



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Corso di Laurea Specialistica a ciclo unico

in Medicina Veterinaria

Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute

TESI DI LAUREA

## DISORDINI RIPRODUTTIVI DELLA CAGNA IN ALLEVAMENTO: ASPETTI GINECOLOGICI E ZOOTECNICI

Relatore: dr.ssa Chiara Milani

Correlatori: dr.ssa Rebecca Ricci  
Prof. Stefano Romagnoli

Laureando: Frasson Elisa

Matricola: 557568/MV

Anno Accademico 2011-2012



*Alla mia famiglia e a Fabio, i pilastri della mia vita*

*Alle nonne, che mi sostengono da lassù*

*Alla dr.ssa Milani, alla dr.ssa Ricci ed al prof. Romagnoli,  
per il prezioso aiuto e la pazienza*

*Ma soprattutto, a Martina e a Giuliano: grazie di cuore,  
anche se non sarà mai abbastanza*



## INDICE

<b>PREMESSA</b>	8
<i>I. Caratteristiche riproduttive delle cagne</i>	9
<b><u>SEZIONE 1: ASPETTI GINECOLOGICI</u></b>	<b>12</b>
<b>1 MANCATO CONCEPIMENTO</b>	<b>14</b>
<b><i>1.1 Ciclo estrale normale ed accettazione della monta</i></b>	<b>14</b>
<i>1.1.1 Fattori legati al maschio</i>	17
<i>1.1.2 Età delle fattrici</i>	20
<i>1.1.3 Rilevazione del periodo fertile</i>	21
<i>1.1.4 Tecnica di inseminazione artificiale</i>	31
<i>1.1.5 Infezioni vaginali ed uterine</i>	33
<i>1.1.6 Altre cause</i>	36
<b><i>1.2 Ciclo estrale ma mancata accettazione della monta</i></b>	<b>38</b>
<i>1.2.1 Fattori comportamentali/ psicologici</i>	40
<i>1.2.2 Alterazioni anatomiche dell'apparato riproduttore</i>	40
<b><i>1.3 Ciclo estrale irregolare</i></b>	<b>44</b>
<i>1.3.1 Anestro persistente primario</i>	44
<i>1.3.2 Anestro persistente secondario</i>	52
<i>1.3.3 Estro/proestro persistenti</i>	58
<i>1.3.4 Estro irregolare</i>	61
<b>2 RIASSORBIMENTO/ABORTO</b>	<b>66</b>
<b><i>2.1 Malattie infettive causa di riassorbimento/aborto</i></b>	<b>66</b>
<i>2.1.1 Brucellosi</i>	67
<i>2.1.2 Campylobacter spp</i>	73
<i>2.1.3 Salmonella spp</i>	73
<i>2.1.4 Escherichia coli</i>	74
<i>2.1.5 Streptococcus spp ed altri batteri</i>	74
<i>2.1.6 Herpesvirus canino</i>	75
<i>2.1.7 Altri virus</i>	76

<b>2.2. Malattie parassitarie</b>	<b>77</b>
2.2.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	77
2.2.2 <i>Neospora caninum</i>	77
2.2.3 <i>Leishmania</i>	78
<b>2.3 Farmaci</b>	<b>78</b>
<b>2.4 Patologie endocrine materne</b>	<b>80</b>
2.4.1 <i>Iperadrenocortcismo- ipoadrenocorticismo</i>	80
2.4.2 <i>Insufficienza luteinica</i>	80
2.4.3 <i>Ipotiroidismo</i>	81
2.4.4 <i>Diabete mellito</i>	81
2.4.5 <i>Tossiemia da gravidanza</i>	82
<b>2.5 Altre cause</b>	<b>82</b>
<b>3 DISTOCIA</b>	<b>85</b>
<b>4 MORTALITA' PERINATALE</b>	<b>90</b>
<b>4.1 <i>Ipotermia, ipoglicemia, disidratazione e patologie connesse</i></b>	<b>91</b>
4.1.1 <i>Inadeguata produzione di colostro/latte da parte della madre</i>	93
4.1.2 <i>Inadeguata assunzione di colostro/latte da parte della cucciolata</i>	94
<b>4.2 <i>Malattie infettive responsabili di mortalità perinatale</i></b>	<b>96</b>
4.2.1 <i>Setticemia</i>	96
4.2.2 <i>Herpesvirus canino</i>	97
<b><u>SEZIONE 2: ASPETTI ZOOTECNICI</u></b>	<b>100</b>
<b>1 STRUTTURE</b>	<b>101</b>
<b>1.1 <i>Prevenzione delle patologie infettive</i></b>	<b>101</b>
<b>1.2 <i>Stress</i></b>	<b>102</b>
<b>2 IGIENE</b>	<b>107</b>
<b>3 ALIMENTAZIONE</b>	<b>110</b>
<b>3.1 <i>Estro ed accoppiamento</i></b>	<b>112</b>
<b>3.2 <i>Gravidanza</i></b>	<b>113</b>
<b>3.3 <i>Lattazione</i></b>	<b>116</b>
<b>3.4 <i>Singoli nutrienti</i></b>	<b>118</b>

<b><u>SEZIONE 3: QUESTIONARIO</u></b>	<b>122</b>
<b>1 PREMESSA</b>	<b>122</b>
<b>2 MATERIALI E METODI</b>	<b>123</b>
<b>3 RISULTATI</b>	<b>126</b>
<b>4 DISCUSSIONE</b>	<b>134</b>
BIBLIOGRAFIA	138

## **PREMESSA**

I disturbi riproduttivi delle cagne comportano notevoli problemi al settore dell'allevamento canino: la riproduzione, infatti, rappresenta la sezione più importante dell'intero allevamento, quella che generalmente dovrebbe essere seguita con più attenzione da parte dell'allevatore, poiché è il buon funzionamento di questa che comporterà la vendita di un numero sufficiente di cuccioli.

Tali disturbi riproduttivi includono incapacità di concepire, riassorbimento-aborto, parto distocico (con relative conseguenze sulla vitalità dei cuccioli) e mortalità perinatale, dal momento che in quest'ultimo periodo i cuccioli risentono ancora della vita intrauterina e del parto e sono fortemente dipendenti dalla madre e dall'ambiente.

Sull'insorgenza e sull'evoluzione di tali problematiche sono coinvolti numerosi fattori che interessano la sfera ginecologica dal momento del calore al periodo post-partum. La numerosità di tali fattori (talvolta anche concomitanti) e la conseguente complessità delle indagini necessarie per effettuare una corretta diagnosi differenziale in caso di disturbi riproduttivi rende spesso difficile, e a volte infruttuosa, la ricerca delle cause.

A ciò si somma la possibilità, spesso sottovalutata, che mancato concepimento, riassorbimento-aborto, distocia e mortalità perinatale dipendano anche da fattori zootecnici riguardanti il management delle fattrici e dei neonati. Così come riconosciuto e ampiamente studiato negli animali da reddito, anche nell'allevamento canino la gestione delle strutture, dell'alimentazione e delle prassi igieniche influiscono sulle performance riproduttive.

L'obiettivo di questa tesi è quello di illustrare tutti i fattori potenzialmente coinvolti nei disturbi riproduttivi delle cagne in allevamento, e che quindi devono essere presi in considerazione per una diagnosi differenziale.

Successivamente, sono illustrati i risultati di un questionario inerente alle scelte manageriali che influiscono sulla riproduzione proposto ad alcuni allevatori di cani nella regione Veneto: il fine è quello di verificare le caratteristiche e le modalità di gestione dell'allevamento, ed eventualmente la relazione tra queste ed i disturbi riproduttivi se presenti.

Il risultato di tale lavoro suggerisce che una corretta indagine volta ad individuare le cause di ipofertilità d'allevamento prevede la raccolta di informazioni relative sia allo stato riproduttivo delle cagne, sia alla gestione dell'allevamento.

## ***I. Caratteristiche riproduttive delle cagne***

### ➤ PUBERTA'

E' raggiunta in un periodo variabile dai 6 ai 24 mesi, a seconda della razza: animali di taglia più grande manifestano il primo calore più tardivamente rispetto a quelli di taglia piccola (Davidson, 2006) (vedi tabella 1).

<b>RAZZA</b>	<b>RAGGIUNGIMENTO DELLA PUBERTA' (MESI)</b>
Alano	>18
Border Collie	6-8
Boxer	8-24
English Setter	7-20
Greyhound	11-30
Rottweiler	8
Samoiedo	>12
Yorkshire Terrier	8-16

Tabella 1 –*Età fisiologica della pubertà in alcune razze canine* (Evans et al., 1988)

### ➤ CICLO ESTRALE

Sono animali monoestrali, ma non è del tutto chiaro se si può parlare di stagionalità (Bouchard et al., 1992; Chatdarong et al., 2007; Linde-Forsberg e Wallen, 1992; Mutembei et al., 2000): l'addomesticamento sembra aver fatto perdere loro questo aspetto, sebbene sia stato dimostrato che il più alto tasso di accoppiamenti si verifica d'inverno, e viceversa in estate esso raggiunge i livelli minimi; questo porta ovviamente ad avere una maggiore distribuzione dei parti in primavera, ed inoltre proprio in questa stagione la dimensione delle cucciolate è maggiore (Gavrilovic et al., 2008).

	<b>PROESTRO</b>	<b>ESTRO</b>	<b>DIESTRO</b>	<b>ANESTRO</b>
<b>DURATA</b>	9 giorni in media (dai 3 ai 17 giorni)	9 giorni in media (dai 3 ai 21 giorni)	Variabile, tra 51 e 82 giorni	4,5 mesi in media
<b>COMPORAMENTO</b>	I maschio sono attratti dalle femmine; le femmine rifiutano il maschio. Vulva turgida e scolo siero-emorragico	Le femmine accettano la monta e manifestano la recettività spostando la coda di lato	Le femmine rifiutano il maschio	No c'è attrazione tra maschi e femmine
<b>ATTIVITA' OVARICA</b>	Attività follicolare in aumento	Luteinizzazione preovulatoria del follicolo	Attività dei corpi lutei. Il diestro termina con l'azione luteolitica delle prostaglandine	-

Tabella 2- Fasi del ciclo estrale (Feldman e Nelson, 2004; Davidson, 2006)

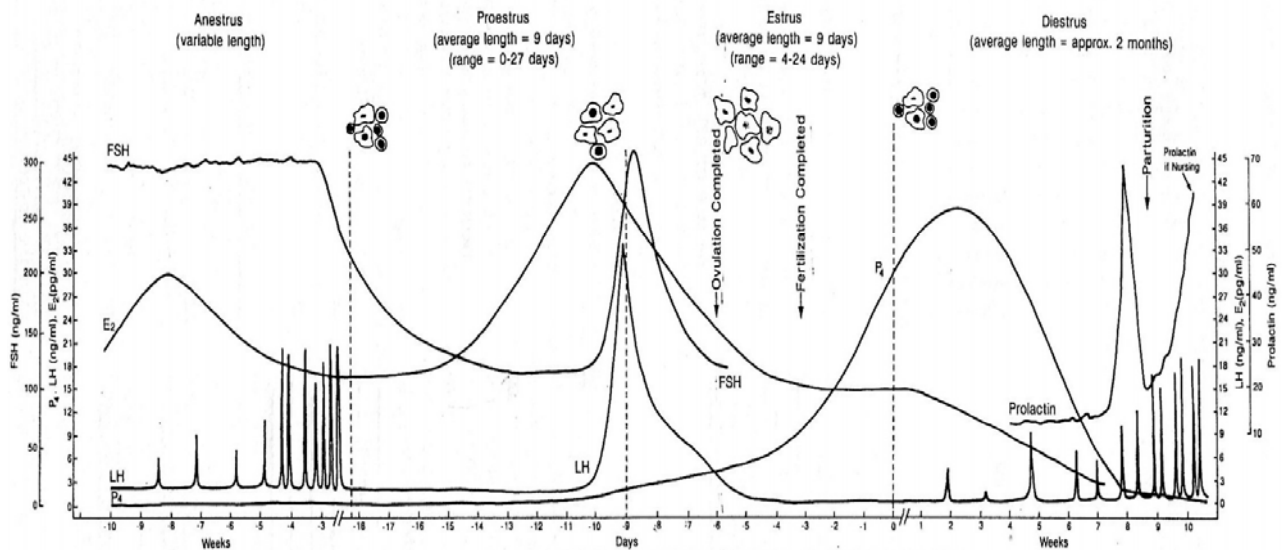


Figura 1- Ciclo estrale e relative variazioni ormonali (Johnston et al., 2001)

## ➤ GRAVIDANZA

La durata della gravidanza calcolata dal giorno del picco di LH è di 64-66 giorni e dal giorno dell'ovulazione 62-64 giorni; la gestazione dura però dai 56 ai 68-70 giorni dal giorno dell'accoppiamento (Concannon, 2002). Questa differenza si spiega innanzitutto con il fatto che la cagna ovula oociti primari che, in quanto tali, devono completare sia la prima che la seconda divisione meiotica prima di essere pronti per essere fecondati, il che richiede 24-48 ore. Una volta completato il processo di maturazione, gli oociti possono sopravvivere per altre 24-48 ore.

La longevità degli spermatozoi, che sono in grado di sopravvivere nelle vie genitali femminili fino a 7 giorni dopo l'accoppiamento, fa sì che una monta possa essere fertile anche se avvenuta fino ad una settimana prima dell'ovulazione (Concannon, 2002).

L'impianto inizia verso il 17°-22° giorno dopo l'accoppiamento, ovvero 16-18 giorni dopo il picco di LH, e si completa in 5-7 giorni (Holst e Phemister, 1971); la placenta è zonata, decidua ed endoteliochoriale (l'endotelio dei vasi uterini è in contatto con il corion fetale), motivo per cui poche immunoglobuline sono in grado di passare ai feti (Johnston et al., 2001).

## **SEZIONE 1: ASPETTI GINECOLOGICI**

Nella prima sezione della tesi sono illustrate tutte le possibili problematiche inerenti alla sfera ginecologica responsabili di disturbi riproduttivi nelle cagne, ovvero rispettivamente di mancato concepimento, riassorbimento-aborto, distocia e mortalità perinatale.

I fattori citati in questa sezione devono essere gestiti dal medico veterinario di allevamento, dal momento che includono le caratteristiche del maschio utilizzato e della tecnica di inseminazione, la rilevazione del momento fertile, la presenza di malattie infettive, parassitarie, endocrine o di patologie specifiche dell'apparato riproduttore, i fattori psicologici/comportamentali, la somministrazione di farmaci nocivi, l'insufficiente produzione di latte per la cucciolata o l'incapacità dei neonati ad assumerlo.

Ciascuna fase (mancato concepimento, riassorbimento-aborto, distocia, mortalità perinatale) è analizzata nei diversi capitoli tramite la presentazione delle varie cause da includere in diagnosi differenziale; sono descritte le caratteristiche di ognuno di questi fattori, in modo da poter utilizzare le informazioni raccolte durante la visita per effettuare l'indagine, individuare l'eziologia e proporre la terapia adatta.



## 1 MANCATO CONCEPIMENTO

La raccolta di un'anamnesi accurata è il primo passo nelle cagne sospettate di ipofertilità o di infertilità. L'anamnesi deve permettere di rilevare il maggior numero possibile di informazioni relative alla modalità con cui la cagna viene allevata, se il suo peso è corretto per lo standard di razza, se è stata sottoposta a trattamenti medici, ma anche le caratteristiche dei cicli precedenti, come le date di inizio di ciascun ciclo e la loro durata, il comportamento durante l'estro, le date e le modalità delle precedenti inseminazioni, la fertilità dei riproduttori maschi utilizzati (Nelson e Couto, 2003; Feldman e Nelson, 2004).

Da quanto risulta dall'anamnesi può essere possibile differenziare tre diversi scenari che portano a una presunta diagnosi di infertilità:

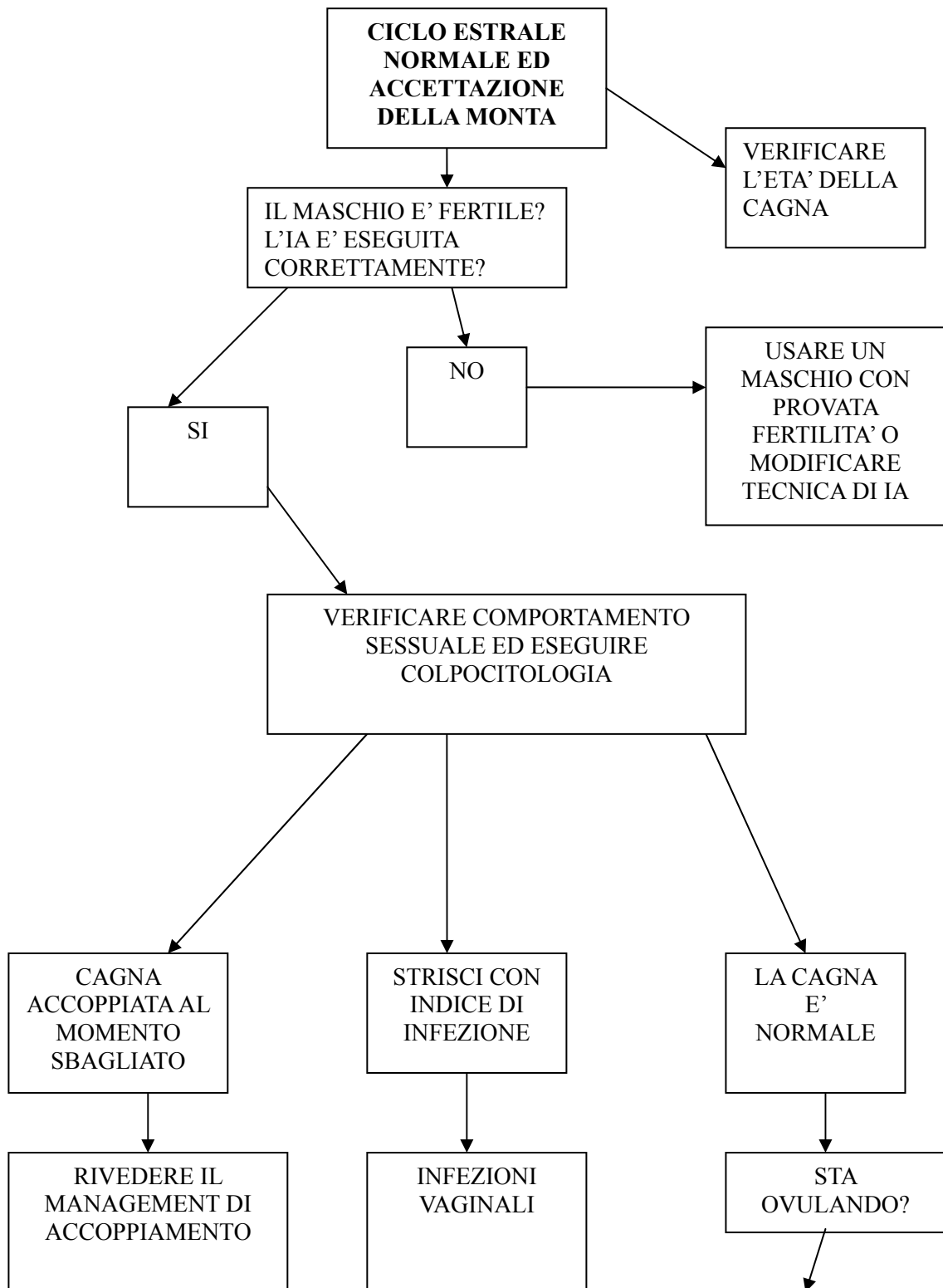
- A. ciclo estrale normale e accettazione della monta
- B. ciclo estrale normale ma mancata accettazione della monta
- C. ciclo estrale irregolare

Nei paragrafi successivi saranno descritti nel dettaglio tali scenari e le loro rispettive diagnosi differenziali.

### ***1.1 Ciclo estrale normale ed accettazione della monta***

Una cagna può non essere in grado di concepire nonostante presenti dei cicli estrali regolari, sia in termini di durata che di manifestazioni fisiche e comportamentali, e accetti la monta da parte del maschio durante l'estro. In questo caso la diagnosi differenziale dovrebbe prendere in considerazione la scorretta gestione dei fattori legati al calore e all'accoppiamento. È quindi necessario verificare la fertilità del maschio utilizzato, l'età cui le femmine vengono accoppiate, le metodiche di rilevazione del periodo fertile e, qualora l'allevatore vi ricorresse, la tecnica di inseminazione artificiale (IA).

Solo dopo aver indagato su questi fattori è utile considerare l'eventualità di un'infezione vaginale o uterina che impedisca la fertilizzazione e l'impianto, oppure la presenza di altre patologie più rare, quali l'occlusione di utero ed ovidotti o la presenza di anticorpi anti-sperma. Anche in presenza di cicli anovulatori la cagna non è in grado di concepire, ma più spesso in questo caso i cicli si presentano come irregolari [vedi paragrafo 1.3.4- estro irregolare].



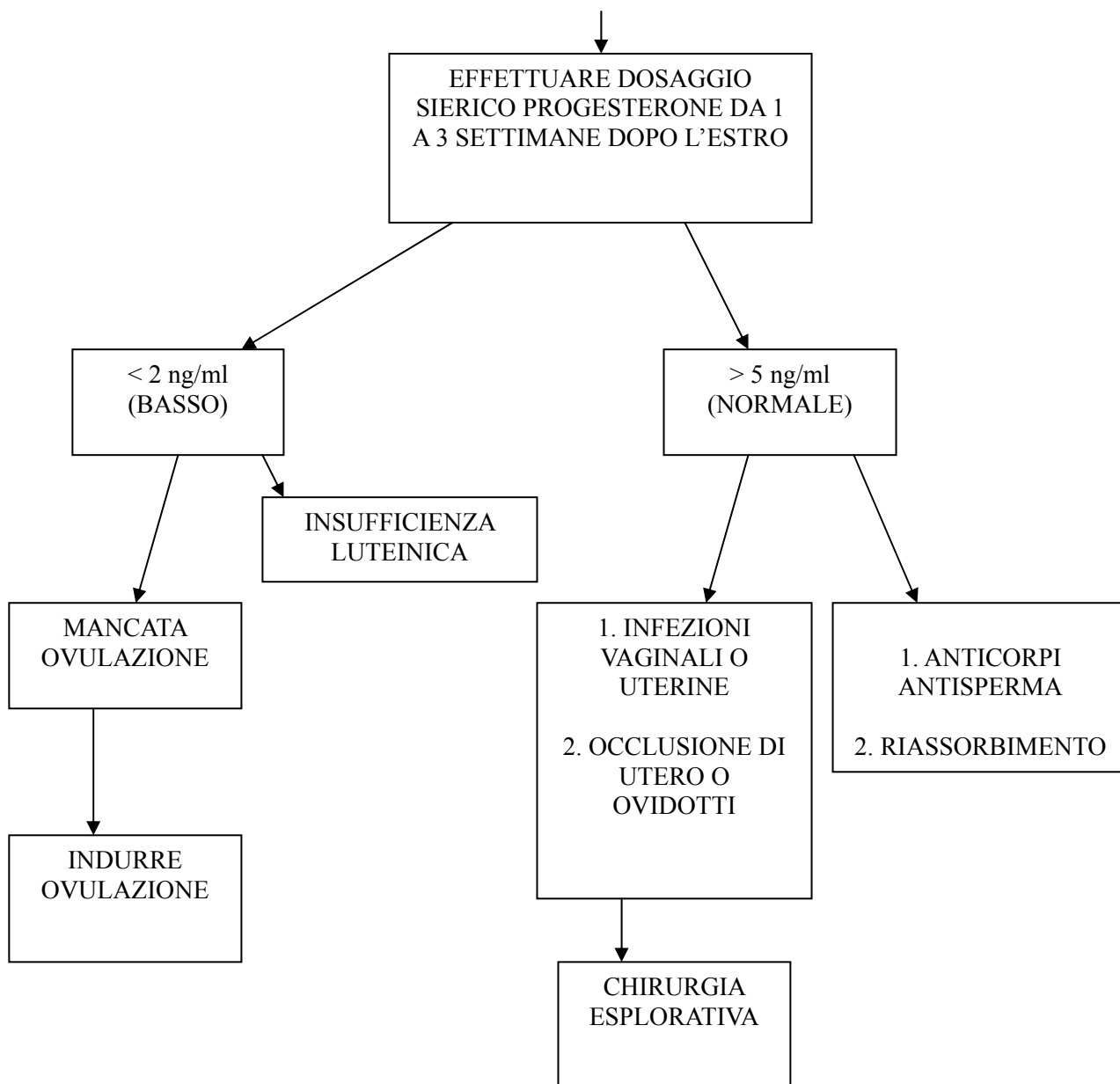


Figura 2 - Algoritmo diagnostico in caso di mancato concepimento con presenza di ciclo normale ed accettazione della monta (adattato da Feldman e Nelson, 2004)

### *1.1.1 Fattori legati al maschio*

Data la difficoltà ad investigare sulle potenziali cause di infertilità della cagna, se una cagna di fertilità nota non concepisce dopo un accoppiamento avvenuto durante un ciclo estrale normale, dovrebbe essere preso in considerazione di valutare anche il maschio utilizzato per la monta.

