further than other injectable anesthetic agents. Induction time and recovery time, after atipamezole administration, were fast and uneventful.

Key words

Anesthesia, analgesia, *Caretta caretta*, butorphanol, ketamine, medetomidine, midazolam, sea turtle.

BIBLIOGRAFIA

1. Moon PF, Stabenau EK (1996) Anesthetic and postanesthetic management of sea turtles. *J Am Vet Med Assoc* 208:720-726.
2. Read MR (2004) Evaluation of the use of anesthesia and analgesia in reptiles. *J Am Vet Med Assoc* 224:547-552.
3. Schumacher J, Yelen T (2006) Anesthesia and analgesia. In: *Reptile Medicine and Surgery*. (2nd edn) Mader DR (ed). Saunders Elsevier, St. Louis, USA, pp 442-452.
4. Bienzle D, Boyd CJ (1992) Sedative effects of ketamine and midazolam in snapping turtles (*Chelydra serpentina*). *J Zoo Wild Med* 23:201-204.
5. Stahl S, Donoghue S (1997) Pharyngostomy tube placement, management and use for nutritional support in the chelonian patient. Proceedings of the 4th annual Conference of the Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians. Houston, Texas, USA, pp 93-97.
6. Bennett RA (1998) Reptile anesthesia. *Semin Avian Exot Pet* 7:30-40.
7. Ziolo MS, Bertelsen MF (2009) Effects of propofol administered via the supravertebral sinus in red-eared sliders. *J Am Vet Med Assoc* 234:390-393.
8. MacLean RA, Harms CA, Braun-McNeill J (2008) Propofol anesthesia in loggerhead sea turtles (*Caretta caretta*). *J Wild Dis* 44:143-150.
9. Bertelsen MF, Sauer CD (2011) Clinical efficacy of alfaxalone in green iguanas (*Iguana iguana*). *Vet Anaesth Analg* 38:461-466.
10. Knotek Z, Hrdá A, Knotkova Z, et al. (2013) Alfaxalone anesthesia in lizards. Proceedings of the 1st International Conference of Avian, Herpetological Exotic Mammal Medicine. Wiesbaden, Germany, pp 160-161.
11. Hackenbroich C, Failing K, Axy-Findt U et al. (1998) Alphaxalone anesthesia in *Trachemys scripta elegans* and its influence on respiration, circulation and metabolism. Proceedings of the 2nd Conference of European Association of Zoo and Wildlife Veterinarians, Chester, UK, pp 431-436.
12. Millchamp NJ (1988) Surgical techniques in reptiles. In: *Exotic Animals*. Jacobson ER, Kollias GV Jr (eds). Churchill Livingstone, New York, USA, pp 49-74.
13. Knotek Z, Hrdá A, Knotkova Z (2011) Anaesthesia of the red-eared slider (*Trachemys scripta elegans*) by intramuscular injection of alfaxalone. *Veterinarni Klinika* 8:2-44.
14. Kischinovsky M, Duse A, Wang T et al. (2013) Intramuscular administration of alfaxalone in red-eared sliders (*Trachemys scripta elegans*) - effects of dose and body temperature. *Vet Anaesth Analg* 40:13-20.
15. Belkin DA (1963) Anoxia: tolerance in reptiles. *Science* 139:492-493.
16. Lutz PL, LaManna JC, Adams MR et al. (1980) Cerebral resistance to anoxia in the marine turtle. *Resp Physiol* 41:241-251.
17. Lock BA, Heard DJ, Dennis P (1998) Preliminary evaluation of medetomidine/ketamine combinations for immobilization and reversal with atipamezole in three tortoise species. *Bull Assoc Rept Amph Vet* 8:6-9.
18. Greer LL, Jenne KJ, Diggs HE (2001) Medetomidine-ketamine anesthesia in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *Contemp Top Lab Anim Sci* 40:8-11.
19. Chittick EJ, Stamper MA, Beasley JF et al. (2002) Medetomidine, ketamine and sevoflurane for anesthesia of injured loggerhead sea turtles: 13 cases (1996-2000). *J Am Vet Med Assoc* 221:1019-1025.
20. Dennis PM, Heard DJ (2002) Cardiopulmonary effects of medetomidine-ketamine combination administered intravenously in gopher tortoises. *J Am Vet Med Assoc* 220:1516-1519.
21. Harvey-Clarke C. (1993) Midazolam fails to sedate painted Turtles (*Chrysemys picta*). *Bull Assoc Rept Amph Vet* 3:7-8.
22. Oppenheim YC, Moon PF (1995) Sedative effects of midazolam in red eared slider turtles (*Trachemys scripta elegans*). *J Zoo Wild Med* 26:409-413.
23. Sladky KK, Miletic V, Paul-Murphy J et al. (2007) Analgesic efficacy and respiratory effects of butorphanol and morphine in turtles. *J Am Vet Med Assoc* 230:1356-1362.
24. Sladky KK, Kinney ME, Johnson SM. (2009) Effects of opioid receptor activation on thermal antinociception in red-eared slider turtles (*Trachemys scripta*). *Am J Vet Res* 70:1072-1078.
25. Heard DJ (1993) Exotic pet I. Principles and techniques of anesthesia and analgesia for exotic practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 23:1301-1327.
26. Mosley CAE, Dyson D, Smith DA (2004) The cardiovascular dose-response effects of isoflurane alone and combined with butorphanol in the green iguana (*Iguana iguana*). *Vet Anaesth Analg* 31:64-72.
27. Baker BB, Sladky KK, Johnson SM. (2011) Evaluation of the analgesic effects of oral and subcutaneous tramadol administration in red-eared slider turtles. *J Am Vet Med Assoc* 2011; 238:220-7.
28. Sladky, K. K., & Mans, C. (2012). Clinical anesthesia in reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 21(1), 17-31.