La fertilità maschile include una normale libido (vedi tabella 3), la capacità fisica dell'accoppiamento e una normale qualità del seme (vedi tabella 4) (Johnson, 2006).

Ogniqualvolta la fertilità maschile sia in discussione, l'allevatore ha tre alternative: 1) ottenere un esame del seme accompagnato dal titolo per Brucella relativi al cane in questione; 2) usare un altro maschio al successivo calore; 3) procedere anche con la valutazione della fertilità della femmina (Feldman e Nelson, 2004). Le caratteristiche dei parametri seminali variano tra soggetti, in base a taglia, età o quantità di tessuto testicolare funzionante (Saeger e Schubert, 1996), ma anche in relazione alla frequenza dei prelievi. Le principali alterazioni dello spermogramma correlate ad infertilità sono quelle relative a numero totale, morfologia e motilità degli spermatozoi (Nelson e Couto, 2003), sebbene anche la valutazione del colore possa fornire informazioni utili: sperma tendente al giallo è indice della presenza di urina (cani che urinano durante l'eiaculazione possono essere ipofertili) e sperma di colore rosso o rosa indica la presenza patologica di sangue di origine prostatica o causato dalla rottura di piccoli vasi superficiali del pene durante la raccolta.

L'azoospermia, ovvero la mancanza di spermatozoi nell'eiaculato, può essere causata da eiaculazione incompleta o problemi pre-testicolari, testicolari o post-testicolari (Ettinger e Feldman, 2008). Nelle cause pre-testicolari rientrano:

- Ipopituitarismo
- Terapie a lungo termine con elevate dosi di steroidi o antineoplastici
- Ipotiroidismo
- Ernia inguinale
- Febbre

I fattori testicolari includono:

- Anomalie della differenziazione sessuale
- Aplasia delle cellule germinali
- Criptorchidismo bilaterale
- Danno testicolare
- Irradiazione
- Orchite
- Disordini testicolari autoimmuni
- Neoplasie testicolari

Tra le cause post-testicolari si citano:

- Ostruzione degli epididimi o dei dotti deferenti
- Granulomi spermatici
- Spermatocele
- Infiammazione acuta
- Neoplasia
- Precedente vasectomia

L'oligozoospermia (basso numero totale di spermatozoi nell'eiaculato), invece, può essere causata da (Ettinger e Feldman, 2008):

- Tumore delle cellule del Sertoli
- Orchite
- Epididimite
- Prostatite
- Eiaculazione incompleta o retrograda
- Ostruzione parziale del deflusso
- Eccessivo impiego dello stallone, che ha come conseguenza una riduzione delle riserve spermatiche epididimarie

La teratozoospermia (bassa percentuale di spermatozoi morfologicamente normali) consegue a (Ettinger e Feldman, 2008):

- Fucosidosi (malattia congenita da accumulo lisosomiale che provoca ritenzione di gocce citoplasmatiche)
- Tumori testicolari
- Orchite
- Prostatite
- Esposizione a temperature troppo fredde o troppo calde, come in casi di febbre e obesità, in quanto il grasso periscrotale comporta un aumento della temperatura testicolare

La riduzione o l'assenza di motilità degli spermatozoi (astenozoospermia) riconosce le medesime cause della teratozoospermia, ma può anche essere connessa all'utilizzo di attrezzature contaminate o ad infezione delle vie genitali (Ettinger e Feldman, 2008).

<b>CAUSE DI SCARSA LIBIDO NEL MASCHIO</b>
Immaturità sessuale
Età
Cause psicologiche/ comportamentali (allontanamento dal proprio territorio, subordinazione alla femmina, subordinazione ad un maschio nelle immediate vicinanze)
Cagna non in estro
Dolore
Farmaci
Disordini metabolici/ endocrini

Tabella 3- *Principali cause di scarsa libido nel cane maschio* (Johnson, 2006)

	<b>NORMALE</b>	<b>ANORMALE</b>
<b>VOLUME</b>	2,5- >80 ml	
<b>COLORE</b>	Opalescente	Giallo, rosso, trasparente
<b>SPERMA TOTALE NELL'EIACULATO</b>	300 – 2000 x 10 <sup>6</sup>	< 200 x 10 <sup>6</sup> (azoospermia o oligozoospermia)
<b>% MOTILITA' PROGRESSIVA SPERMA</b>	>70%	< 50% (astenozoospermia)
<b>% MORFOLOGICAMENTE NORMALE</b>	> 80%	< 70% (teratozoospermia)
<b>PH</b>	6,3 – 6,7	
<b>WBC / CAMPO AD ELEVATA RISOLUZIONE</b>	< 6	> 7-10

Tabella 4- *Parametri del seme canino* (Johnson, 2006)

### 1.1.2 Età delle fattrici

I primi cicli dopo il raggiungimento della pubertà possono essere irregolari, con minor durata di proestro-estro, maggiore incidenza di *falsi calori* (manifestazioni tipiche dell'estro non accompagnate da ovulazione) o di *calori silenti* (ovulazioni in assenza di manifestazioni estrali) (Johnston et al., 2001; Wright e Watts, 1998). Il periodo di maggiore fertilità viene raggiunto dopo il secondo o terzo ciclo estrale, per questo è consigliabile attendere per il primo accoppiamento che la femmina abbia almeno superato il primo anno e mezzo di età (Johnston et al., 2001). È riportato, infatti, un aumento del tasso di concepimento nelle cagne accoppiate al terzo ciclo, ed una riduzione dal quinto in poi (Christiansen, 1984) (vedi tabella 5).

Anche cagne anziane possono manifestare un calo di fertilità. In uno studio di Johnson et al. (1987) più del 50% delle cagne sopra i 5 anni esaminate non sono state in grado di concepire; Borge et al. (2011) e Gavrilovic et al. (2008) hanno dimostrato che la prolificità (intesa come somma di cuccioli nati vivi e di nati morti nella cucciolata) è influenzata dall'età delle madri: cagne più anziane partoriscono un numero inferiore di cuccioli, e questo effetto si fa risentire soprattutto su razze giganti (vedi tabella 6). Il decremento del tasso di concepimento e della dimensione della cucciolata in cagne più anziane può essere spiegato col decremento nel numero degli oociti ovulati o della loro qualità, o con il deterioramento dell'ambiente uterino (Lemoule et al., 2011). Gli oociti raccolti da cagne comprese tra 45 giorni e 13,5 anni di vita presentano notevoli differenze tra loro (Rocha et al., 2006): un numero maggiore di oociti ma di qualità morfologica peggiore (su una media di 99 quelli degenerati erano 66) sono stati ottenuti da cagne con più di 9,5 anni rispetto a quelle con età compresa tra 2 e 6 anni (26,2 degenerati su 57,2 medi totali).

<b>CICLO</b>	<b>TASSO DI CONCEPIMENTO (%)</b>
Primo	84
Secondo	88
Terzo	95
Quarto	89
Dal quinto al settimo	78

Tabella 5- *Tassi di concepimento in cicli successivi* (Christiansen, 1984)

ETA' DELLA MADRE	RAZZE MOLTO PICCOLE (<5kg)	RAZZE PICCOLE (5-10 kg)	RAZZE MEDIE (10-25 kg)	RAZZE GRANDI (25-45 kg)	RAZZE GIGANTI (>45 kg)	TOTALE
<2	3,4	4,3	5,7	7,1	7,9	4,7
2	3,6	4,2	5,9	7	7,4	5,3
3	3,5	4,3	5,9	7,2	7,6	5,6
4	3,5	4,1	6	7	7,2	5,6
5	3,4	4	5,7	7	6,3	5,5
6	3,4	3,9	5,9	6,6	5,3	5,6
7 o più	3,1	3,8	4,9	6	6	5,1
<b>TOTALE</b>	3,5	4,2	5,7	6,9	7,1	5,4

Tabella 6-Dimensione media della cucciolata in relazione all'età e alla dimensione della razza (Borge et al.,2011)

### 1.1.3 Rilevazione del periodo fertile

Una cagna potrebbe essere completamente normale ma non concepire se accoppiata nel momento sbagliato: la fertilità in tal caso è sub-ottimale semplicemente perché l'accoppiamento non è avvenuto nel momento di massima fertilità della femmina, a causa di scelte di management dell'accoppiamento sbagliate da parte dell'allevatore (Feldman e Nelson, 2004). L'ovulazione, infatti, avviene circa 48 ore dopo il picco di LH, ma gli oociti necessitano di una maturazione di almeno 48 ore prima di essere fertilizzati. È stato dimostrato che gli oociti immaturi non possono essere penetrati dagli spermatozoi (Reynaud et al., 2005).

Quando si effettua un accoppiamento naturale oppure un'inseminazione artificiale con seme fresco il periodo fertile può prolungarsi da 5 giorni prima a 5 giorni dopo l'ovulazione, soprattutto se il seme è di ottima qualità e rimane quindi vivo ed in grado di fertilizzare per un lungo periodo di tempo dopo l'inseminazione (England e Concannon, 2002) (vedi figura 3). La fertilità declina molto rapidamente a partire dal 7° giorno dal picco di LH poiché gli oociti degenerano e la cervice si chiude.

Se si insemina una cagna con seme refrigerato o congelato, che è dimostrato avere una vita più breve "in vivo" (Thomassen et al., 2006), si raccomanda di agire nel momento ottimale per la fertilizzazione, che corrisponde a 2-4 giorni dopo l'ovulazione, quando gli oociti sono maturi e non sono degenerati (Levy e Fontbonne, 2007).

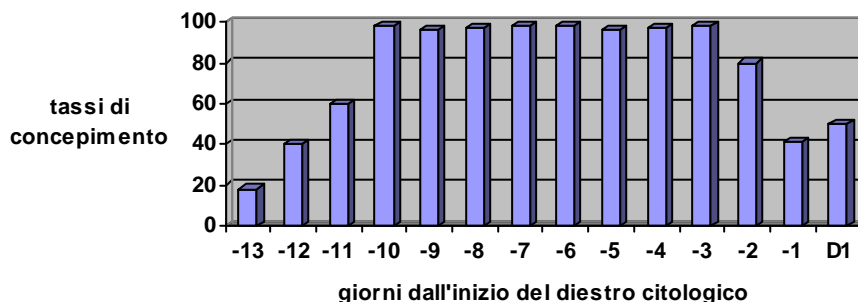


Figura 3- Tassi di concepimento con un singolo accoppiamento in 267 cagne Beagle (Holst e Phemister, 1974)

L'individuazione del giorno del picco di LH permette di conseguenza un management accurato degli accoppiamenti e delle inseminazioni, che sono così stabilite (England e Concannon, 2002; Meyers-Wallen, 2007) (vedi tabella 7):

- monta naturale o IA con seme fresco: da 2 a 6 giorni dopo il picco di LH (dal giorno dell'ovulazione a 4 giorni dopo l'ovulazione); se il maschio è sempre a disposizione nell'allevamento, dovrebbe coprire la femmina ipofertile ogni 2-4 giorni dal giorno in cui manifesta l'estro pieno fino a quando rifiuta l'accoppiamento (Feldman e Nelson, 2004);
- IA con seme refrigerato: da 4 a 6 giorni dopo il picco di LH (da 2 a 4 giorni dopo l'ovulazione);
- IA con seme congelato: 5-6 giorni dopo il picco di LH (3-4 giorni dopo l'ovulazione)

	<b>GIORNI DAL PICCO DI LH</b>	<b>GIORNI DALL'OVULAZIONE</b>
<b>Periodo fertile</b>	Da -3 a +7	Da -5 a +5
<b>Maturazione degli oociti</b>	Da +4 a +5	Da +2 a +3
<b>Momento ottimale per l'inseminazione con monta naturale o seme fresco</b>	Da +2 a +6	Da 0 a +4
<b>Momento ottimale per l'inseminazione con seme refrigerato</b>	Da +4 a +6	Da +2 a +4
<b>Momento ottimale per l'inseminazione con seme congelato</b>	Da +5 a +6	Da +3 a +4

Tabella 7- Momento ottimale di concepimento della cagna in rapporto ai giorni che intercorrono dal picco di LH e dall'ovulazione e alla tipologia di seme utilizzato (adattato da England e Concannon, 2002)

Sebbene l'ovulazione avvenga mediamente 12 giorni dopo l'inizio del proestro e 2-3 giorni dopo l'inizio dell'estro, è importante tenere presente la notevole variabilità della popolazione canina: l'ovulazione può verificarsi, quindi, in tempistiche molto diverse (Johnston et al., 2001) (vedi figura 4). Nonostante le differenze tra cagne e tra cicli della stessa cagna, molti allevatori continuano ad accoppiare gli animali ad un numero determinato di giorni dopo l'inizio delle perdite vulvari, esitando in un'apparente infertilità (Hewitt e England, 1992).

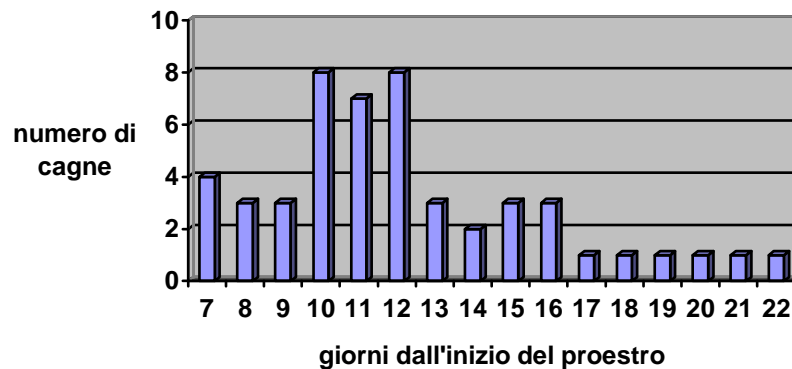


Figura 4- *Giorno previsto dell' ovulazione di 50 cagne, basato sulle concentrazioni sieriche di progesterone, calcolato dal giorno dell'inizio delle perdite proestrali* (Johnston e Von Root Kustritz, 1995)

Esistono molteplici metodiche per poter predire la data dell'ovulazione e, quindi, per poter suggerire il momento giusto per l'accoppiamento: dosaggio del progesterone, dell'LH, degli estrogeni, citologia vaginale, vaginoscopia, analisi delle secrezioni cervico-vaginali, monitoraggio ecografico dell'ovulazione.

#### ➤ DOSAGGI ORMONALI

##### 1) Progesterone:

Nella pratica clinica la misurazione dei livelli di progesterone per individuare il miglior momento per l'accoppiamento si rivela essere il metodo più pratico poiché è sicuramente più conveniente ed economico del monitoraggio dell'LH ed è più affidabile di citologia e vaginoscopia: essi, infatti, risentono di variabili soggettive legate all'operatore e alla cagna (Luchetti et al., 2005).

La specie canina è unica tra quelle domestiche, in quanto la concentrazione del progesterone sierico inizia a salire 2-3 giorni prima dell'ovulazione: il livello dell'ormone si mantiene sotto 1 ng/ml durante anestro e inizio proestro, supera questo valore prima e durante il picco di LH, in cui si

aggira intorno ai 2-4 ng/ml, arriva a 4-10 ng/ml il giorno dell'ovulazione, e continua a crescere fino a raggiungere anche i 90 ng/ml a 30 giorni dopo il picco dell'LH (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004).

Prelievi giornalieri sono utili in caso di accoppiamenti importanti ed inseminazioni artificiali, che dovrebbero essere pianificati tra i 4 ed i 6 giorni dopo che il progesterone ha superato i 2 ng/ml (England e Concannon, 2002; Davidson, 2006). Altri autori suggeriscono di procedere con l'inseminazione il giorno dopo o 2 giorni dopo che il valore dell'ormone ha superato gli 8-10 ng/ml (Johnston e Von Root Kustritz, 1995).

Un metodo valido ed accurato per dosare il progesterone è quello radioimmunoenzimatico (RIA): la sua accuratezza e la sua precisione non compensano però la difficoltà tecnica e la pericolosità di impiego da parte del personale addetto; per questo, è sempre meno diffuso. Un metodo meno rischioso, più economico e comunque affidabile, dotato di elevata sensibilità, è quello di immunochemiluminescenza (CLIA). La precisione del metodo CLIA è più bassa rispetto al RIA nel range tra 1-2 ng/ml, ma il limite di rilevabilità è più alto (Luchetti et al., 2005). Esistono in commercio anche numerosi kit ELISA (metodo immunoenzimatico) quantitativi o semi-quantitativi (*Ovucheck Premate*, Synbiotics, San Diego, USA; *K9 Proges Check*, Endocrine Technologies, Inc., Newark CA), questi ultimi in grado di rilevare concentrazioni inferiori a 5 ng/ml, tra 5 e 10 ng/ml e superiori a 10 ng/ml, la cui interpretazione può essere rapidamente effettuata con l'osservazione diretta dell'intensità di colorazione che si sviluppa a fine reazione (vedi tabella 8).

<b>FASI DEL CICLO</b>	<b>N SOGGETTI</b>	<b>CLIA (ng/ml)</b>	<b>ELISA QUANTITATIVO(ng/ml)</b>	<b>KIT RAPIDO (ng/ml)</b>
Pre-ovulazione	10	0,2 ± 0,09	0,5 ± 0,056	<5
Ovulazione	12	7,3± 2,22	6,3 ± 2,57	5-10
Post-ovulazione	14	21,4 ± 4,6	19,7± 4,9	<10

Tabella 8- valori medi ± deviazione standard di progesterone in 36 cagne con confronto tra metodo CLIA, ELISA quantitativo e kit semi-quantitativi rapidi presenti in commercio (Luchetti et al., 2005)

Recentemente è stata introdotta un'ulteriore metodica di dosaggio del progesterone, l'ELFA (enzyme-linked fluorescence assay), fornita da Biomerieux (Francia) ed eseguita su analizzatori automatici MiniVidas. L'ELFA combina il metodo di immunodosaggio con la rilevazione fluorescente, ed alla fine dell'esecuzione del test l'intensità del segnale fluorescente è inversamente proporzionale alla concentrazione di progesterone del campione. Questa tecnica si è dimostrata essere veloce (tempo di esecuzione di circa 45 minuti) e valida (Brugger et al., 2011).

## 2) LH:

Il dosaggio dell'LH è una metodica precisa ed accurata per valutare il momento fertile. Individuare il picco dell'LH (che si verifica 2-3 giorni prima dell'ovulazione) è più complesso perché, a differenza del progesterone, la concentrazione dell'ormone luteinizzante non aumenta gradualmente (Johnston et al., 2001). Inoltre, il picco di LH ha una durata limitata, intorno alle 36 ore (Onclin et al., 2002; De Gier et al., 2006). Un singolo campione raccolto durante la fase estrale, quindi, non fornisce informazioni utili sul picco di LH, che deve quindi essere monitorato mediante prelievi di sangue giornalieri o anche effettuati più volte al giorno. Oltre a kit commerciali semiquantitativi (come *Witness LH*, Synbiotics, San Diego, USA) che utilizzano la metodica ELISA, è possibile ricorrere alla tecnica RIA.

## 3) Estrogeni:

L'estradiolo è 1000 volte meno concentrato nel sangue rispetto al progesterone e quindi più difficile e costoso da dosare, e non presenta un incremento graduale ma limitato ad un ristretto periodo di tempo, come l'LH (Johnston et al., 2001). Molto spesso i valori sono di gran lunga inferiori ai limiti misurabili dai laboratori (Goodman, 2001).

In ogni caso, ad inizio del proestro il 17 $\beta$ -estradiolo è prodotto dai follicoli in crescita, passando da un valore basale di 10-15 pg/ml a 60-70 pg/ml nei 2-3 giorni precedenti l'estro, cui segue un rapido declino dopo il picco di LH.

### ➤ COLPOCITOLOGIA

L'attività follicolare può essere facilmente ed economicamente monitorata tramite la colpocitologia, ovvero la citologia eseguita su campioni vaginali: essa è un riflesso della concentrazione periferica degli estrogeni, che a sua volta riflette l'attività follicolare (Feldman e Nelson, 2004). La colpocitologia si realizza attraverso prelievo di campioni con tamponi di cotone inumiditi inseriti in vagina, o mediante aspirazione della cavità vaginale usando un catetere di plastica; le cellule raccolte sono posizionate su un vetrino rotolando il tampone o stendendo il fluido, e si procede successivamente alla colorazione (Nelson e Couto, 2003; England e Concannon, 2002).

I livelli di 17 $\beta$ -estradiolo circolante durante il proestro stimolano la crescita dell'epitelio vaginale, che passa da pochi strati cellulari di spessore durante l'anestro a 20-30 strati alla fine del proestro: man mano che aumenta lo spessore, l'epitelio da cuboidale basso diventa stratificato cheratinizzato. Le cellule di superficie cambiano forma e dimensione, diventando larghe ed irregolari ("cellule intermedie") e poi cheratinizzate ed anucleate ("cellule superficiali") (Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002). La proporzione tra i diversi tipi di cellule epiteliali visualizzate al

microscopio è indice dei cambiamenti ormonali in atto, in particolare degli estrogeni; è necessario, però, un costante monitoraggio tramite tamponi frequenti, possibilmente ogni 2-4 giorni, fino a notare un aumento significativo delle cellule cheratinizzate (>70%) che deve essere seguito da un dosaggio ormonale (Goodman, 2001). Più precisamente, nel proestro appena iniziato predominano le cellule parabasali ed intermedie dell'epitelio vaginale (cellule tondeggianti e con nucleo evidente), oltre che leucociti ed eritrociti; con l'avanzare di questa fase la popolazione cellulare di sfaldamento matura gradualmente, le cellule parabasali scompaiono ed in concomitanza incrementano quelle superficiali, mentre tendono a scomparire i leucociti. Durante l'estro le forme cheratinizzate rappresentano circa il 90% delle cellule epiteliali, e si riscontra la presenza anche di eritrociti, talvolta di batteri. L'inizio del diestro è contraddistinto da un brusco mutamento della citologia vaginale: si nota un'improvvisa riduzione delle cellule superficiali, degli eritrociti e dei batteri, mentre si assiste ad una ricomparsa di quelle intermedie, oltre che di neutrofilii; lo sfondo del vetrino appare ricco di detriti. Il passaggio all'anestro è graduale, con una progressione verso cellule parabasali (Nelson e Couto, 2003).

L'accoppiamento dovrebbe essere effettuato quando più dell'80% delle cellule epiteliali sono anucleate, ma c'è una elevata variabilità, e la percentuale delle cellule cheratinizzate potrebbe arrivare anche al 90-100% precocemente (anche 9 giorni prima dell'ovulazione) o tardivamente (2 giorni dopo l'ovulazione) (Lindsay e Concannon, 1986).

Del resto, la lettura dello striscio è molto importante soprattutto per l'individuazione dell'inizio del diestro citologico: a posteriori si è in grado di stabilire che l'ovulazione è avvenuta circa 6 giorni prima (Bouchard et al., 1991), e quindi decidere se l'accoppiamento è stato effettuato al momento giusto o meno, e calcolare la prevista data del parto.

### ➤ VAGINOSCOPIA

L'effetto degli estrogeni sulla mucosa vaginale, oltre che tramite la colpocitologia, può essere visualizzato direttamente utilizzando un vaginoscopio (Lindsay, 1983).

È una metodica che richiede un equipaggiamento costoso e non è precisa nel determinare il momento dell'ovulazione (Levy e Fontbonne, 2007). Altri autori sostengono che sia una metodica rapida, anche di soli 2 minuti, ed economica, che permette a chi ne ha esperienza di raccogliere facilmente informazioni utili (England e Concannon, 2002).

Durante l'anestro la mucosa vaginale è piatta, secca e appare rossastra (Lindsay e Concannon, 1986); essa è fine e fragile, facilmente traumatizzabile con la manipolazione. All'inizio del proestro le pliche della mucosa vaginale si ingrandiscono, diventano edematose e rosate (per l'effetto degli estrogeni), negli spazi tra le pliche si raccolgono del fluido siero-emorragico di provenienza uterina.

Col progredire della fase proestrale, la mucosa diventa biancastra poiché l'ispessimento stesso nasconde i sottostanti capillari prima visibili. In prossimità del picco di LH, al pallore mucosale si accompagna una riduzione dell'edema delle pliche, che diventano sempre più angolate (calano gli estrogeni). L'accoppiamento dovrebbe essere pianificato nel periodo fertile, cioè circa 4 giorni dopo il primo ritrovamento dell'abbassamento del volume delle pliche, che assumono un tipico aspetto definito "crenulazione" (England e Concannon, 2002). Il periodo fertile termina quando la mucosa si appiattisce e si riduce di spessore: alcune aree appaiono bianche e spesse, altre fine e rosate (Lindsay e Concannon, 1986). Questo avviene in concomitanza del diestro citologico.

#### ➤ MONITORAGGIO ECOGRAFICO

Lo sviluppo follicolare, l'ovulazione e l'instaurarsi dei corpi lutei può essere monitorato tramite ecografia (Johnston et al., 2001; England e Concannon, 2002). I follicoli appaiono come sfere nere ed anecogene che aumentano di dimensione durante il proestro: il loro diametro è di 2-3 mm in proestro precoce, di circa 5 mm in tardo proestro e raggiunge la massima dimensione (7-10 mm) nei giorni tra il picco di LH e l'ovulazione (Yeager e Concannon, 1996).

È considerato difficile individuare il momento in cui l'oocita viene rilasciato, poiché i follicoli non sempre "collassano" (scomparsa delle cavità follicolari), i cambiamenti ecografici non sono sempre consistenti, i corpi lutei hanno cavità contenenti fluido simili a quelle dei follicoli (England e Concannon, 2002; Hayer et al., 1993). Secondo quanto riportato da due autori (Hayer et al., 1993; Hase et al., 2000) anche seguendo un rigido protocollo e con frequenti esami ecografici, è stato possibile rilevare ecograficamente l'ovulazione solo nel 15,4 % (2/13) e nel 54,5 % (6/11) dei casi analizzati, rispettivamente. Negli ultimi anni, grazie a strumenti che permettono elevate performance, sono stati effettuati numerosi esami ecografici presso l'Alfort Veterinary College (Parigi, Francia) atti a verificare se gli ultrasuoni possono rappresentare una valida alternativa per identificare il giorno dell'ovulazione (Levy e Fontbonne, 2007). Quest'ultimo è stato chiaramente individuato nel 91,7 % delle cagne (44/48); il "collasso follicolare" è stato visualizzato soltanto nel 37,5 % (18/48) degli animali. Inoltre, nel 45,9% dei casi (22/48) sono stati trovati follicoli anovulatori, in accordo con il lavoro di Wallace et al. (1992), fattore che può disturbare veterinari non esperti.

Il monitoraggio ecografico viene particolarmente indicato in caso di cagne con problemi di fertilità, in quanto ritenuto oramai preciso nell'individuare il giorno dell'ovulazione e utile nel quantificare il numero di follicoli in crescita come di quelli che stanno per ovulare (Marseloo et al., 2004a).

## ➤ ALTRE METODICHE

### 1) Conduttanza elettrica:

Anche la conduttanza elettrica della vagina può essere indicativa per la determinazione del miglior momento per l'accoppiamento, sebbene questa metodica non trovi ancora largo utilizzo nella specie canina: non vi sono molti dati inerenti, sebbene sia invece usata per identificare il momento ottimale per inseminare le volpi (Fougner, 1989).

La misurazione si effettua posizionando due o più elettrodi in un'area dell'epitelio vaginale, facendo passare della corrente elettrica alternata a basso voltaggio e valutando la differenza di potenziale elettrico sulla superficie (vedi figura 5). Tramite questa misurazione si evidenziano i cambiamenti di resistenza causati dalle mutazioni di idratazione e flusso sanguigno della mucosa vaginale: nella specie canina la resistenza elettrica aumenta durante proestro ed estro precoce, diminuisce durante l'estro tardivo (England e Concannon, 2002).

Nelle volpi è stato dimostrato che il picco di impedenza coincide con l'inizio dell'estro e che si verifica 2 giorni dopo il picco di LH: per questo motivo, il momento migliore per l'accoppiamento è quello del declino dell'impedenza elettrica (Rezac, 2008). Per rilevare questo momento è necessario, però, effettuare misurazioni giornaliere, oltre al fatto che ci sono differenze individuali nella durata (1-3 giorni) e nel valore del picco di impedenza elettrica. Inoltre, vi sono dei fattori che devono essere presi in considerazione come cause della mancanza di valori assoluti, quali l'instabilità del contatto tra mucosa ed elettrodi dovuta al cambiamento di tono vaginale, l'eventuale intrappolamento di aria nella vagina durante l'inserimento del rilevatore, la diversità nella pressione applicata, lo strumento utilizzato (quello a 2 elettrodi è meno affidabile di quello a 4), l'età [nei suini è stato dimostrato che animali più anziani hanno valori di impedenza elettrica maggiore, forse a causa della diversa fluidità cellulare (Samsioe, 1998)] (Rezac, 2008). In particolare, nella specie canina il limite più notevole è determinato dal fatto che razze diverse corrispondono a lunghezze vaginali diverse, mentre la misurazione non risulta efficace se il rilevatore non viene posizionato sempre in un preciso punto (Johnston et al., 2001).

### 2) Ferning:

Il fenomeno descritto come “*ferning*” (o arborizzazione) del muco cervicale è utilizzato per determinare il periodo fertile delle donne. Anche il fluido raccolto dalla vagina craniale di una cagna apparirà arborizzato se posto sotto il microscopio dopo essersi asciugato (England e Allen, 1989). Il fluido è raccolto passando una pipetta sterile nella vagina craniale collegata ad una siringa che aspira. In uno studio (England, 1992) è stato osservato il fenomeno del *ferning* sporadicamente a partire dal proestro, ma l'indice di arborizzazione ha raggiunto un picco durante il periodo fertile

per la cagna: il picco del *ferning* è stato a  $2,3 \pm 2,1$  giorni dal picco di LH.

### 3) Glucosio:

Alcuni ricercatori hanno esaminato i cambiamenti nella concentrazione di glucosio nello scolo vaginale delle cagne, e questo metodo è talvolta utilizzato dagli allevatori per predire il momento dell'accoppiamento (England e Concannon, 2002). La tecnica non è stata investigata scientificamente, e sembra essere inutile.



Figura 5- Esempio di strumento utilizzabile per la misurazione dell'impedenza elettrica vaginale

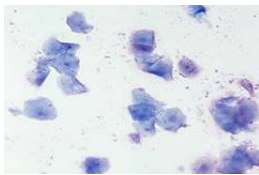
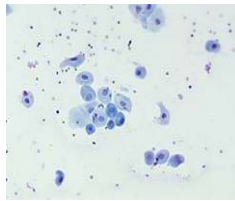
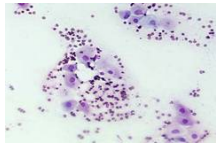
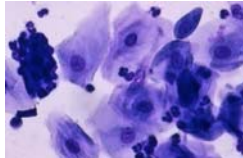


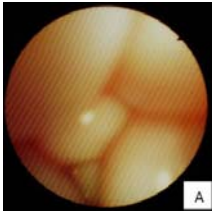

PARAMETRO	7° GIORNO PRIMA DEL PICCO DELL'LH	GIORNO DEL PICCO DELL'LH	4°-5° GIORNO DOPO IL PICCO DI LH	8°-11° GIORNO DOPO IL PICCO DI LH
<b>Momento dal giorno dell'ovulazione</b>	9 giorni prima dell'ovulazione	2 giorni prima dell'ovulazione	2-3 giorni dopo l'ovulazione	6-9 giorni dopo l'ovulazione
<b>Indice di cheratinizzazione nello striscio</b>	Da 30% a 100%	Da 80% a 100% 	Da 80% a 100%	Da 0 a 80% 
<b>Leucociti nello striscio</b>	Presenti 	Nessuno o pochi	Nessuno o pochi	Presenti 
<b>Turgore vulvare</b>	Incrementa progressivamente 	Picco o appena diminuito	Diminuito	Vulva soffice ma ancora dilatata 
<b>Pliche della mucosa vaginale</b>	Lisce, bianche, edematose 	Bianche, lievemente angolate	Bianche, angolate, “crenulazione” 	Bianche e rosa o rosse, quasi piatte
<b>Progesterone sierico</b>	> 0,5 ng/ml	0,9 – 3 ng/ml	3,5 – 12 ng/ml	8 – 25 ng/ml
<b>Scolo sier- emorragico o eritrociti nello striscio vaginale</b>	+	+	+/-	+/-

Tabella 9- Stato di vari parametri clinici in cagne normalmente fertili prima e dopo il picco preovulatorio di LH (England e Concannon, 2002)

#### *1.1.4 Tecnica di inseminazione artificiale*

L'accoppiamento naturale è la metodica di inseminazione più efficace in termini di fertilità. La percentuale di concepimento, infatti, è riportata essere intorno al 90% (Farstad, 1984). Talvolta, però, è necessario ricorrere all'inseminazione artificiale: in caso di maschi con impossibilità ad accoppiarsi per problemi fisici (dolori alla colonna vertebrale o agli arti posteriori, ma anche conformazione particolare di talune razze) o femmine con anomalie vaginali; quando la cagna non mostra un comportamento sessuale adeguato; per consentire l'accoppiamento di soggetti che si trovano a distanza tra di loro (mediante seme refrigerato o congelato).

L'inseminazione con seme fresco è spesso utilizzata in animali che non riescono a copulare normalmente, ad esempio in allevamenti di razze brachicefale con petto largo e pelvi ristretta (Johnston et al., 2001). Se eseguita correttamente la percentuale di concepimento mediante IA è simile a quella ottenibile mediante monta naturale. È necessario, però, identificare il giorno dell'ovulazione della cagna, utilizzare un seme di buona qualità, usare una buona tecnica di inseminazione e, per incrementare la possibilità di successo, inseminare più di una volta (Linde-Forsberg e Forsberg, 1993). L'appropriato sito di deposizione corrisponde all'ostio cervicale esterno, e la strumentazione adeguata è composta da pipette o cateteri della lunghezza giusta (palpando la cervice tramite l'addome o approssimativamente dividendo per due la distanza dall'arco costale alla vulva) e siringhe di 6-12 ml, a seconda della quantità di seme. Dopo l'inseminazione la femmina andrebbe mantenuta con gli arti posteriori elevati per alcuni minuti, in modo da rendere più facile e veloce agli spermatozoi l'attraversamento della cervice (Johnston et al., 2001).

Qualora il seme non venisse utilizzato subito o nell'arco di 60 minuti dopo il prelievo, è consigliato l'uso della refrigerazione preceduta dall'aggiunta di un diluente (diluizioni 1:3 o 1:5): esso protegge la membrana dello spermatozoo da variazioni di temperatura e da traumi meccanici durante il trasporto, fornendo inoltre energia e mantenendo stabili le condizioni di pH e pressione osmotica; si possono aggiungere anche antibiotici, soprattutto nei diluenti a base di tuorlo d'uovo che facilita la crescita batterica. La percentuale di concepimento, che generalmente è paragonabile a quella ottenuta da seme fresco, è influenzata dalla tempistica che intercorre dalla preparazione all'inseminazione e dalla metodica di diluizione, oltre ai fattori citati in caso di seme fresco (Pinto et al., 1999).

Infine, è possibile ricorrere all'inseminazione artificiale con seme congelato, in particolare qualora si volessero utilizzare per la riproduzione maschi esterni e lontani dall'allevamento (ad esempio di soggetti di notevole valore). In questo caso la temperatura di conservazione sarà  $-196^{\circ}$  (tramite azoto liquido) e si utilizzeranno dei diluenti con crioprotettori (arabinosio, ribosio, glicole etilenico,

glicerolo) per permettere la sopravvivenza degli spermatozoi. La percentuale di concepimento è variabile, ma generalmente più bassa rispetto alle tecniche precedenti; è riportata essere pari a 51,1% tramite cateterizzazione transcervicale (Linde-Forsberg e Forsberg, 1993), mentre in altri studi che hanno utilizzato un seme di ottima qualità pari all'80% (Farstad e Andersen-Berg, 1989). I principali ostacoli al successo della AI con seme congelato sono: costo, difficoltà nell'individuare con precisione il giorno dell'ovulazione, ridotto tempo di sopravvivenza e qualità degli spermatozoi scongelati, l'anatomia e la localizzazione della cervice della cagna (Johnston et al., 2001). Sulla buona riuscita del procedimento influiscono la corretta individuazione del momento di massima fertilità (poiché la finestra temporale per l'inseminazione è notevolmente ridotta al 2°-3° giorno dopo l'ovulazione), le caratteristiche del seme, la sede di deposizione, il numero di inseminazioni, oltre alle metodiche di preparazione e trasporto del campione (Thomassen et al., 2006). Il sito appropriato in questo caso è il lume dell'utero, giacché gli spermatozoi congelati e scongelati hanno una motilità ridotta che impedisce loro di attraversare la cervice in un numero sufficiente a garantire una buona fertilità (Linde-Forsberg e Forsberg, 1993; Concannon e Battista, 1989).

Per deporre il seme all'interno dell'utero si può ricorrere alla cateterizzazione transcervicale oppure all'iniezione chirurgica attraverso la parete uterina in laparotomia. Nel primo caso, è fondamentale individuare la cervice mediante palpazione addominale e fissarla con le dita di una mano, mentre con l'altra si inserisce il catetere in vagina, come descritto per la prima volta da Andersen nel 1975: la tecnica prevede l'utilizzo di uno speculum cilindrico in plastica bianca per trovare la cervice e guidare un catetere metallico. Il catetere è reperibile in 4 dimensioni (piccolo -20 cm-, medio -30 cm-, lungo -40 cm, estremamente lungo -45 cm-) (Fontbonne, 2006a). Una volta individuata la cervice, si procede stirandola leggermente all'indietro in modo che il suo asse maggiore divenga parallelo al terreno, e poi si progredisce con il catetere; in alternativa, si può ricorrere all'utilizzo di un endoscopio per facilitare il procedimento. L'anatomia di vagina e cervice nella cagna presenta particolari ostacoli alla cateterizzazione transcervicale: l'accesso all'ostio cervicale è ristretto a causa della plica dorsale mediana postcervicale, e la posizione dell'orifizio esterno del canale cervicale è diretto verso il pavimento della vagina (Silva et al., 1996; Wilson, 1993). In ogni caso, la cateterizzazione transcervicale presenta risultati soddisfacenti, sebbene richieda pratica (Pretzer et al., 2006). Nel caso di intervento chirurgico è sufficiente una piccola incisione (4-6 cm) per evidenziare il corpo o le corna dell'utero e poi iniettare il seme lentamente con una siringa, inclinando l'ago a 45° (Johnston et al., 2001).

Il sito di deposizione è un fattore molto influente: utilizzando, infatti, il seme congelato posto in sede vaginale, le percentuali di concepimento e la prolificità sono nettamente inferiori rispetto all'inseminazione intrauterina (Fontbonne et Badinand, 1993; Linde-Forsberg et al., 1999).

La differenza si fa ancor più netta se si ricorre alla metodica chirurgica: si riporta un 10% di cagne che hanno partorito dopo deposizione del seme congelato nella vagina rispetto ad un 75% di successo con inseminazione intrauterina (Thomassen et al, 2006).

Per contro, altri autori riportano una percentuale di concepimento dell'88% dopo AI intravaginale, comparabile con la deposizione intrauterina del seme (Nöthling et al., 1995); ma queste cagne sono state inseminate molte volte durante l'estro.

Per ovvie ragioni, l'inseminazione chirurgica non può essere utilizzata frequentemente: la possibilità di più inseminazioni rappresenta un vantaggio nel caso di cateterizzazione transcervicale, soprattutto se non si conosce esattamente il momento dell'ovulazione e se il seme non è di ottima qualità (Thomassen et al., 2006).

#### *1.1.5 Infezioni vaginali ed uterine*

È solito pensare che l'incidenza di patologie infettive sulla riproduzione canina sia maggiore in allevamenti di grosse dimensioni rispetto a quelli più piccoli (Fontbonne, 2006). Le infezioni possono alterare la possibilità di concepimento in vari modi: nella vagina gli agenti infettivi possono avere attività spermicida, agire sulla motilità spermatica, causando ad esempio ciliostasi, e poi penetrare nell'utero durante proestro ed estro. Nell'utero gli agenti infettivi comportano un'infiltrazione linfatica della parete, creando un ambiente ostile a spermatozoi ed oociti, interferiscono con lo sviluppo dello zigote e provocano successivamente morte embrionale precoce (Fontbonne, 2006).

Queste infezioni sono ritenute avere un andamento subclinico nelle cagne, causando problemi di fertilità; solo occasionalmente si manifestano con vaginite, metrite, piometra, o infezioni sistemiche. Sono stati suggeriti l'isolamento batterico e l'identificazione, così come l'antibiogramma, da tamponi vaginali, dopo i quali può essere scelto l'antibiotico a cui sottoporre la cagna per quattro settimane (Okkens et al., 1992). Nonostante questo, è difficile stabilire il ruolo dei batteri sull'infertilità canina: tutte le cagne hanno fisiologicamente una flora residente nella vagina anteriore, e le stesse specie batteriche aerobie sono presenti nei campioni vaginali di animali con problemi di fertilità e di animali sani (Wright e Watts, 1998; Marseloo et al., 2004). Una notevole varietà di microrganismi sono stati isolati nel tratto vaginale di 59 cagne sottoposte ad osservazione (vedi tabella 10) (Bjurström e Linde-Forsberg, 1992), ed in particolare alcuni di questi variano a seconda dello stadio del ciclo estrale (vedi figura 6) .

MICROORGANISMI	PERCENTUALE DI ISOLAMENTO SUL TOTALE DEI CAMPIONI	CAGNE DALLE QUALI I MICROORGANISMI SONO STATI SOLATI
<i>Pasteurella multocida</i>	59,6%	98,3%
<b>Streptococchi <math>\beta</math>-emolitici</b>	47,5%	89,8%
<i>Escherichia coli</i>	31,8%	84,7%
<b>Batteri Gram positivi (non classificati)</b>	17,1%	89,8%
<b>Batteri Gram negativi (non classificati)</b>	16,2%	86,4%
<i>Mycoplasma spp</i>	8,8%	59,3%
<i>Streptococcus spp</i>	8,7%	55,9%
<i>Pasteurella spp</i>	7,2%	67,8%
<b>Enterococchi</b>	6,2%	44,1%
<i>Proteus mirabilis</i>	4,8%	25,4%
<i>Staphylococcus intermedius</i>	4,1%	33,9%
<b>Corineformi</b>	3%	40,7%
<b>Stafilococchi coagulasi-negativi</b>	2,1%	22%
<i>Pseudomonas spp</i>	0,7%	10%
<b>Tampone sterile</b>	5,2%	

Tabella 10-Batteri aerobi isolati dalla vagina di 59 cagne (826 tamponi) (Bjurström e Linde-Forsberg, 1992)

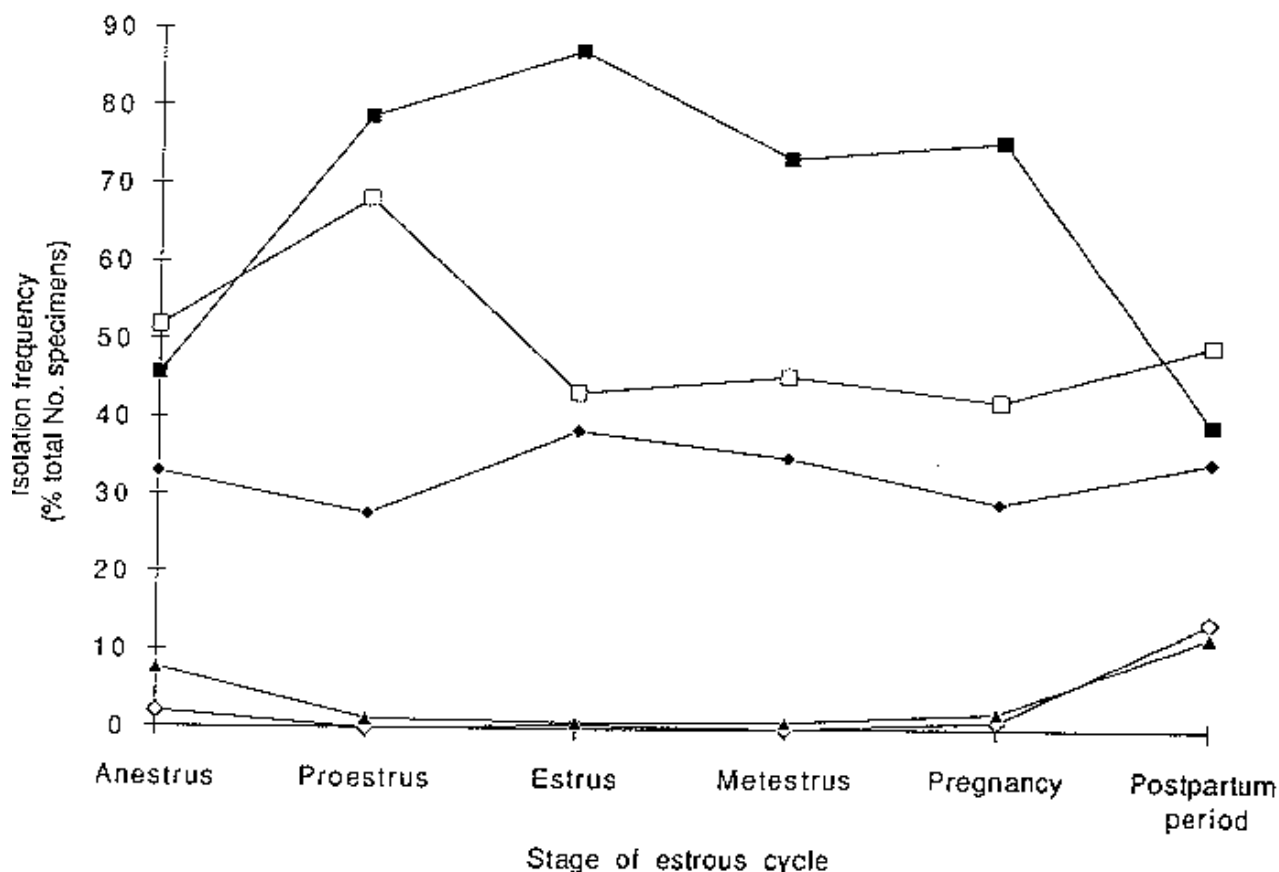


Figura 6- Variazione nella frequenza di isolamento di 5 specie batteriche dalle vagine di 59 cagne durante varie fasi del ciclo estrale. —■—, *Pasteurella multocida*; —□—, Streptococchi  $\beta$ -emolitici; —◆—, *Escherichia coli*; —◇—, *Staphilococcus intermedius*; —▲—, *Enterococchi spp* (Bjurström e Linde-Forsberg, 1992)

È quindi ingiustificato associare campioni di tamponi vaginali positivi a batteri aerobi comunemente riscontrati, a problemi di infertilità (Feldman e Nelson, 2004).

Il trattamento locale, associato eventualmente a terapia antibiotica per via sistemica, può essere benefico, ma va riservato a cagne con sintomatologia clinica, come quelle presentate con scolo vulvare purulento (Bjurström e Linde-Forsberg, 1992).

Nelle cagne normali predominano però le colture miste: spesso si isolano molteplici germi negli stessi campioni. È stato osservato che in caso di infezione vaginale i risultati delle analisi sono diversi qualitativamente e quantitativamente: *Streptococcus spp*, *E. coli* e *Pasteurella spp* sono stati isolati più frequentemente ed in colture pure (o con meno di 2 germi) (Fontbonne, 2011).

Marseloo et al. (2004) hanno caratterizzato i batteri trovati nella vagina anteriore di 76 cagne da riproduzione con vari problemi riproduttivi, quali infertilità, scolo vulvare anomalo, riassorbimento, aborto e mortalità neonatale: i batteri isolati sono simili a quelli citati in letteratura per le cagne normali, ma hanno mostrato un elevato livello di resistenza ai normali antibiotici. Questo è dovuto

allo scorretto utilizzo di antibiotici in animali sani da parte degli allevatori, che permette la crescita di patogeni opportunisti come *E.coli* e Micoplasmi (Purswell e Parker, 2000; Fonbonne, 2006).

Anche Micoplasmi ed Ureaplasmi sono comunemente isolati da colture di animali sani (Bjurström e Linde-Forsberg, 1993). È stato suggerito che potrebbero però essere causa di mancato concepimenti, riassorbimento embrionale, aborto, natimortalità o mortalità neonatale (Feldman e Nelson, 2004). Nella donna il loro ruolo patogenetico sembra essere connesso alla concentrazione: i problemi riproduttivi insorgono in presenza di  $10^4 - 10^6$  UFC (Unità Formanti Colonie)/ml. Ancora il ruolo di questi microrganismi in ambito canino non è chiaro (Fontbonne, 2011).

Anche l'Herpesvirus canino è sospettato essere causa di riassorbimento-aborto, di mortalità neonatale e di mancato concepimento (Fontbonne, 2011). *Brucella canis* causa classicamente aborto, ma il microrganismo può rendere la cagna incapace di concepire. Le fattrici dovrebbero essere ripetutamente testate per la Brucellosi (Feldman e Nelson, 2004).

Infine, l'utero canino può contenere un ridotto numero di batteri ed essere comunque normale (Baba et al., 1983). Con la laparotomia o la cateterizzazione transcervicale si possono raccogliere campioni durante proestro, estro e diestro per effettuare colture ed esami citologici; nelle cagne normalmente fertili, comunque, durante queste fasi si verifica una migrazione di batteri dalla vagina verso l'utero attraverso la cervice aperta (Watts e Wright, 1995). Le cellule normalmente identificate nei campioni sono cellule endometriali (spesso degenerate in diestro ed anestro), leucociti (i neutrofili sono comuni durante proestro ed estro), eritrociti, cellule cervicali, sperma e batteri (Feldman e Nelson, 2004). L'esame citologico può essere d'aiuto anche per riconoscere la presenza di una iperplasia endometriale cistica: le cagne affette presentano cicli ovarici normali, ovulazione normale, oociti fertilizzati ma l'ambiente uterino compromesso può impedire l'impianto o favorire il riassorbimento embrionale.

Senza segni di vaginite o piometra, comunque, le colture vaginali non sono utili nel management delle cagne con difficoltà riproduttive (Feldman e Nelson, 2004).

### *1.1.6 Altre cause*

In presenza di aplasia segmentale del corpo dell'utero (vedi figura 7), aplasia segmentale bilaterale o altre cause di ostruzione delle corna uterine, o con l'occlusione della cervice o di entrambi gli ovidotti, una cagna può ciclare ed accoppiarsi normalmente ma non concepire, in quanto l'occlusione non consente allo sperma di raggiungere gli oociti.

La diagnosi di questo raro difetto anatomico è molto complessa: teoricamente, si fa passare una sostanza radiopaca attraverso la cervice e l'utero per arrivare agli ovidotti, ma ciò è possibile soltanto quando la cervice è aperta, in proestro ed estro. L'esame proposto (isterosalpingografia) è

eseguibile soltanto durante l'estro (Feldman e Nelson, 2004), perché in proestro l'influenza degli estrogeni comporta la chiusura della giunzione uterotubarica. Sono riportati casi di rottura dell'utero (Freshman, 1991) durante l'esecuzione di questo esame. Un'alternativa è rappresentata dalla laparotomia, poiché in laparoscopia gli ovidotti non si visualizzano.

Cagne con occlusioni bilaterali di ovidotti o corna uterine rimangono non fertili, non sono state descritte metodiche per l'apertura del difetto.

Un'ulteriore possibilità di mancato concepimento di fronte a femmine che ciclano normalmente è la presenza di anticorpi antisperma; essi sono stati riconosciuti in maschi affetti da Brucellosi (George e Carmichael, 1984) e anche indotti in alcuni cani (Rosenthal et al, 1984). Inoltre, anticorpi anti-zona pellucida si sono sviluppati in cagne attraverso procedure di immunizzazione (Mahi-Brown et al., 1982). Non è ancora stata segnalata la spontanea produzione di questi anticorpi.

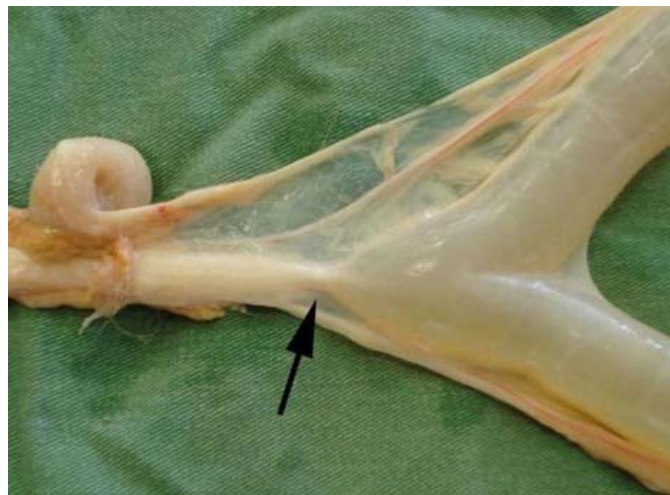


Figura 7- *Aplasia segmentale del corpo dell'utero*

## ***1.2 Ciclo estrale normale ma mancata accettazione della monta***

Qualora dalla visita emergesse che cagne con problemi di fertilità presentano dei cicli estrali regolari ma non accettano la monta da parte del maschio durante il periodo fertile, la diagnosi differenziale deve considerare da una parte fattori comportamentali e/o psicologici che determinano il rifiuto, dall'altra un impedimento meccanico all'intromissione del pene. Nel primo caso, le femmine potrebbero rifiutare l'accoppiamento in quanto presentate al maschio in un momento in cui non sono recettive; nel secondo caso, può trattarsi di alterazioni anatomiche ostruttive di vulva, vestibolo o vagina.

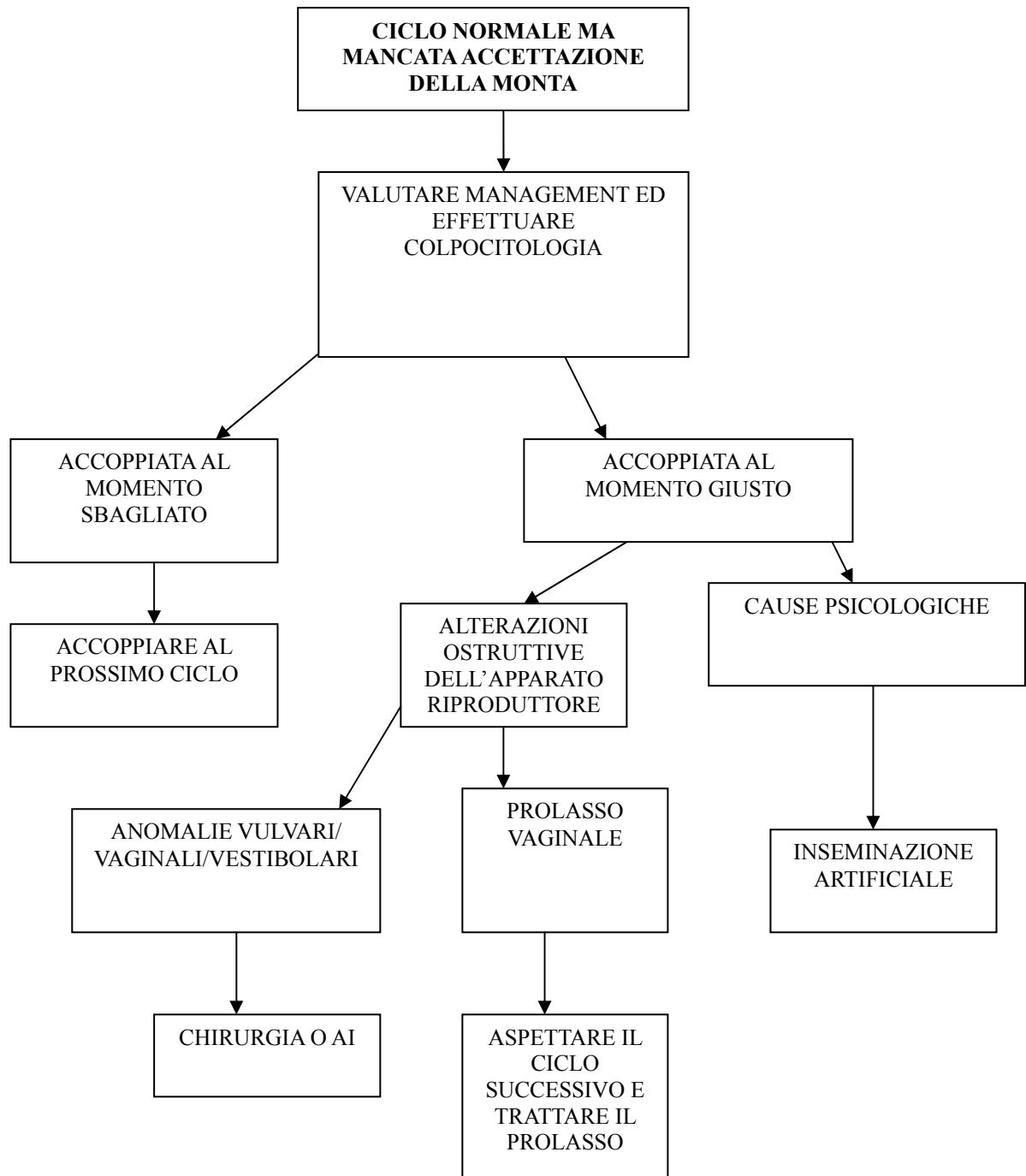


Figura 8 –*Algoritmo diagnostico in caso di ciclo normale ma mancata accettazione della monta* (adattato da Feldman e Nelson, 2004)

### *1.2.1 Fattori comportamentali/psicologici*

Le cagne mostrano un graduale aumento della recettività verso il maschio durante il proestro, che diventa completa quando sono in estro: esse, in questa fase, spostano la coda di lato di fronte al maschio per favorire l'accoppiamento. La recettività declina poi in diestro precoce. La presentazione al maschio della fattrice quando non è ancora recettiva è la causa più comune di rifiuto di monta (Grundy et al., 2002).

La mancanza della recettività sessuale può anche essere imputabile a fattori psicologici. La preferenza per alcuni stalloni è stata documentata nella specie canina, senza che vi sia alcuna relazione con l'affinità sociale verso i maschi durante l'anestro (Freshman, 1991). Incompatibilità gerarchiche possono impedire a cagne dominanti di permettere la monta. In questo caso, le femmine vanno portate dal maschio per l'accoppiamento, in modo da favorire l'affermarsi della dominanza maschile (Farstad, 1998). Femmine prive di esperienza potrebbero non mostrare una normale progressione della recettività durante la fase estrale e non permettere la monta, mentre fattrici sottomesse possono sembrare recettive anche se non sono in estro. Anche gli esseri umani possono influenzare il comportamento sessuale: alcuni cani rispondono positivamente, altri negativamente alla presenza dell'allevatore durante l'accoppiamento (Feldman e Nelson, 2004). La forzatura degli cagne che non collaborano non è raccomandata; è meglio procedere con l'inseminazione artificiale (Johnston et al., 2001).

Sembra che anche lo stress possa provocare infertilità, ma non vi sono prove dirette a riguardo (Fontbonne, 2011). Seppur ipotizzato non è ancora noto, ad esempio, se lo stress dovuto allo spostamento della cagna verso l'allevamento del maschio possa interferire con l'ovulazione ed il comportamento sessuale (Wright e Watts, 1998). Al successivo ciclo è utile verificare se il problema del mancato concepimento si può risolvere accoppiando la fattrice nel suo allevamento (Feldman e Nelson, 2004).

### *1.2.2 Alterazioni anatomiche dell'apparato riproduttore*

Alterazioni congenite o acquisite di vulva, vestibolo o vagina possono ostacolare il normale accoppiamento. Cani maschi mostrano difficoltà all'intromissione del pene anche in giovani femmine con vulva infantile (Freshman, 1991).

#### ➤ ANOMALIE DELLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE

Le anomalie della differenziazione sessuale si suddividono in: cromosomiche, gonadiche o fenotipiche (Meyers-Wallen, 1993). Cagne con anomalie della differenziazione sessuale potrebbero avere genitali anormali, ma non sempre il difetto è visibile all'esame fisico.

Le anomalie cromosomiche sono caratterizzate da cariotipo anormale nel numero o nella struttura dei cromosomi sessuali. Nelle anomalie gonadiche il sesso cromosomico e gonadico non corrispondono, e gli animali vengono definiti *sex-reversal*: in questo caso, individui XY (con cariotipo maschile) presentano tessuto ovarico, mentre individui XX (cariotipo femminile) hanno tessuto testicolare. In caso di anomalie cromosomiche o gonadiche, il risultato può essere un individuo con organi genitali normali o con vari gradi di ambiguità: in questi casi, però, il problema si riscontra di solito dopo la pubertà, in quanto si manifesta principalmente con alterazioni del ciclo estrale.

Infine, gli animali con anomalie fenotipiche hanno sesso cromosomico e gonadico corrispondenti, ma i genitali interni e/o esterni sono ambigui (maschi o femmine pseudo-ermafroditi). Le cagne con genitali ambigui potrebbero avere un ingrandimento del clitoride o organi maschili (vedi figura 9), come un pene ipoplasico il cui prepuzio somiglia ad una vagina (Feldman e Nelson, 2004). Al contrario, maschi pseudoermafroditi hanno cromosoma Y, testicoli, ma genitali femminili o varie malformazioni peniene/scrotali. L'eziologia non è ancora del tutto nota, ma si sa che alcuni casi sono il risultato della somministrazione di androgeni e progesterone sulle cagne gravide (Patterson, 1983). L'unica soluzione consiste nell'ovaristerectomia.



Figura 9– *Cagna pseudo-ermafrodita con genitali ambigui*

#### ➤ ANOMALIE VAGINALI/VESTIBOLARI

Le più comuni anomalie vaginali/vestibolari congenite che precludono il normale accoppiamento sono setti e restringimenti circonferenziali (Archbald e Wolsdorf, 1996; Barner, 2008), di cui uno studio retrospettivo su cagne ospedalizzate riporta un'incidenza pari allo 0,03% (Von Root Kustritz et al., 1995). Sono state segnalate anche ipoplasia vulvare (“vulva immatura”), e più raramente

“doppia vagina” (Wykes e Soderberg, 1983; Von Root Kustritz et al., 1995) e aplasia della vagina (Gee et al., 1977; Meji et al., 1990; Feldman e Nelson, 2004). Anche la persistenza dell'imene (giunzione tra vagina e vestibolo) può comportare difficoltà di accoppiamento o calori silenti (Fontbonne, 2011). Il tentativo di penetrazione da parte del maschio nel lume vaginale ostruito è infatti associato a segni di dolore da parte della femmina, movimenti per sottrarsi al maschio, morsicamento nei confronti dello stallone o dell'allevatore (Feldman e Nelson, 2004). Durante l'estro, le cagne possono essere timide, elusive, irritabili: questa sindrome comporta comunque il rifiuto dell'accoppiamento.

Oltre a questo, la sintomatologia prevede talvolta segni di vaginite, quali scolo vulvare, leccamento continuo ed attrazione del maschio a causa degli odori dovuti alla eccessiva crescita batterica che si sviluppa (Feldman e Nelson, 2004). L'aumentata incidenza di vaginite in cagne con le suddette anomalie predispone essa stessa all'infertilità (Fontbonne, 2011).

Le tecniche diagnostiche per individuare queste anomalie consistono in esame vaginale digitale, vaginoscopia e vaginografia di contrasto. L'esame digitale spesso è sufficiente, poiché setti e restringimenti sono più comuni nella giunzione vestibolovaginale, cranialmente alla papilla uretrale, che è palpabile nella maggior parte delle cagne; potrebbe essere impossibile eseguire l'esame digitale in animali piccoli o eccessivamente agitati (Johnston et al., 2001). La vaginografia di contrasto, invece, permette di raccogliere informazioni più precise: in questa tecnica, dopo aver posizionato un catetere di Foley in sede vaginale (in modo da insufflare il palloncino nel vestibolo) ed aver chiuso le labbra vulvari tramite forcipi atraumatici (per evitare la fuoriuscita del mezzo di contrasto), si infonde nella vagina un mezzo di contrasto iodato; a questo punto, si eseguono delle radiografie in proiezione laterale e ventro-dorsale. La vaginografia consente di individuare il tipo e l'estensione delle anomalie vaginali e la pervietà degli organi analizzati (Johnston et al., 2001).

Il trattamento previsto è manipolativo o chirurgico, fino alla vaginectomia (Kyles et al., 1996). Femmine in riproduzione senza manifestazioni cliniche della patologia possono essere semplicemente sottoposte ad IA, pianificando un cesareo (Johnston et al., 2001).

#### ➤ PROLASSO VAGINALE

Il prolasso vaginale consiste nella protrusione di tessuto vaginale edematoso nel lume della vagina o attraverso le labbra vulvari di femmine che si trovano sotto l'influenza degli estrogeni (Manothaiudom e Johnston, 1991; Post et al., 1991) (vedi figura 10). Infatti, la maggior parte delle cagne affette si trova in fase proestrale/estrale, meno frequentemente in prossimità del parto (Johnston, 1989). Esiste una predisposizione di razza che riguarda ad esempio Boxer, Mastiff, San Bernardo, Bulldog inglese, Labrador Retriever, Sprinter Spaniel, Weimaraner (Johnston, 1989).

Si riconoscono 3 gradi della patologia: prolasso di 1° grado, in cui il tessuto non protrude dalle labbra vulvari, prolasso di 2° grado, in cui il pavimento craniale e le pareti laterali vaginali prollassano all'esterno, e prolasso di 3° grado, che riguarda l'intera circonferenza vaginale.

La sintomatologia può essere caratterizzata dalla visualizzazione della massa prollassata o difficoltà ad urinare, ma talvolta l'unico segno è l'incapacità da parte del maschio di montare la cagna (Feldman e Nelson, 2004). La diagnosi differenziale prende in considerazione le neoplasie vaginali (anch'esse possibile causa di mancato accoppiamento), e la differenziazione si basa sul segnalamento, sul sito di origine della massa, e sui cambiamenti della massa durante il ciclo estrale (vedi tabella 11).

In animali che hanno già ovulato il prolasso regredisce spontaneamente (a causa della decrescente influenza degli estrogeni) e quindi è possibile aspettare il ciclo successivo per l'accoppiamento, ma la recidiva è molto frequente, pari al 66% (Johnston, 1989) fino al 100% (Troger, 1970). Il trattamento del prolasso, se necessario, prevede una riduzione della concentrazione degli estrogeni e, quando questo trattamento non induce la riduzione spontanea del tessuto prollassato, la rimozione dello stesso per via chirurgica (Johnston et al., 2001). L'induzione dell'ovulazione avviene attraverso la somministrazione di GnRH per via intramuscolare, oppure di hCG (Gonadotropina Corionica Umana) a 1000 IU per via intramuscolare. In caso di prolassi ricorrenti, la soluzione migliore è l'ovariosterectomia, per rimuovere lo stimolo estrogenico (Johnston et al., 2001).

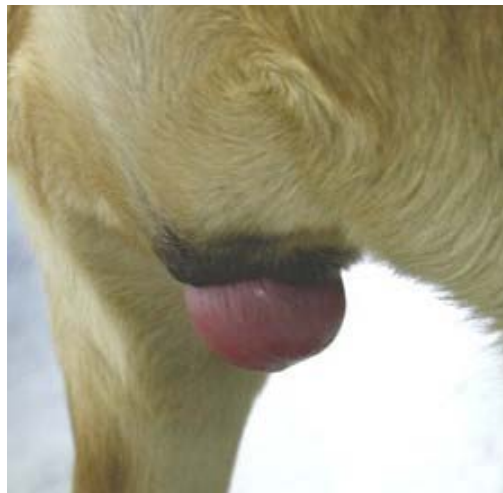


Figura 10– *Prolasso vaginale in una cagna*

	<b>PROLASSO VAGINALE</b>	<b>NEOPLASIA VAGINALE</b>
<b>SEGNALAMENTO</b>	Cagne giovani, intere	Anziane, intere o sterilizzate
<b>SITO DI ORIGINE DELLA MASSA</b>	Deriva dal pavimento della vagina, cranialmente alla papilla uretrale	Deriva da un punto qualsiasi della vagina
<b>CAMBIAMENTI DURANTE IL CICLO ESTRALE</b>	Aumenta la dimensione in proestro/estro; diminuisce in diestro, anestro e dopo ovaristerectomia	Non varia durante il ciclo

Tabella 11- *Differenziazione di prolasso vaginale e neoplasia vaginale nella cagna* (Johnston et al., 2001)

### ***1.3 Ciclo estrale irregolare***

Un ciclo estrale irregolare nella cagna può essere responsabile dell'impossibilità di accoppiarsi e/o di concepire. Le anomalie del ciclo estrale vengono suddivise in: anestro persistente (primario o secondario), estro persistente ed estro irregolare; ognuna delle suddette anomalie presenta un diverso elenco di diagnosi differenziali.

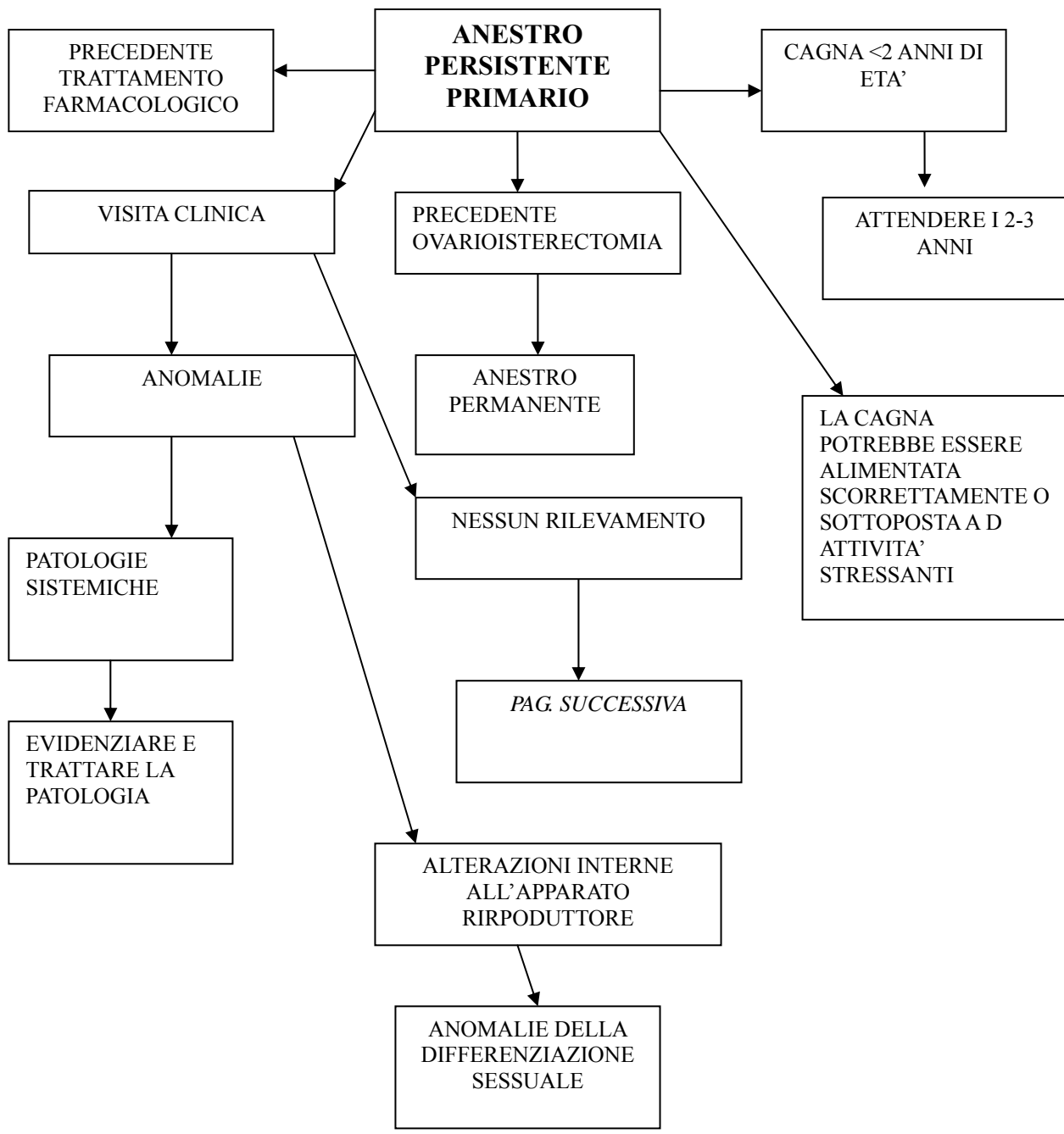
#### ***1.3.1 Anestro persistente primario***

L'anestro persistente è la totale assenza di manifestazioni tipiche del ciclo estrale.

L'anestro persistente primario indica la condizione in cui la cagna non ha mai avuto un ciclo estrale oltre i 24 mesi di età (Johnston, 1991), mentre l'anestro persistente secondario descrive la situazione in cui si trovano animali che hanno avuto uno o più cicli ovarici ma successivamente hanno smesso di ciclare da almeno 10-18 mesi (Perkins e Thomas, 1993).

Il segnalamento e l'anamnesi sono, come sempre, fondamentali per procedere con la diagnosi. In caso di anestro persistente primario vanno considerati alcuni fattori. La razza della cagna potrebbe influire sulla comparsa del primo ciclo, in quanto razze diverse raggiungono la pubertà in età diverse. Un'alimentazione non adeguata o attività eccessivamente stressanti (lavori pesanti, viaggi, mostre, caldo eccessivo) possono essere responsabili della mancata comparsa del ciclo (Johnston et al., 2001; Feldman e Nelson, 2004). L'effetto dei feromoni delle cagne in calore può essere d'aiuto per indurre a ciclare cagne con anestro persistente, quindi un primo tentativo di indurre l'estro è quello di alloggiarle nello stesso luogo (Johnston et al., 2001).

Una volta escluse queste possibilità, la diagnosi differenziale in caso di anestro persistente primario prende in considerazione vari fattori illustrati di seguito.



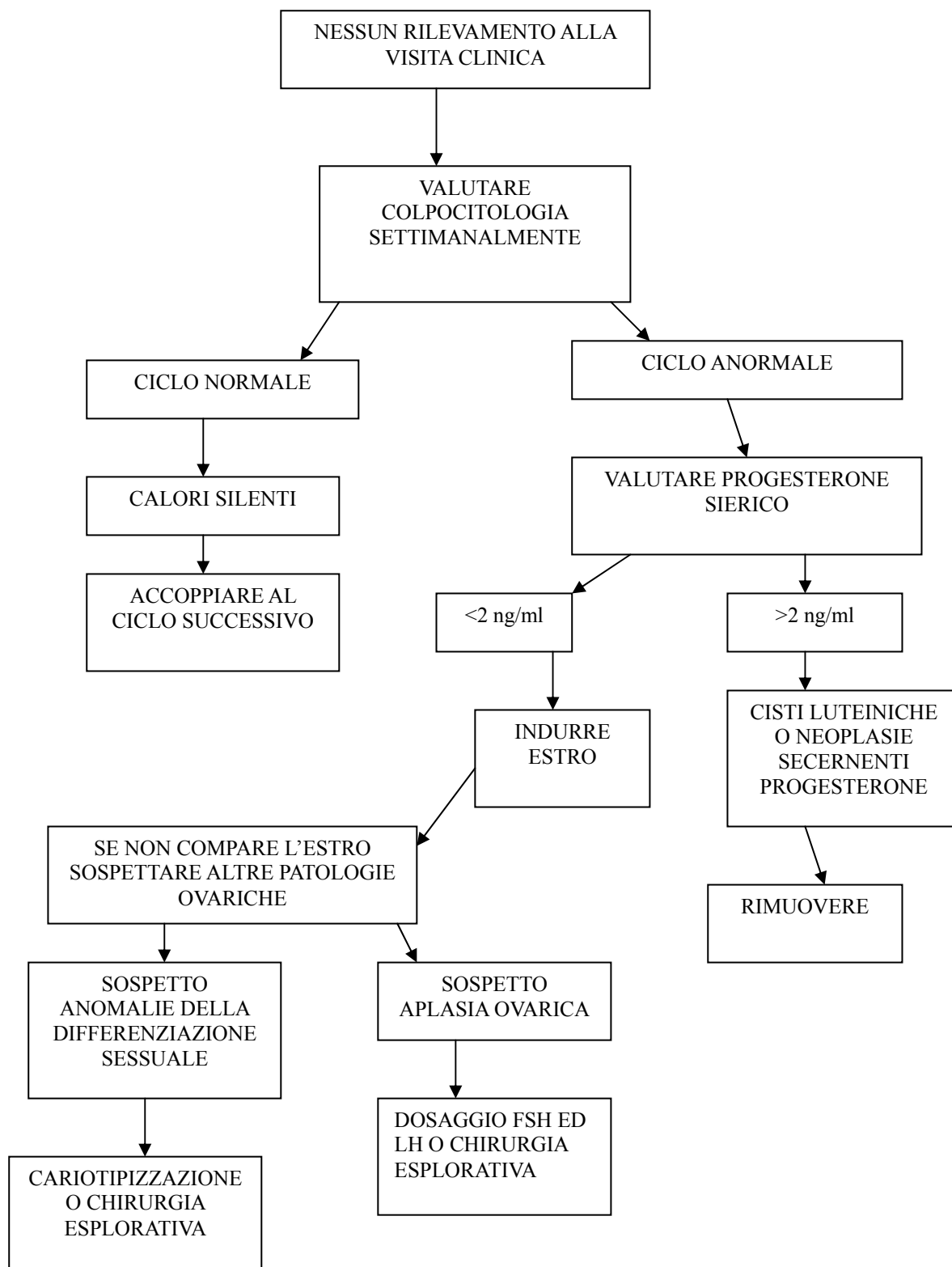


Figura 11– *Algoritmo diagnostico in caso di anestro persistente primario* (Adattato da Feldman e Nelson, 2004)

### ➤ OVARIOISTERECTOMIA

Cagne precedentemente ovarioisterectomizzate non ciclano. Qualora emergesse un sospetto in sede di anamnesi, la diagnosi si effettua mediante palpazione, visualizzazione di una cicatrice in posizione addominale sulla linea mediana, laparotomia esplorativa o dosaggio ormonale. Infatti, in cagne ovarioisterectomizzate o affette da aplasia o insufficienza ovarica le concentrazioni sieriche di LH ed FSH sono più elevate rispetto ai valori normali (vedi tabella 12) a causa dell'assenza del feedback negativo da parte degli ormoni ovarici sull'ipofisi [FSH pari a 40-110 ng/ml ed LH pari a 6-65 ng/ml (Beijerink et al., 2007)](Johnston et al., 2001).

<b>ORMONE</b>	<b>VALORI IN PROESTRO</b>	<b>VALORI IN ESTRO</b>	<b>VALORI IN DIESTRO</b>	<b>VALORI IN ANESTRO</b>
<b>LH</b>	3-4 ng/ml	18-35 ng/ml il giorno del picco di LH	Pulsatile: il valore basale è di 2-3 ng/ml, i picchi sono di 20-45 ng/ml	Pulsatile: il valore basale è di 1-5 ng/ml, i picchi sono di 20-45 ng/ml
<b>FSH</b>	4 U/L	14 U/L il giorno del picco di FSH (picco preovulatorio in corrispondenza del picco di LH), poi 1,5-3 U/L	Pulsatile: il valore basale è di 7 U/L	Pulsatile: il valore basale è di 6-9 U/L
<b>Progesterone</b>	<0,5 ng/ml ; 1 ng/ml nell'ultimo giorno di proestro	Crescente: da 1ng/ml il primo giorno di estro, a 2-4 ng/ml il giorno del picco di LH, a 4-10 ng/ml il giorno dell'ovulazione	15-90 ng/ml a 2-3 settimane dall'inizio del diestro	<0,5 ng/ml
<b>Estrogeni</b>	Crescente: da 25 pg/ml fino a 60-70 pg/ml nel giorno del picco (24-48 ore prima dell'inizio dell'estro)	Decrescente fino a valori basali (5-15 ng/ml)	5-15 pg/ml	5-15 pg/ml

Tabella 12- *Concentrazioni ormonali normali nella cagna* (Concannon et al., 1975; De Gier et al., 2006; Feldman e Nelson, 2004; Nett et al., 1975; Beijerink et al., 2007; Kooistra et al., 1999; De Gier et al., 2011)

### ➤ CALORI SILENTI

Si definisce *calore silente* l'attività ovarica in assenza di gonfiore della vulva, scolo vulvare sieroemorragico, o attrazione del maschio (Johnston, 1991). È riportato relativamente ad uno studio un'incidenza del 17% di questo fenomeno (Arbeiter e Dreier, 1972).

Per diagnosticare e successivamente rilevare il *calore silente* è utile eseguire settimanalmente l'esame colpocitologico e dosare mensilmente il progesterone, in modo da verificare se effettivamente il ciclo procede normalmente anche in assenza di manifestazioni estrali (Johnston et al., 2001). Anche un esame dettagliato della vulva una o due volte alla settimana è un eccellente metodo per gestire il calore silente, poiché in questo modo è più semplice osservare minime variazioni che potrebbero essere relative all'inizio del proestro (Feldman e Nelson, 2004).

### ➤ ANESTRO INDOTTO DA FARMACI

In sede di anamnesi è importante rilevare se siano stati somministrati farmaci agli animali.

Cagne che hanno ricevuto androgeni o progestinici a scopo terapeutico come effetto collaterale non ciclano (Feldman e Nelson, 2004). Allo stesso modo la somministrazione esogena di glucorticoidi comporta un calo delle concentrazioni di gonadotropine e quindi problemi di infertilità (Kemppainen, 1983), fino a quando i dosaggi degli steroidi non si riducano o la terapia si effettui in maniera discontinua.

### ➤ PATOLOGIE SISTEMICHE

Cagne con una qualsiasi patologia sistemica possono avere delle difficoltà a ciclare. In particolare, la sindrome di Cushing (o iperadrenocorticismo) è responsabile di una produzione eccessiva di ormoni steroidei e conseguentemente di anestro persistente (Reimers, 1983), ma in genere riguarda femmine anziane e la manifestazione clinica è spesso molto evidente. In caso di sospettata patologia sistemica è utile effettuare un esame emocromocitometrico, un profilo biochimico ed un'analisi delle urine.

#### Ipotiroidismo

L'ipotiroidismo è diventata una “diagnosi popolare” per spiegare l'anestro persistente in cagne che non manifestano altri segni clinici; in realtà, sebbene potenzialmente possa essere vero, animali con questa patologia presentano una sintomatologia complessa (letargia, anoressia, obesità, alopecia bilaterale) e quindi una cagna attiva e vitale con anestro persistente non è facilmente riconducibile ad insufficienza della tiroide. Questa patologia, quindi, pare essere sovradiagnosticata da veterinari ed allevatori (Feldman e Nelson, 2004), sebbene vada sottolineato che donne con ipotiroidismo subclinico presentano comunque disfunzioni ovariche (Lincoln, 1999), e lo stesso dicasi per altre

specie, quali il ratto ed il topo (Morreale et al., 1985; Jiang et al., 2001; Hatsuta et al., 2004). Si tratta di una patologia endocrina che nella razza canina non è ancora stata correttamente documentata (Johnson, 2002; Johnson et al., 1995).

Beale et al. (1992) hanno dimostrato che non c'è relazione tra ipotiroidismo e infertilità. Anche Panciera et al. (2007), tramite uno studio di induzione dell'ipotiroidismo, supportano la tesi che non vi sia questa connessione, sebbene specificano che potrebbe dipendere dal fatto che nel loro studio tra l'induzione della patologia e l'osservazione dei risultati vi è un periodo troppo breve. Nonostante ciò, uno studio condotto su 24 cagne con disordini riproduttivi quali anestro persistente ed intervallo interestrile breve ha messo in luce che 9 di queste erano effettivamente affette da ipotiroidismo (Fontbonne et al., 1992). Altri autori hanno dimostrato che cagne con ipotiroidismo manifestano anestro persistente, intervallo interestrile irregolare, aborti e natimortalità (Johnson et al., 1997; Nesbitt et al., 1980). La conflittualità dei risultati indica che esiste ancora un dibattito aperto sull'argomento. L'ipotiroidismo potrebbe causare infertilità interferendo con lo sviluppo dei gameti: gli ormoni tiroidei supportano la funzione delle cellule della granulosa nello sviluppo dei follicoli ovarici ed inoltre sono fondamentali per la placenta dopo il concepimento (Johnson et al., 1997).

Sebbene non ben definita la modalità di trasmissione, l'ipotiroidismo è considerato uno squilibrio endocrino ereditario (Thacker, 1997; Manning, 1979). Le razze predisposte sono Golden Retriever, Dobermann Pinscher, Pastore dello Shetland, Setter irlandese, Schnauzer nano, American Cocker Spaniel, Bulldog, Basenji, Alano, Boxer, Beagle, Borzoi (Thacker, 1997; Rosychuk, 1983).

La diagnosi si basa principalmente sui segni clinici e sul rilevamento di anemia non rigenerativa e ipercolesterolemia, poiché il dosaggio degli ormoni tiroidei è poco preciso in quanto influenzato da vari fattori (età, obesità, iperadrenocorticismo, terapie a base di glucocorticoidi). Anche il TSH elevato è un indice di ipotiroidismo, ma il test utilizzato è poco sensibile (0,75) e non sufficientemente specifico (0,90) (Nichols, 1997; Ramsey e Herrtage, 1997).

La terapia si basa sulla somministrazione di L-tiroxina alla dose di 0,01-0,02 mg/kg due volte al giorno per os, con controlli successivi ogni 6 mesi (Johnston et al., 2001). Iniziata la terapia, la risposta in termini di fertilità si ha circa dopo 3-6 mesi; se ciò non avviene le possibilità sono: dose del farmaco inadeguata, patologia concomitante o diagnosi errata (Feldman e Nelson, 2004).

#### ➤ ANOMALIE DELLA DIFFERENZIAZIONE SESSUALE

L'anestro persistente primario può essere raramente causato da anomalie della differenziazione sessuale. Mentre in cagne che non accettano la monta il problema è spesso riferibile ad anomalie fenotipiche, in questo caso si tratta soprattutto di anomalie cromosomiche e gonadiche (*sex-*

*reversal*). Le femmine potrebbero avere un corredo cromosomico alterato: la trisomia-X ed il cariotipo XO sono state riportate in cagne con intervallo interestrile breve, anestro persistente, mancanza di recettività in estro, infertilità, genitali esterni infantili, gonadi ed utero ipoplastici e strutture follicolari anormali (Smith et al., 1989; Lofstedt et al., 1992; Johnston et al., 1985; O'Connor et al., 2011). Anche maschi pseudoermafroditi, che hanno gonadi maschili ma genitali esterni femminili, vengono presentati per anestro persistente primario (Johnston et al., 2001). La diagnosi si basa sull'ispezione dei genitali esterni ambigui, sull'esame istologico delle gonadi e sul test del cariotipo.

#### ➤ CISTI LUTEINICHE O NEOPLASIE SECERNENTI PROGESTERONE

Le cisti luteiniche, ovvero cisti ovariche secernenti progesterone, sono una sindrome ben conosciuta, ma estremamente rara nella cagna: il feedback negativo comporta un calo nel rilascio di gonadotropine (FSH ed LH) con conseguente persistenza del diestro ed inibizione del ciclo (Johnston et al., 2001).

Meno comunemente, neoplasie (tumori delle cellule della granulosa) possono produrre progesterone: queste sono più facilmente riscontrabili in cagne anziane (Feldman e Nelson, 2004).

La diagnosi si basa sull'indagine ecografia e sull'evidenza di persistenti elevati livelli di progesterone (>2-5 ng/ml per un periodo >9-10 settimane). Il trattamento chirurgico con l'asportazione dell'ovaio colpito è l'unica soluzione, poiché la somministrazione di prostaglandine causa soltanto un calo del progesterone temporaneo (Davidson, 2006).

#### ➤ APLASIA OVARICA

L'aplasia ovarica è un rarissimo difetto congenito nella migrazione prenatale delle cellule germinali con conseguente mancato sviluppo delle ovaie ed anestro persistente primario (Wright e Watts, 1998). L'aplasia/ipoplasia può anche essere acquisita, nel qual caso le ovaie cessano di funzionare (insufficienza ovarica): il risultato sarà anestro persistente secondario (Feldman e Nelson, 2004).

La diagnosi si effettua quando tutte le precedenti possibili cause sono state scartate: essa si basa sul dosaggio di FSH ed LH, estremamente aumentato in assenza di feedback negativo su ipotalamo ed ipofisi come in caso di ovarioisterctomia (Johnston et al., 2001); in alternativa si può ricorrere ad una laparotomia esplorativa, o infine al dosaggio degli estrogeni dopo somministrazione di GnRH o hCG (dovrebbe risultare molto basso per mancanza di tessuto ovario) (Feldman e Nelson, 2004).

### ➤ OOFORITE

Sono stati descritti tre casi negli ultimi anni di ooforite immuno-mediata (Johnston, 1989a; Andersen e Simpson, 1973; Nickel et al., 1991): gli animali presentavano infiammazione ovarica diffusa, e all'esame istologico di uno di essi sono stati evidenziati degenerazione follicolare, degenerazione e necrosi degli oociti, assenza di corpi lutei, zona pellucida ispessita.

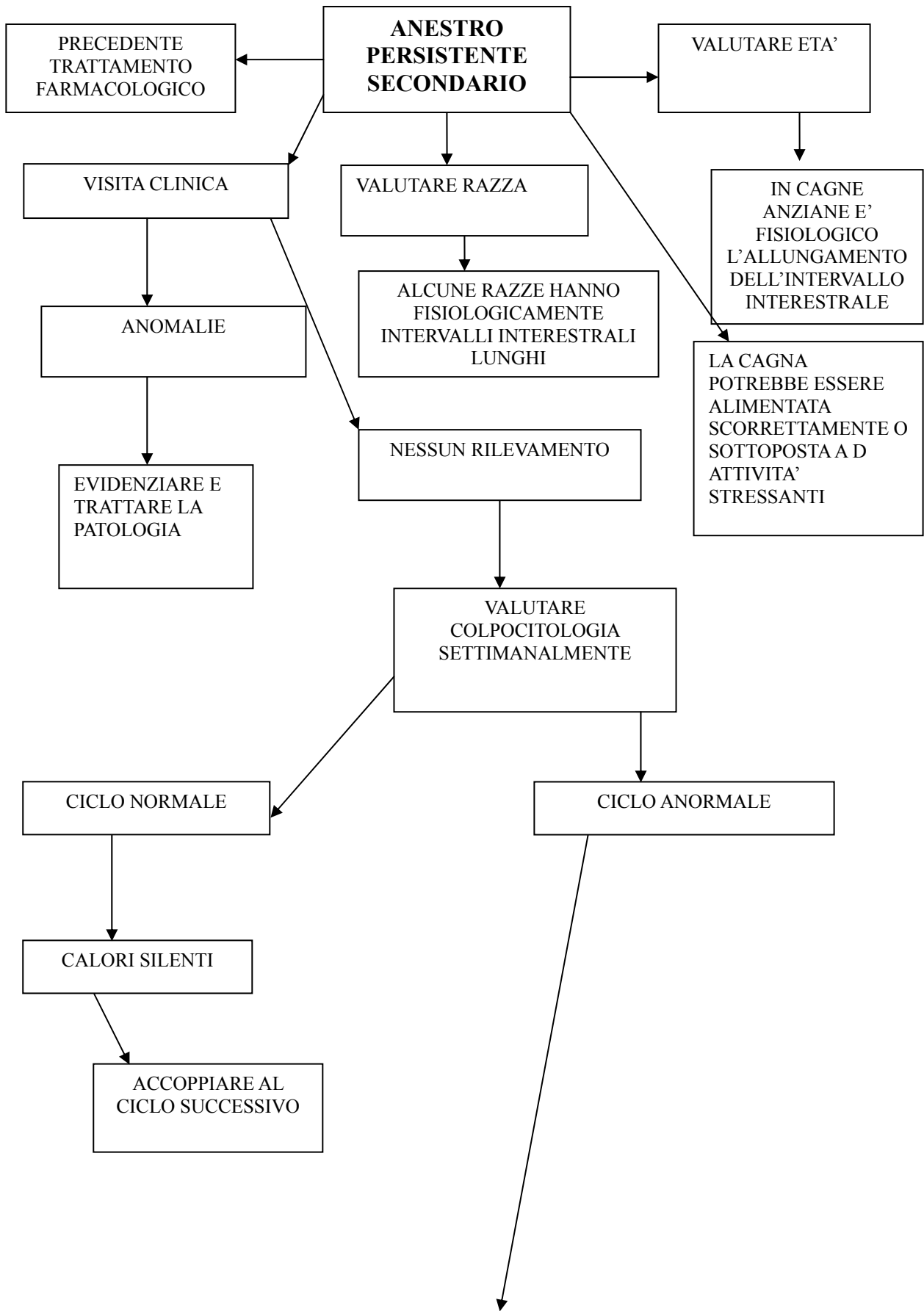
#### *1.3.2 Anestro persistente secondario*

L'assenza di manifestazioni estrali per un periodo eccessivamente lungo dal ciclo precedente può essere fisiologico. Alcune razze presentano normalmente intervalli interestrili prolungati. Il Basenji e il Dingo ciclano una volta l'anno (Freshman, 1991). Anche Collie, Labrador e Greyhound presentano spesso un intervallo interestrile di 10 mesi (Fontbonne, 2011).

Quando le fattrici diventano anziane, l'intervallo interestrile può allungarsi (Olson, 1988): un periodo di 10-12 mesi per una cagna con più di 6-8 anni di età non è preoccupante.

Qualora venissero escluse le suddette possibilità, la diagnosi differenziale di anestro persistente secondario deve prendere in considerazione alcuni dei fattori citati come cause di anestro persistente primario:

- ✓ Calori silenti
- ✓ Anestro indotto da farmaci
- ✓ Patologie sistemiche, in particolare iperadrenocorticismo ed ipotiroidismo
- ✓ Cisti luteiniche o neoplasie secernenti progesterone
- ✓ Aplasia ovarica acquisita (insufficienza ovarica)



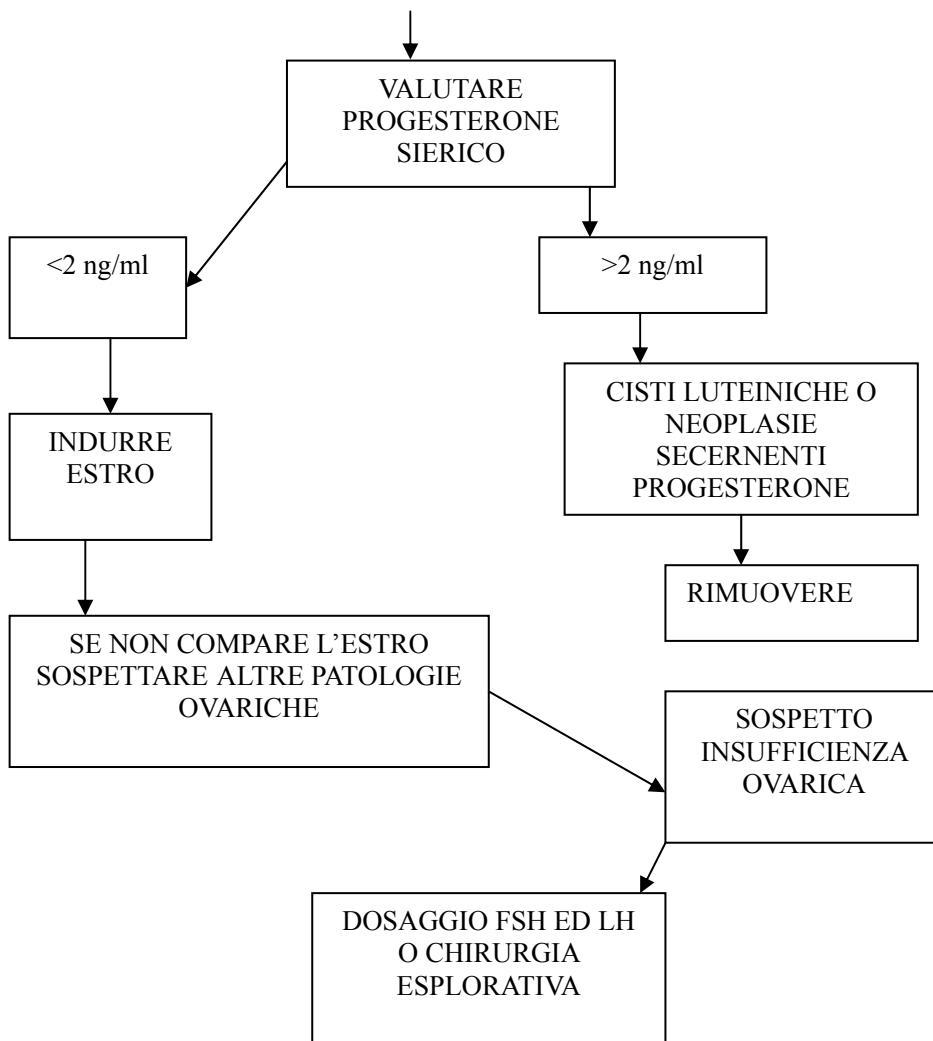


Figura 12- *Algoritmo diagnostico in caso di anestro persistente secondario* (adattato da Feldman e Nelson, 2004)

### Induzione dell'estro

Un potenziale metodo terapeutico, ma anche diagnostico, in cagne con anestro persistente è l'induzione dell'estro (Feldman e Nelson, 2004); è utile ricorrere a questa terapia qualora venissero escluse (o al fine di escludere) altre possibili cause.

Molti studi sull'induzione dell'estro sono stati effettuati su cagne in salute, ed il successo è stato variabile, anche in termini di concepimento (Johnston et al., 2001). I fattori limitanti della metodica di induzione dell'estro sono la disponibilità commerciale, la qualità e l'affidabilità delle varie preparazioni ormonali. Quando simili protocolli, però, vengono applicati su animali con un difetto dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio i risultati non sono paragonabili a quelli di cagne in salute, a causa della presenza di anomalie anatomiche o fisiologiche che le rendono incapaci di rispondere (oltre ad eventuali errori di protocollo). Normalmente l'FSH stimola inizialmente lo sviluppo follicolare, ed un picco dell'FSH contribuisce anche all'ovulazione; l'LH contribuisce allo sviluppo follicolare ed innesca l'ovulazione. Le concentrazioni sieriche di progesterone e prolattina sono diminuite in questo momento del ciclo (Concannon e Verstegen, 1997). Tre diverse tipologie di protocolli farmacologici sono descritte per indurre l'estro (Concannon, 1993) (vedi tabella 13):

1. protocolli di stimolazione dei follicoli ovarici (PMSG, hCG, FSH, LH, estrogeni);
2. protocolli di stimolazione del rilascio di gonadotropine (GnRH e analoghi) ;
3. protocolli che accorciano l'anestro mediante l'utilizzo di antiprolattinici

Il PMSG (Gonadotropina Sierica della Cavalla Gravida) è prodotto dalla cavalla durante la gravidanza ed ha un'azione principalmente FSH-simile, mentre l'hCG (Gonadotropina Corionica Umana) ha un'azione LH-simile (England, 1998).

L'induzione del calore mediante antiprolattinici si ottiene mediante la somministrazione di farmaci dopamino-agonisti, quali bromocriptina, metergolina e cabergolina (che agiscono, anche se ancora non è ben noto come, sui recettori dopaminergici delle cellule secernenti la prolattina nella ghiandola pituitaria [Gobello, 2006]), come dimostrato dalle terapie effettuate su cagne in anestro (Kooistra et al., 1999a; Jöchle et al., 1989; Okkens et al., 1997; Okkens et al., 1985; Onclin et al., 1995).

Gli effetti collaterali più importanti segnalati con l'utilizzo dei vari protocolli sono trombocitopenia e patologie uterine causate da iperestrogenismo nel 29% delle cagne trattate con PMSG (Arnold et al., 1989), e vomito transitorio nel 16,2% di quelle trattate con cabergolina (Jöchle et al., 1989).

Negli ultimi anni sono stati creati degli impianti di GnRH-agonisti a rilascio continuo per ovviare al problema della somministrazione giornaliera necessaria per le forme iniettabili: questi impianti hanno avuto esito positivo nella cagna ma anche in altre specie, come cavalla e vacca (Fontaine et al., 2011).



<b>PROTOCOLLO</b>	<b>PROESTRO/ESTRO (%)</b>	<b>OVULAZIONE(%)</b>	<b>GRAVIDANZA (%)</b>	<b>BIBLIOGRAFIA</b>
PMSG 150-300 IU, 3 volte a giorni alterni	0			Van Haften et al., 1989
PMSG sid (2-50 IU/kg) per 9-14 giorni	50-100	50-100	0-20	Arnold et al., 1989
PMSG sid (20 IU/kg) per 5 giorni + hCG (500 IU IM)	80-90	80-100	50	England e Allen, 1991
PMSG sid (44 IU/kg IM) per 9 giorni + hCG (500 IU IM)	100	80		Archbald et al., 1980
PMSG (250 IU/kg SC) per 20 giorni + hCG (500 IU SC)	62,5	40		Wright, 1982
PMSG (500 IU/kg IM) per 10 giorni + GnRH (50 µg)	100		0	Chaffaux et al., 1984
FSH (10 mg) singola iniezione	40			Shille et al., 1984
DES sid (5 mg PO) per 6-9 giorni, fino all'induzione del proestro	100		100	Bouchard et al., 1991a
DES sid (5 mg PO) per 7 giorni + LH (5 mg IM) il giorno 5 del proestro + FSH (5 mg IM) i giorni 9 ed 11 del proestro	100	100	100	Moses e Shille, 1988
DES sid (5 mg PO) per 5-14 giorni + hCG (1000 IU IM) il giorno 5 del proestro + FSH (10 mg IM) i giorni 9 ed 11 del proestro	100			Shille et al., 1989
GnRH (0,04-0,43 µg/kg SC) ogni 90 minuti per 6-12 giorni	83	80	60	Vanderlip et al., 1987
Bromocriptina bid (20 µg/kg PO) per 21 giorni	100		83	Van Haften, 1989
Cabergolina sid (5 µg/kg PO) per 7-10 giorni	100		93,3	Jöchle et al., 1989
Buserelin- GnRH agonista-tid (1,5 µg/kg SC per 11	30	20	20	Rota et al., 2003

giorni + 0,75 µg/kg SC per 3 giorni)				
Deslorelin- GnRH agonista- (2,1 mg impianto/cagna)	100	100	67	Kutzler et al., 2002
Deslorelin- GnRH agonista- (4,7 mg impianto/cagna)	100	87	78	Fontaine et al., 2011

IU= Unità Internazionali; IM= per via intramuscolare; SC= per via sottocutanea; sid= una volta al giorno; bid= due volte al giorno; tid= tre volte al giorno; DES= dietilsilbestrolo; PMSG= Gonadotropina Sierica della Cavalla Gravida; hCG= Gonadotropina Corionica Umana

Tabella 13– *Alcuni protocolli di induzione dell'estro riportati in letteratura*

### *1.3.3 Estro/proestro persistenti*

Quando proestro ed estro durano più di 6 settimane, si può parlare di sindrome da proestro/estro persistente (Jeffcoate, 1991), mentre il solo estro persistente corrisponde alla presenza di scolo vulvare, attrazione del maschio ed accettazione della monta per più di 28 giorni (Davidson, 2006).

In presenza di scolo vulvare è importante distinguere la patologia da neoplasie o infezioni del tratto urogenitale, corpi estranei vaginali, coagulopatie.

La persistenza dell'estro/proestro è dovuta all'elevato livello di stimolazione estrogenica, confermato dallo striscio vaginale con l'80-90% di cellule cheratinizzate.

La diagnosi differenziale prevede la presenza di cisti ovariche follicolari, neoplasie ovariche, somministrazione esogena di estrogeni e insufficienza epatica o shunt porto-sistemici (Nelson e Couto, 2003; Johnston et al., 2001; Fontbonne, 2011). L'iperestrogenismo di origine surrenale è rarissimo (Ettinger e Feldman, 2008).

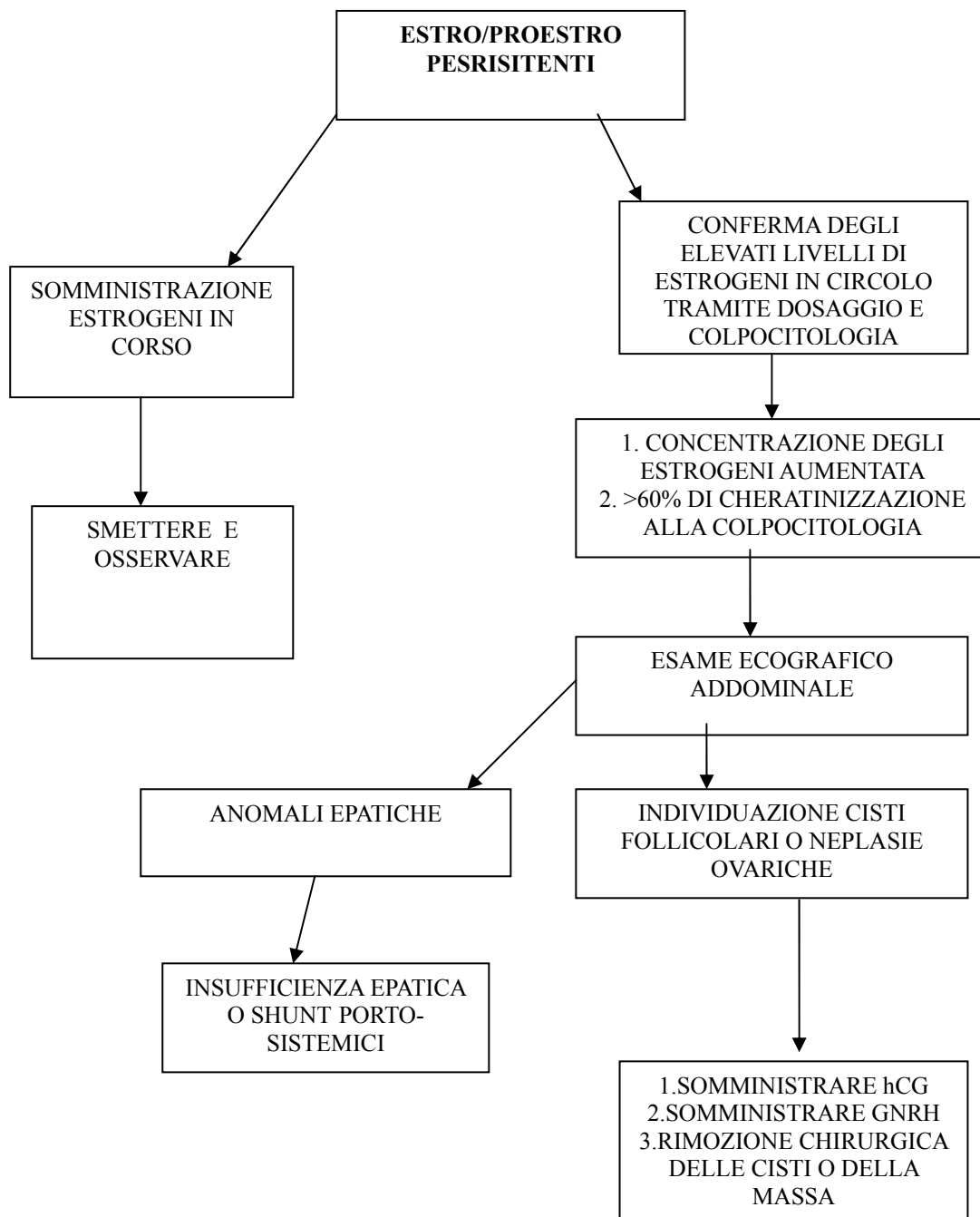


Figura 13- *Algoritmo diagnostico in caso di estrogeno/progesterone persistenti* (adattato da Feldman e Nelson, 2004)

### ➤ CISTI FOLLICOLARI E NEOPLASIE OVARICHE

Cagne con meno di 3 anni di età possono essere colpite da cisti ovariche follicolari (vedi figura 14), che si individuano ecograficamente in quanto sono strutture solitarie e di dimensioni maggiori rispetto ai follicoli preovulatori (1-1,5 cm di diametro) (Davidson, 2006). Le cisti follicoliniche secernono solo estrogeni e sono responsabili di proestro/estro persistenti, mentre le cisti che producono anche una bassa quantità di progesterone comportano estro persistente.

Le neoplasie ovariche in grado di produrre estrogeni sono tumori di origine epiteliale (adenomi e adenocarcinomi) o quelli delle cellule della granulosa: in genere compaiono in animali sopra i 5 anni di età.

Le cagne giovani con cisti follicolari che non presentano altre anomalie in genere non sono trattate, in quanto i segni clinici dell'estro regrediscono spontaneamente (Nelson e Couto, 2003). L'eventuale terapia in cagne da riproduzione prevede preferibilmente (o obbligatoriamente in caso di neoplasia) la rimozione chirurgica dell'ovaio colpito, qualora fosse uno solo (Grundy et al., 2002), oppure aspirazione delle cisti [metodica innovativa che ha dato risultati soddisfacenti, anche se i dati non sono ancora sufficienti e il limite principale è spesso l'insorgenza di piometra successivamente (Fontbonne, 2001)] o in alternativa il trattamento medico. Il progesterone non è utilizzato perché incrementa il rischio di sviluppo di iperplasia cistica endometriale/piometra; GnRH (50-100 µg/cagna per via intramuscolare ogni 24-48 ore per 3 volte) o hCG (22 IU/kg per via intramuscolare ogni 24-48 ore) inducono la regressione delle cisti e la luteinizzazione, ma i risultati sono variabili (Davidson, 2006; Feldman e Nelson, 2004). Fontbonne (2011) suggerisce che anche il procollo con GnRH o hCG è responsabile dell'instaurarsi dell'iperplasia cistica endometriale, poiché la luteinizzazione comporta il rialzo del livello di progesterone dopo un prolungato periodo di secrezione estrogenica: questo trattamento andrebbe riservato a cagne che verranno accoppiate subito dopo il trattamento.



Figura 14– Ovaio di cagna con cisti follicolari

#### ➤ SOMMINISTRAZIONE ESOGENA DI ESTROGENI

La somministrazione esogena di estrogeni è utilizzata più frequentemente per il trattamento dell'incompetenza dello sfintere uretrale tramite dietilsilbestrolo (DES), oppure per l'interruzione di gravidanza con DES o con estradiolo cipionato.

#### ➤ INSUFFICIENZA EPATICA O SHUNT PORTO-SISTEMICI

Si segnala anche la possibilità che l'estro/proestro persistenti siano imputabili ad insufficienza epatica (Fontbonne, 2011) o shunt porto-sistemici (Johnston et al., 2001) con conseguente carenza clearance ormonale, in quanto gli estrogeni sono metabolizzati in questa sede.

#### *1.3.4 Estro irregolare*

Normalmente l'utero canino richiede dai 130 ai 150 giorni dopo il ciclo estrale per l'involutione e la riparazione. Intervalli interestrili inferiori ai 4 mesi possono comportare infertilità, a causa dell'incompleta riparazione dell'endometrio, che preclude l'impianto (Freshman, 1991).

La lunghezza dell'intervallo interestrile è influenzata dalla razza, con un'ereditabilità del 35%: il Pastore Tedesco ed il Rottweiler sono razze che presentano cicli fertili anche ogni 4,5 mesi (Feldman e Nelson, 2004; Sokolowski et al., 1977). Studi effettuati su cagne di razza Pastore Tedesco hanno dimostrato che la concentrazione di progesterone durante la fase diestrile o in gravidanza è più bassa rispetto a cagne con intervallo interestrile normale, forse a causa di una scarsa secrezione dell'ormone da parte dei corpi lutei (Günzel-Apel et al., 2006). Questo potrebbe spiegare gli intervalli interestrili brevi, poiché una limitata attività dei corpi lutei ridurrebbe la durata della fase luteinica.

L'approccio diagnostico prevede di effettuare delle indagini durante il ciclo tramite esame fisico, citologia vaginale, dosaggio del progesterone per ottenere più informazioni sull'ovulazione e sull'assetto ormonale (Feldman e Nelson, 2004).

Il trattamento farmacologico in presenza di intervalli interestrili brevi senza una causa precisa include l'induzione di un normale periodo di anestro tramite l'utilizzo di mibolerone (0,3 ml/11 kg una volta al giorno per os) per 6 mesi, iniziando la terapia 6-8 settimane dopo la fine del precedente calore (Johnston et al., 2001). Teoricamente gli androgeni non influiscono sull'endometrio, che così ha il tempo di riprendersi dall'ultimo ciclo (Nelson e Couto, 2003). Al contrario, l'utilizzo di megestrolo acetato per prolungare l'anestro può comportare patologie uterine (Eilts e Davidson, 2005; Ettinger e Feldman, 2008). È raccomandato non trattare le cagne per intervallo interestrile

breve fino al raggiungimento dei 2,5-3 anni, poiché animali giovani spesso hanno cicli irregolari. È inoltre necessario essere certi che la cagna non sia gravida prima di somministrare il mibolerone, poiché questo androgeno sintetico causa difetti urogenitali nei feti femmine (Johnston, 1980). La cagna trattata potrebbe anche andare incontro a mascolinizzazione, ma i segni sono reversibili e il farmaco non influenza le future performance riproduttive (Feldman e Nelson, 2004), sebbene alcuni autori suggeriscano che il ciclo successivo (che dovrebbe iniziare alla fine del trattamento oppure dai 6 ai 9 mesi dopo) potrebbe non essere fertile (Johnston et al., 2001). In presenza di intervalli interestruali brevi la diagnosi differenziale deve considerare patologie uterine, sindrome dei calori interrotti/mancata ovulazione e cause iatrogene.

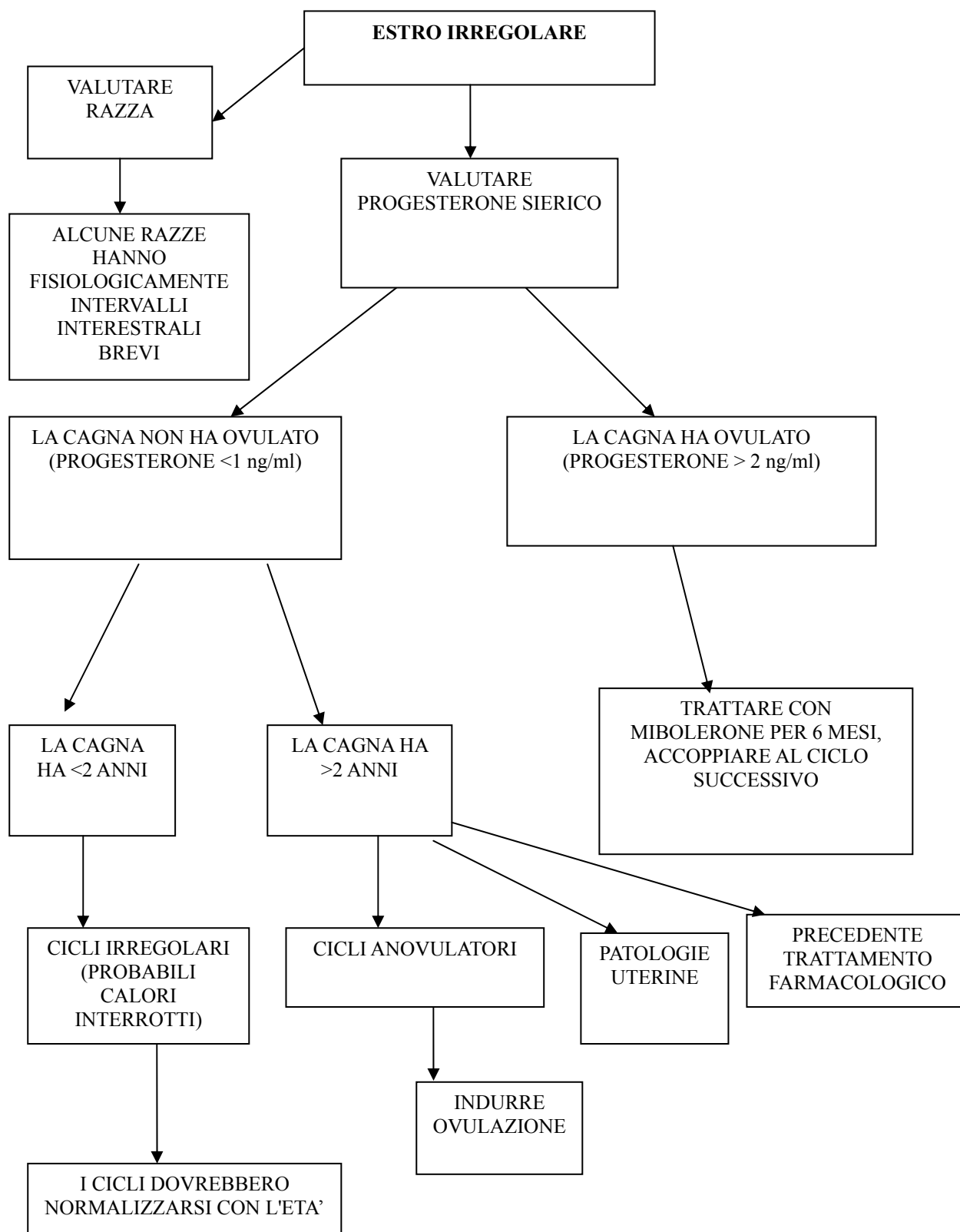


Figura 15–Algoritmo diagnostico in caso di estro irregolare (adattato da Feldman e Nelson, 2004)

### ➤ PATOLOGIE UTERINE

Intervalli interestrals irregolari sono segnalati in cagne con infezioni uterine (Freshman, 1991): le prostaglandine rilasciate dall'endometrio infiammato causare luteolisi prematura, con ritorno precoce in estro (Johnston et al., 2001). La diagnosi si basa sulla visualizzazione ecografica della parete uterina ispessita, ma la conferma deriva da una biopsia uterina con esame istologico. Altri autori sostengono che non vi siano basi fisiologiche in questa diagnosi differenziale (Feldman e Nelson, 2004).

### ➤ CALORI INTERROTTI

I calori interrotti (*"split heats"*) si definiscono come apparenti cambiamenti clinici e comportamentali caratteristici del proestro, come gonfiore vulvare, scolo sieromorragico dalla vulva ed attrazione del maschio senza progressione verso l'estro, seguiti da alcune settimane di anestro prima di un normale ritorno in calore (Johnston et al., 2001). Sebbene possa manifestarsi in qualsiasi momento, questo fenomeno avviene più frequentemente in giovani cagne: per questo motivo gli animali non dovrebbero essere trattati per intervallo interestrals breve prima dei 3 anni.

La fase iniziale dei calori interrotti è associata ad un normale sviluppo dei follicoli ovarici, e alla loro secrezione di estrogeni; ciò comporta la manifestazione dei tipici segni del proestro, ma nell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaie gli eventi endocrini successivi non avvengono, ed il risultato finale è la mancata ovulazione e la mancata formazione del corpo luteo con secrezione di progesterone. I follicoli regrediscono, e scompaiono i segni di proestro/estro. 2-10 settimane dopo si sviluppa un'altra onda follicolare, che secreta abbastanza estrogeni da permettere le manifestazioni proestrali/estrali e l'ovulazione (Okkens et al., 1992). Il calore seguente al *calore* interrotto è generalmente fertile (Johnston et al., 2001).

L'intera serie di eventi viene interpretata dall'allevatore come due cicli estrali distinti, o, in alternativa, il sanguinamento causato dalla seconda ondata follicolare viene considerato un segno di riassorbimento o aborto.

I calori interrotti possono anche ripetersi con più ondate follicolari prima dell'ovulazione: in questa situazione la cagna presenta più volte i segni della secrezione estrogenica prima di completare il ciclo (Feldman e Nelson, 2004).

La diagnosi si effettua mediante citologia vaginale, poiché ogni ondata follicolare è accompagnata da secrezione di estrogeni e modificazioni delle pliche della mucosa vaginale, e con il dosaggio del progesterone durante il ciclo: se l'ormone non supera mai i 5 ng/ml è indice del fatto che l'ovulazione non è ancora avvenuta.

### ➤ CICLI ESTRALI ANOVULATORI

Non è ancora noto se la diagnosi di mancata ovulazione differisca dai calori interrotti. In ogni caso, da alcuni studi emerge che l'incidenza di questo fenomeno è molto bassa, intorno all'1% (Fontbonne, 2011; Arbeiter, 1993).

Se l'ovulazione non avviene, anche l'intera fase del diestro successiva al calore non accade ed il livello di progesterone si mantiene sempre sotto i 5-6 ng/ml; di conseguenza il calore successivo si manifesta più precocemente del normale (Johnston, 1988; Fontbonne, 2011). Per la diagnosi assume un'importanza rilevante il dosaggio del progesterone (Arbeiter, 1993).

Le cisti follicolari, responsabili anche di estro persistente, sono suggerite come possibile causa di mancata ovulazione ed intervallo interestrale breve nella cagna (Freshman, 1991; Fontbonne, 2011): l'elevata concentrazione di estrogeni non consentirebbe il picco di LH necessario. Alcuni autori, di contro, non concordano con questa ipotesi (Feldman e Nelson, 2004). In ogni caso, se si sospetta la presenza di cisti in diagnosi differenziale dovrebbe essere eseguita un'ecografia addominale; il trattamento prevede la rimozione chirurgica ovarica, o la terapia medica [vedi paragrafo 1.3.3-estro/proestro persistenti]. Un altro fattore imputabile in caso di mancata ovulazione è la presenza di una fase proestrile prolungata con follicoli che non maturano: la sindrome dell'estro persistente e il calore anovulatorio possono essere due manifestazioni della stessa patologia (Fontbonne, 2011). Alcuni autori suggeriscono che una possibile causa di questo fenomeno sia lo stress (Grundy et al., 2002).

In cagne di età superiore ai 3 anni il trattamento prevede l'induzione dell'ovulazione con hCG 500 IU/kg per via intramuscolare o LH il giorno prima o quello dopo l'accoppiamento (Jones e Joshua, 1988), sebbene in animali con follicoli non ancora maturi questo trattamento risulti inutile (Fontbonne, 2011): in questi soggetti è meglio far precedere all'induzione dell'ovulazione una o due iniezioni di PMSG a distanza di 48 ore, per promuovere la maturazione dei follicoli.

### ➤ CAUSE IATROGENE

La somministrazione di agonisti della dopamina, come cabergolina e bromocriptina, è stata associata ad intervalli interestrali brevi (Cinone et al., 2000), dovuti all'accorciamento dell'anestro (Davidson, 2006). Effetti simili sono stati osservati dopo trattamento con prostaglandine. Anche l'utilizzo degli antagonisti del progesterone (aglepristone) può esitare in intervalli interestrali brevi (Galac, 2000).

## **2 RIASSORBIMENTO/ABORTO**

La morte del prodotto del concepimento può avvenire in qualsiasi stadio della gravidanza, e può esitare in: riassorbimento, aborto, natimortalità, mummificazione o macerazione settica (Johnston et al., 2001). Quale sia l'esito della morte, comunque, dipende dall'eziologia, dallo stadio della gestazione e dalla risposta materna e fetale (Johnston e Raksil, 1987).

L'esatta incidenza delle perdite embrionali e fetali è difficile da determinare. Se la morte avviene durante la prima metà della gestazione si verificherà un riassorbimento: gli allevatori spesso sono incerti sul fatto che la gravidanza si sia instaurata o meno, poiché i sintomi di riassorbimento sono minimi; inoltre, non esiste un test commerciale di gravidanza precoce per la cagna (l'esame ecografico conferma la gestazione verso i 18-20 giorni) (Von Root Kurstritz, 2005). Secondo alcuni studi, comunque, la percentuale di riassorbimento nelle cagne è pari circa al 10% (England, 1998a; Andersen e Simpson, 1973). Se la morte del feto avviene durante la seconda metà della gravidanza (quando le strutture ossee fetali si sono già sviluppate), si verificheranno l'aborto o la natimortalità: l'aborto è definito come l'espulsione del prodotto del concepimento morto oppure incapace di vita indipendente (Johnston et al., 2001). Sebbene l'aborto sia associato a perdite vulvari emorragiche, la diagnosi può essere difficile se le cagne si nutrono dei feti abortiti (Post, 1995); inoltre, la sintomatologia clinica è spesso assente. Se un feto muore in gestazione avanzata e non viene abortito, esso va incontro a macerazione settica o mummificazione: cagne con ritenzione del feto macerato spesso presentano scolo vulvare fetido, tossiemia o setticemia; la mummificazione, invece, consiste in autolisi del feto, assorbimento di fluidi fetali ed involuzione della placenta (Johnston et al., 2001).

Vi sono cause infettive e non infettive di morte embrionale/fetale in gravidanza. Per effettuare la diagnosi differenziale è fondamentale raccogliere l'anamnesi ed osservare attentamente i sintomi, prima di procedere con l'utilizzo di tecniche laboratoristiche specifiche (Verstegen et al., 2008).

### ***2.1 Malattie infettive causa di riassorbimento/aborto***

Gli agenti infettivi responsabili di morte fetale/embrionale hanno ricevuto più attenzione in letteratura rispetto alle cause non infettive, sia per l'elevata incidenza con cui si manifestano, sia poiché sono più semplici da diagnosticare (Post, 1995). In caso di sospetto della presenza di una patologia infettiva è raccomandato sottoporre a coltura i tessuti fetali/placentari o neonatali, lo stomaco del feto o del neonato e il suo contenuto, e le perdite vaginali della cagna raccolte mediante un tampone (Feldman e Nelson, 2004).

CAUSE BATTERICHE	CAUSE PROTOZOARIE	CAUSE VIRALI
<i>Brucella canis</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Herpesvirus canino</i>
<i>Campylobacter</i>	<i>Neospora caninum</i>	<i>Virus del Cimurro canino</i>
<i>Salmonella</i>		<i>Parvovirus canino tipo 1</i>
<i>E. coli</i>		
<i>Streptococcus spp</i>		
<i>Listeria monocytogenes</i>		
<i>Leptospira serovar Bratislava</i>		
<i>Micolpasmi ed Ureaplasmi</i>		

Tabella 14– Cause infettive e parassitarie di disturbi riproduttivi nella cagna (Givens e Marley, 2008)

### 2.1.1 Brucellosi

Attualmente la Brucellosi rappresenta un'importante causa di perdite economiche negli allevamenti di molti Paesi: non è ancora possibile diagnosticarla con certezza, né convincere gli allevatori che la carriera riproduttiva dei loro animali è terminata in caso di positività (Wanke, 2004).

Questa patologia infettiva è comune nelle zone meridionali degli Stati Uniti e in America centrale e meridionale; è stata segnalata anche in Messico, in Germania, in Spagna, in Italia, in Cecoslovacchia, in Polonia, in Francia, in India, nelle Filippine, in Corea, in Giappone, in Cina, in Turchia, in Malesia, in Taiwan, in Nigeria, in Canada (Wanke, 2004). In Italia si segnala il recente caso di un cane in cui *B. canis* è stata isolata tramite real-time PCR su sangue, urine ed un frammento di disco intervertebrale, a testimonianza del fatto che questo microrganismo è ancora presente, seppur non diffusamente (Corrente et al., 2010).

La specie canina è suscettibile all'infezione da parte di 4 tipi di Brucelle: *B. canis*, *B. abortus*, *B. melitensis*, *B. suis* (Hollett, 2006). Le ultime tre specie sono responsabili di infezione sia tramite esposizione naturale (ingestione di latte, carne, feti abortiti contaminati) che sperimentale, ma l'esito è autolimitante e caratterizzato da una sintomatologia lieve o inesistente (Pidgeon et al., 1987). È *B. canis* l'agente eziologico ritenuto attualmente il principale responsabile della patologia nel cane; l'uomo rappresenta un ospite accidentale di *B. canis*, e le infezioni si manifestano generalmente in maniera lieve se comparate a quelle causate da *B. abortus*, *B. melitensis* o *B. suis* (Feldman e Nelson, 2004). Si tratta di un coccobacillo Gram negativo che si differenzia dalle altre specie del genere *Brucella* per lo sviluppo di colonie rugose (Carmichael e Greene, 1998; Berthelot e Garin Bastuji, 1993); cresce in comuni terreni di coltura e non richiede la presenza di CO<sub>2</sub>.

Gli animali infetti eliminano il batterio tramite urine [nel maschio la concentrazione è superiore,

fino a  $10^6$  microrganismi/ ml (Carmichael e Joubert, 1988)], scolo vaginale, materiale abortito e seme, e in misura minore anche tramite saliva, secrezioni nasali e latte (Johnson e Walker, 1992). Alcuni autori reputano che il latte non sia importante quale veicolo di infezione dal momento che i cuccioli vengono infettati in utero (Carmichael e Greene, 1998), ma altri ne sottolineano l'effetto devastante all'interno di un allevamento (Feldman e Nelson, 2004).

La via di entrata è rappresentata dalle mucose genitali, oronasali e congiuntivali (Feldman e Nelson, 2004). La trasmissione venerea è più frequente quando maschi infetti si accoppiano con femmine suscettibili, e talvolta quando maschi suscettibili montano femmine infette (Carmichael e Joubert, 1988). Una volta attraversata la mucosa, *B. canis* è fagocitata dai macrofagi e trasportata ai tessuti linfatici (linfonodi e milza) e agli organi genitali, dove si riproduce. La batteriemia si presenta a 1-4 settimane dall'infezione (Meyer, 1983); successivamente può uscire dal torrente circolatorio e localizzarsi nei dischi intervertebrali, nell'occhio, nel tratto genitale femminile (utero, feti) o maschile (epididimo, prostata) provocando una continua o ricorrente batteriemia che persiste da 6 mesi a 5,5 anni (Carmichael et al., 1983; Carmichael e Joubert, 1988; Carmichael e Greene, 1998).

I titoli anticorpali si alzano dopo l'infezione, ma calano di pari passo con la batteriemia; il declino dei titoli anticorpali, quindi, non è indicativo della scomparsa del microrganismo dagli animali (Nicoletti, 1991; Johnson et al., 1991).

La sintomatologia generica non è conclamata: la febbre non si riscontra comunemente, sono stati segnalati rari casi di perdita del pelo, diminuzione delle condizioni generali di salute e intolleranza all'esercizio (Wanke, 2004); il segno più evidente della patologia è una linfadenite generalizzata, ma che coinvolge soprattutto linfonodi retrofaringei ed inguinali (Carmichael e Greene, 1998), talvolta accompagnata anche da un ingrossamento della milza. Altri sintomi riportati sono: discospondilite (Smeak et al., 1987) e talvolta conseguente paresi/atassia (Kerwin et al., 1992), oftalmite ed uveite (Johnson e Walker, 1992), artrite e poliartrite (Forbes, 1990), dermatite piogranulomatosa, meningoencefalite (Purvis, 1981), endocardite (Ying et al., 1999).

Il più comune segno di Brucellosi è l'aborto tardivo, tra i 30 ed i 57 giorni di gestazione, con una frequenza più elevata tra i 45 ed i 55 giorni (Carmichael e Kenney, 1968): i cuccioli abortiti presentano parziale autolisi e lesioni caratteristiche di un'infezione batterica, quali edema sottocutaneo e lesioni degenerative di fegato, milza, reni ed intestino (Wanke, 2004). La cagna continua ad espellere materiale rossastro o verdastro dalla vulva per un lungo periodo (Carmichael e Kenney, 1968; Purswell, 1992). Una cagna infetta può anche abortire più volte consecutivamente, oppure partorire dei cuccioli deboli che muoiono da poche ore ad un mese dopo la nascita; talvolta, i cuccioli sembrano perfettamente normali, e sviluppano segni di patologia solo successivamente (Nicoletti, 1989). La Brucellosi può comunque comportare anche riassorbimento o infertilità in

entrambi i sessi (Hollett, 2006). Nel maschio la manifestazione più comune è rappresentata da epididimite e prostatite (Wanke, 2004).

L'unica metodica di diagnosi certa è l'isolamento di *B. canis*: un risultato negativo, però, non è indice di animale sano, poiché il batterio potrebbe temporaneamente non trovarsi nel tessuto analizzato (Wanke, 2004). Il materiale più semplice per effettuare una coltura è il sangue che risulta essere anche il più accurato nelle prime 8 settimane post-infezione (Carmichael e Shin, 1996), considerando però la possibilità di una batteriemia intermittente; anche il seme, il latte e le secrezioni vaginali durante l'estro o dopo l'aborto sono contaminate dopo l'infezione e poi in maniera intermittente. I batteri possono essere individuati nella placenta, anche se i feti abortiti potrebbero non presentare alcun microrganismo. Campioni di urina sono risultati positivi in animali con colture su sangue negative. Tuttavia, gli organi migliori per l'isolamento, tramite coltura da biopsia o esame post-mortem, sono linfonodi, prostata, milza, midollo e talvolta fegato e testicoli (Weber e Schliesser, 1975) (vedi tabella 15). La PCR è una metodica alternativa all'isolamento batterico nella diagnosi di Brucellosi, in quanto rapida, sensibile e specifica (Keid et al., 2007a). Questa metodica è stata testata su tamponi vaginali (Keid et al., 2007a), sangue (Keid et al., 2007b), seme (Keid et al., 2007; Kim et al., 2006) e linfonodi (Aras e Uçan, 2010) di cani, con buoni risultati in termini di sensibilità e specificità.

<b>SUBSTRATI UTILIZZATI PER L'ISOLAMENTO</b>	<b>MOMENTO IN CUI E' EFFETTUATA LA COLTURA</b>	<b>ATTENDIBILITA' DEI RISULTATI</b>
Scolo vulvare post-aborto	Quando presente	+++
Placenta	Quando presente	++
Feto abortito	Quando presente	Potrebbe essere negativo
Seme	3-11 settimane PI 12-60 settimane PI >60 settimane PI	+++ Bassa concentrazione -
Sangue	5-30 settimane PI Dopo le 30 settimane 6-12 mesi PI 24-48 mesi PI 48-58 mesi PI >58 mesi PI	100% + Intermittente >80% + 50-80% + 25-50% + <25% +
Epididimo	35-60 settimane PI >100 settimane PI	50-100%+ -
Urina	8-30 settimane PI	Concentrazione superiore in quella maschile rispetto alla femminile
Ghiandole prostatiche	Più di 64 settimane PI	Generalmente +
Linfonodi, milza, midollo	Con batteriemia Senza batteriemia	Generalmente + +/-
Occhio	Con uveite	+++
Disco intervertebrale	Discospondilite	+/-

PI= post-infezione

Tabella 15- *Confronto tra diverse sedi di campionamento, tempi in cui effettuare l'esame colturale e attendibilità dei risultati dei test per confermare la positività a Brucella canis (Johnson et al., 1991)*

Esistono vari test sierologici con diverse sensibilità e specificità, a seconda dello stadio della patologia e del metodo utilizzato dal test; per questo è importante associare all'analisi una corretta anamnesi e raccolta dei sintomi clinici (Wanke, 2004). Sebbene gli anticorpi possano essere evidenziati a partire dalle 2 settimane post- infezione, nessun metodo sierologico è preciso fino alle 8 settimane (Carmichael e Greene, 1998). I test attualmente utilizzati per la diagnosi di Brucellosi canina sono: agglutinazione rapida su piastra con o senza l'aggiunta del 2-mercaptoetanololo (RSAT), agglutinazione in provetta con o senza l'aggiunta del 2-mercaptoetanololo (TAT), immunodiffusione in gel di agar (AGID) ed ELISA utilizzando antigeni di membrana o di proteina citoplasmatica, immunofluorescenza indiretta (IFA) (Wanke, 2004) (vedi tabella 16). L'aggiunta del 2-mercaptoetanololo è utile per ridurre i falsi positivi che si possono verificare al test di agglutinazione, in quanto distrugge le IgM responsabili di una cross-reazione nei confronti di altri batteri, quali Streptococchi, Stafilococchi e *Pseudomonas spp.* (Zoha e Carmichael, 1982; Carmichael e Joubert, 1988). Gli anticorpi diretti contro antigeni di membrana appaiono più precocemente (Moon et al., 1994) e scompaiono più rapidamente dopo che la batteriemia è cessata, mentre quelli diretti contro antigeni citoplasmatici tendono a persistere più a lungo (da 6 mesi ad un anno), permettendo la diagnosi anche nei casi di patologia cronica (Zoha e Carmichael, 1982). L'AGID con utilizzo di antigeni citoplasmatici è considerato il test più specifico, sebbene presenti lo svantaggio di essere poco sensibile nelle infezioni precoci (Pretzer, 2008).

Per quanto riguarda il test IFA, alcuni risultati dal Laboratorio Diagnostico della Cornell University dimostrano un'elevata presenza di falsi positivi, sebbene questa metodica sia utilizzata da molteplici laboratori di diagnosi negli Stati Uniti (Wanke, 2004): è disponibile un kit commerciale prodotto da Eurokit SRL, Gorizia, Italia.

TEST SIEROLOGICO	ANTIGENE	PERIODO DEI RISULTATI POSIVI	COMMENTI
RSAT+2-MERCAPTOETANOLO	Membrana	Da 8-12 settimane PI a 3 mesi dalla scomparsa della batteriemia	Semplice e veloce; sensibile ma poco specifico; disponibile kit commerciale
TAT+ 2-MERCAPTOETANOLO	Membrana	Da 8-12 settimane PI a 3 mesi dalla scomparsa della batteriemia	Sono possibili falsi positivi
AGID	Membrana	Da 12 settimane PI a 4 mesi dalla scomparsa della batteriemia	Complesso; più preciso del RSAT
AGID	Citoplasmatico	Da 12 settimane PI infezione a 36 mesi dalla scomparsa della batteriemia	Specifico ma non sensibile; utile per casi cronici
ELISA	Membrana	Non noto (atteso simile a quello osservato con TAT)	Specifico ma non sensibile; disponibilità limitata
ELISA	Citoplasmatico	Non noto (atteso simile a quello osservato con AGID con antigene citoplasmatico)	Molto sensibile e specifico; utile per casi cronici; disponibilità limitata

PI= post-infezione

Tabella 16- Test sierologici per *Brucella canis* (adattato da Wanke , 2004)

A causa della sua localizzazione intracellulare, *B. canis* è difficile da eliminare tramite gli antibiotici. Gli studi effettuati (De Antonio e Martin, 1995; Castro e Carmichael, 1981; Nicoletti, 1991; Zoha e Walsh, 1982; Wanke et al., 2006) descrivono una sensibilità del microrganismo a tetracicline, aminoglicosidi, cloramfenicolo, spectinomicina, rifamicina, sulfadimetossina, fluorochinoloni, minociclina, ossitetraciclina e tetraciclina combinate a streptomina.

Nonostante la riduzione della sintomatologia, del titolo anticorpale, della disseminazione batterica e la preservazione della fertilità, nessun trattamento ha permesso di eradicare al 100% la patologia (Wanke, 2004; Wanke et al., 2006).

In allevamenti in cui si riscontrano aborti, infertilità ed epididimite ricorrenti è necessario effettuare dei test sierologici per *Brucella canis*; in caso di positività è raccomandato confermare la patologia (ulteriori test sierologici e isolamento del batterio), mettere in quarantena l'allevamento, determinare ed eliminare la fonte dell'infezione (maschi per la monta, animali recentemente introdotti), rimuovere dall'allevamento gli animali positivi [separarli solo fisicamente, nonostante una corretta igiene, non è sufficiente (Carmichael e Joubert, 1988)], trattare gli animali negativi con tetraciclina e streptomina testandoli mensilmente e rimuovendo tutti i nuovi casi, disinfettare l'allevamento con sali quaternari e iodofori, continuare dopo l'ultimo caso a testare gli animali ogni 3 mesi per un anno (Wanke, 2004). Preventivamente, è utile sottoporre a test sierologici tutti i maschi e le femmine prima dell'accoppiamento, e successivamente ogni 6 mesi; tutti i nuovi animali introdotti dovrebbero rimanere isolati per un mese (Feldman e Nelson, 2004) o 8-12 settimane (Wanke, 2004).

### 2.1.2 *Campylobacter spp*

La Campylobacteriosi nella specie canina si manifesta generalmente con forme gastroenteriche, il cui sintomo principale è la diarrea. Alcune specie di *Campylobacter*, batterio responsabile di aborti e natimortalità di pecore e vacche, sono state isolate anche da tessuti di cuccioli abortiti (Torre e Tello, 1993; Bulgin et al., 1984; Odendaal et al., 1994), oltre che da campioni fecali di cani perfettamente in salute.

La diagnosi definitiva si realizza tramite la coltura di tessuti neonatali o fetali, placenta e tamponi vaginali (Bulgin et al., 1984). Vi sono indicazioni sul fatto che *C. jejuni* sia zoonotico, e quindi è necessaria precauzione nei laboratori di analisi (Johnston et al., 2001).

### 2.1.3 *Salmonella spp*

Le Salmonelle sono bacilli Gram negativi appartenenti alla famiglia delle Enterobacteriaceae. Questi microrganismi, responsabili anche di patologie gastroenteriche nell'uomo (gravi in soggetti immunocompromessi), sono diffusi in tutto il mondo (Greene, 1998).

La più comune fonte di infezione è il contatto con cibo o acqua contaminati (Johnston et al., 2001). L'incidenza dell'isolamento batterico dalle feci di cani in salute è riportata essere variabile, dall'1 al

36% (Kaufman, 1966; Schaeffert e Strauch, 1978; Ikeda et al., 1986; Morse e Duncan, 1975; Tsai et al., 2007; Bagcigil et al., 2007).

La sintomatologia dell'infezione batterica canina in genere è assente, ma nei casi più gravi si verificano diarrea, vomito, febbre, depressione, aborto e morte (Morse e Duncan, 1975).

*S. panama* è stata isolata da alcuni cuccioli abortiti (Redwood e Bell, 1983). Il ruolo del batterio nella morte fetale potrebbe essere di patogeno primario oppure secondario, giunto nell'utero nel momento della morte dei feti. In ogni caso, *Salmonella spp* è considerata essere parte della normale flora vaginale (Johnston et al., 2001).

La terapia, in seguito ad isolamento batterico nei feti, si basa sulla somministrazione di cloramfenicolo, sulfamidici e amoxicillina (Post, 1995). È sconsigliato l'uso indiscriminato di chemioterapici, in particolare a scopo profilattico in cagne gravide senza sintomatologia clinica, poiché questo comporta lo sviluppo di resistenza batterica ed il prolungamento del decorso della patologia in animali infetti (Johnston et al., 2001).

#### 2.1.4 *Escherichia coli*

*E. coli* è il più comune batterio isolato dalla vagina delle cagne in salute e dall'utero di cagne con metrite o piometra (Johnston et al., 2001). Si riporta, però, anche l'isolamento del microrganismo dalle perdite vulvari e dall'essudato uterino di una cagna con aborto (Linde, 1983).

*E. coli* produce un'endotossina che ha dimostrato avere potere abortigeno in altre specie, e potrebbe esitare in morte fetale anche nella cagna. Nonostante ciò, l'incidenza di aborto dovuto ad *E. coli* è rara (Pretzer, 2008).

#### 2.1.5 *Streptococcus spp e altri batteri*

Streptococchi  $\beta$ -emolitici sono comunemente isolati dalla vagina di cagne in salute, ma anche di animali con problemi di infertilità, patologie uterine, aborti e setticemia neonatale (Mantovani et al., 1961; Johnston et al., 2001). *Streptococcus canis* gruppo G è un patogeno responsabile di infezioni del tratto genitale ed aborti nelle cagne (De Winter et al., 1999; Miller et al., 1996), così come *Listeria monocytogenes* (Sturgess, 1989) e *Leptospira* serovar *bratislava* (Ellis, 1986).

Micoplasmi ed Ureaplasmi, che comunemente si trovano nel tratto respiratorio ed in quello genitale dei cani (Scanlan, 2003), sono associati a scarsa percentuale di concepimento, morte embrionale, riassorbimento, aborto, natimortalità e mortalità neonatale (Lein, 1986; Doig et al., 1981); oltre che tramite il passaggio dei cuccioli nella vagina durante il parto ne è stata infatti descritta la trasmissione uterina (Post, 1995). L'esatto ruolo di Micoplasmi ed Ureaplasmi non è del tutto noto: si pensa che non siano significativamente responsabili di disturbi riproduttivi in cagne allevate

singolarmente, ma piuttosto in allevamenti con elevata densità (Johnston et al., 2001).

### 2.1.6 *Herpesvirus canino*

L'Herpesvirus canino tipo 1 (CHV-1) è responsabile di patologie respiratorie nei cani giovani ed adulti ("tosse dei canili"), infezione fatale nei neonati [vedi paragrafo 4.2.2- Herpesvirus canino], ma anche di riassorbimento, aborto e natimortalità (Post e King, 1971; Hashimoto et al., 1983; Anvik, 1991).

Il CHV-1 è presente in molti Paesi, ed alcuni studi suggeriscono che sia enzootico nella popolazione canina europea (Lacheretz e Cognard, 1998; Reading e Field, 1998; Rijsewijk et al., 1999; Rosse et al., 2002).

La trasmissione si verifica per via oronasale e venerea, ma i feti possono infettarsi direttamente in utero (Cornwell e Wright, 1969; Carmichael e Greene, 1998a). I maschi infetti possono eliminare il virus con il seme per molto tempo dopo l'infezione (Evermann, 1989).

La caratteristica principale del CHV-1, come di tutti gli alfa herpesvirus, è la latenza: essa consiste nella localizzazione del genoma virale all'interno del nucleo (esternamente ai cromosomi) di alcune cellule, in particolare nel ganglio del trigemino o in quelli lombosacrali, nelle ghiandole salivari, nel fegato e nelle tonsille (Burr et al., 1996), senza espressione del genoma virale. Solo dopo riattivazione si verifica la trascrizione del genoma e la formazione/eliminazione di nuovi virus (Nauwynck, 2010). Gli animali con infezione latente sono asintomatici (Anvik, 1991). I fattori che alterano lo stato immunitario (età, gravidanza e parto, stress, terapie immunosoppressive o patologie concomitanti) sono determinanti per la riattivazione virale (Carmichael e Greene, 1998a; Okuda et al., 1993).

Nonostante sperimentalmente sia stata indotta l'infezione e si siano osservate lesioni vaginali e prepuziali (papule, vescicole, erosioni, scomparse rapidamente dopo l'infezione), aborto durante i 2/3 di gestazione, natimortalità o nascita prematura (Hashimoto et al., 1982; Hashimoto et al., 1983), in campo è più raro dimostrare l'esistenza del virus quale causa di questi disturbi riproduttivi, e le informazioni relative ai pattern anticorpali e all'escrezione virale nelle infezioni naturali rimangono aneddotiche (Ronsse et al., 2005). Inoltre, non esiste prova, ma solo sospetto, del fatto che CHV-1 provochi effetti negativi durante i primi stadi della gestazione (Nauwynck, 2010). È stato dimostrato, comunque, che cagne appartenenti ad allevamenti con CHV-1 endemico manifestano problemi di fertilità, con abbassamento del tasso di concepimento dell'allevamento stesso (Van Gucht et al., 2001; Poulet et al., 2001).

L'isolamento virale è particolarmente difficile, sia durante la "fase quiescente" (Post e King, 1971) che quando le lesioni sono presenti nei tessuti materni e fetali (Hashimoto et al., 1983). La PCR

sembra essere più sensibile (Granchamps, 1998), sebbene gli studi effettuati da Ronsse et al. (2005) dimostrino che risultati negativi alla PCR effettuata in campo vanno comunque interpretati con cautela (l'escrezione virale è limitata in termini di quantità e tempistiche).

Per quanto concerne l'aspetto sierologico, il virus viene considerato da alcuni autori scarsamente immunogenico (Carmichael e Greene, 1998a; Anvik, 1991). Ronsse et al. (2004) invece, hanno dimostrato che utilizzando test più sensibili (ELISA) rispetto alla sieroneutralizzazione si osservano rapidi cambiamenti sierologici. Gli anticorpi neutralizzanti scompaiono rapidamente dopo il contatto con il virus (Feldman e Nelson, 2004), ed inoltre vi sono molteplici elementi connessi alla variabilità dei titoli anticorpali riscontrabili, in quanto questi sono più elevati in caso di allevamenti di notevoli dimensioni, scarsa igiene, presenza della sindrome di "tosse dei canili", uso di maschi esterni all'allevamento, età più avanzata (Ronsse et al., 2004) e fase del ciclo estrale (in diestro i titoli anticorpali sono più bassi) (Ronsse et al., 2005). Poiché i titoli anticorpali risentono di più fattori e variano notevolmente, non è utile ricorrere a frequenti test sierologici per monitorare la situazione dell'Herpesviroosi in allevamento (Anvik, 1991). La vaccinazione preventiva (Eurican Herpes 205 della Merial) effettuata 10 giorni dopo la presunta data dell'accoppiamento e ripetuta 6 settimane dopo (Poulet et al., 2001) è la migliore strategia manageriale da applicare in allevamenti con disturbi riproduttivi (Ronsse et al., 2005), soprattutto per la protezione della cucciolata tramite il passaggio di anticorpi colostrali.

Nauwynck (2010) suggerisce di verificare comunque lo stato sierologico delle cagne in allevamento: in caso di completa negatività, l'allevatore dovrebbe tenere CHV-1 lontano attuando corrette misure di biosicurezza oppure vaccinare preventivamente. Quando tutti gli animali sono altamente sieropositivi la vaccinazione può essere discutibile, ma in allevamenti con presenza simultanea di cagne positive e negative la vaccinazione su queste ultime è altamente consigliata: la riattivazione del virus latente o il contagio attraverso i portatori asintomatici possono provocare gravi perdite nelle cucciolate.

### *2.1.7 Altri virus*

Sebbene la capacità di causare infezioni transplacentari sia una caratteristica dei parvovirus, il ruolo del Parvovirus canino tipo-2 (CPV-2) nelle performance riproduttive della cagna gravida appare meno rilevante rispetto alle altre specie. Vi sono ipotesi contrastanti: uno studio ha dimostrato un calo dell'efficienza riproduttiva dopo introduzione del CPV-2 in un allevamento (Gooding e Robinson, 1982), mentre Meunier et al. (1981) riportano che non vi è stato nessun cambiamento sulla fertilità (tasso di concepimento, tasso dei nati vivi, dimensioni cucciolate, numero dei cuccioli svezzati) con lo stabilirsi del virus nella popolazione canina. Nonostante l'infezione sperimentale

con CPV-2 in utero sia stata associata a miocardite (Lenghaus et al., 1980), l'infezione e la patologia naturale sono più rare nella cagna che in altre specie (Johnston et al., 2001).

Anche Parvovirus canino tipo-1 (CPV-1) sembra possa causare morte fetale: in cagne sottoposte ad inoculazione virale nella prima metà della gravidanza si è osservato riassorbimento (Carmichael et al., 1991). Non vi sono studi certi sulla trasmissione naturale, ma in animali infettati sperimentalmente per via oronasale è stato dimostrato riassorbimento o, nel caso di induzione della patologia nella seconda metà di gravidanza, aborto e natimortalità (i cuccioli morti presentavano anasarca, consolidazione polmonare, polmonite non suppurativa, vasculite polmonare e miocardite) (Harrison et al., 1992).

Il virus del cimurro canino (CDV), un morbillivirus, può attraversare la placenta e provocare aborto o anomalie congenite, come malformazioni neurologiche (Krakowka et al., 1977; Greene e Appel, 1998). L'aborto può conseguire all'infezione diretta nella placenta, oppure ai gravi effetti sistemici del CDV sulla madre.

## ***2.2 Malattie parassitarie***

### *2.2.1 Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* infetta molte specie animali, tra cui i cani (anche se l'ospite definitivo è il gatto). La trasmissione può avvenire per via congenita o tramite ingestione di tessuti infetti e acqua/cibo contaminati con oocisti. Per questo motivo è importante attuare una corretta prevenzione evitando che gli animali possano avere accesso a queste fonti (Johnston et al., 2001).

Le informazioni relative alla trasmissione transplacentare del protozoo nella specie canina non sono ancora molte (Johnston et al., 2001): Dubey e Lappin (1998) e Pretzer (2008) affermano che la toxoplasmosi può causare placentite e disseminazione dei tachizoiti nei feti, come dimostrato dopo inoculazione sperimentale in cagne gravide seguita da malessere (depressione, anoressia, diarrea, scolo nasale) ed espulsione di cuccioli infetti morti poco dopo (Chamberlain et al., 1953).

La diagnosi si effettua mediante esame istologico ed evidenziazione delle cisti protozoarie nei tessuti fetali.

### *2.2.2 Neospora caninum*

Sebbene non sia ancora chiaro il ruolo di *Neospora caninum* come causa di morte fetale tramite infezione naturale, è stato dimostrato che il parassita può essere trasmesso per via transplacentare nel cane, comportando mummificazione, riassorbimento, natimortalità, nascita di cuccioli con gravi malformazioni (Dubey e Lindsay, 1989; Dubey et al., 1990; Cole et al., 1995) o semplicemente

sieropositivi (Barber e Trees, 1998). Non è stato ancora osservato l'aborto (Givens e Marley, 2008). La diagnosi si basa sull'esame istologico, immunistoichimico, sulla PCR applicata a materiale biotico o necroscopico (Dubey et al., 2007). È ancora incerto il ruolo di *N. caninum* quale agente zoonotico (Pretzer, 2008).

### 2.2.3 *Leishmania*

Si segnala il caso di un aborto causato da Leishmaniosi: non sono stati notati sintomi clinici prima dell'aborto, e successivamente è stato osservato solo scolo vulvare di colore verde-rossastro. L'esame post-mortem ha evidenziato la presenza di lesioni necrotiche placentari colonizzate da *L. infantum*, e la cagna aveva anticorpi contro il parassita (Dubey et al., 2005).

Recentemente è stata dimostrata la trasmissione verticale di *L. infantum* da una madre infetta per via naturale alla cucciolata (Boggiatto et al., 2011).

## 2.3 *Farmaci*

La somministrazione di farmaci in gravidanza dovrebbe essere evitata, in quanto per molti principi attivi non esistono ancora informazioni certe sulla sicurezza per il feto (Johnston et al., 2001).

Durante la gestazione avvengono molti cambiamenti fisiologici nell'organismo materno che influiscono sulla tossicità dei farmaci (Papich, 1989): per esempio, le modificazioni relative all'albumina sierica potrebbero alterare il volume di distribuzione di un farmaco che ha un elevato legame proteico; oppure i cambiamenti dell'output cardiaco, del flusso sanguigno renale e della filtrazione glomerulare potrebbero ridurre l'escrezione renale. Per questo motivo, prima di effettuare qualsiasi trattamento si dovrebbero aggiustare le dosi, e successivamente è necessario monitorare la cagna per verificare che non si manifestino episodi di tossicità.

Naturalmente l'attenzione va posta anche nei confronti del feto: effetti embriotossici o teratogeni potrebbero comportare riassorbimento/aborto o malformazioni congenite. Il periodo critico per l'embriotossicità è dai 6 ai 20 giorni dopo il picco di LH, in quanto l'embrione è ancora immerso nel "latte uterino", che raggiunge concentrazioni del farmaco simili a quelle dei fluidi materni extracellulari (Papich, 1989). Una volta che si è formata la placenta, i prodotti somministrati alla madre possono attraversarla e raggiungere il feto: ciò dipende dal periodo di gestazione, dal flusso sanguigno placentare, dalla metabolizzazione farmacologica placentare, dalla dimensione, dose, solubilità lipidica e durata dell'esposizione del farmaco, dalla differenza di pH materno/fetale, dalla differenza di legame proteico del prodotto materno/fetale, dalla specie animale. Farmaci somministrati in gravidanza avanzata possono comportare malformazioni interne o esterne, in particolare nel sistema nervoso centrale o in quello cardiovascolare (Feldman e Nelson, 2004). In

ogni caso, anche se la sostanza raggiunge il feto non è detto che sia in grado di provocare effetti tossici: nel corso degli anni molte cagne gravide sono state trattate con numerosi farmaci, ma vi sono poche segnalazioni pubblicate di effetti teratogeni (Johnston et al., 2001). Papich (1989) ha individuato delle classi di sicurezza con cui classificare i farmaci: alla classe A appartengono quelli teoricamente non pericolosi, ma per i quali potrebbero non esistere studi specifici; alla classe B quelli da usare con maggior cautela, in quanto sperimentalmente è stato dimostrato un basso rischio; alla classe C quelli da utilizzare solamente nel caso in cui il beneficio ricavato dalla somministrazione superi di gran lunga la reale possibilità di sviluppare tossicità; infine, alla classe D quelli controindicati in gravidanza, poiché si è certi della capacità di causare malformazioni. Ci sono, comunque, poche informazioni sulla sicurezza farmacologica in cagne gravide; la maggior parte dei dati sono stati presi da altre specie (Gobello e Corrada, 2002).

I farmaci più utilizzati in cagne gravide sono: gli anestetici ed i sedativi durante il parto cesareo, alcuni dei quali (ketamina, oppiacei, diazepam, clopromazina) sono responsabili di depressione fetale; i corticosteroidi, che inducono aborto e causano palatoschisi; gli antinfiammatori non-steroidi, associati ad ipertensione polmonare, gestazione prolungata, eccessivo sanguinamento; gli antibiotici, tra i quali si ricorda che le tetracicline possono provocare anomalie dentali, la streptomina sordità, il cloramfenicolo morte fetale, i sulfamidici atrofia epatica, i fluorochinoloni alterazioni cartilaginee (Feldman e Nelson, 2004).

<b>SICURI</b>	<b>SICURI SE USATI CON CAUTELA</b>	<b>RISCHIO</b>	<b>CONTROINDICATI</b>
Amoxicillina		Amikacina	
Ampicillina	Atropina	Aspirina	
Cefalosporine	Diazepam	Amitraz	
Acido clavulanico	Dopamina	Cloramfenicolo	Ciprofloxacina
Clindamicina	Furosemide	Cortisone	Dietilsilbestrolo
Eritromicina	Ketoconazolo	Desametasone	Estradiolo cipionato
Fenbendazolo	Metoclopramide	Flunixin meglumine	Griseofulvina
Ivermectina	Ranitidina	Gentamicina	Ossitetraciclina
Lincomicina	Teofillina	Ibuprofene	Streptomina
Neomicina	Tiroxina	Metronidazolo	Testosterone
Piperazina	Trimetoprim	Fenilbutazone	Tetraciclina
Praziquantel		Prednisolone	
Pirantel			

Tabella 17- Alcuni farmaci classificati a seconda della loro sicurezza nelle cagne durante la gravidanza (Johnston e Raksil, 1987)

## ***2.4 Patologie endocrine materne***

### ***2.4.1 Iperadrenocorticismo-ipoadrenocorticismo***

Iperadrenocorticismo ed ipoadrenocorticismo sono endocrinopatie che possono alterare la crescita embrionale e fetale nella donna (Murakami et al., 1998). Esiste il sospetto, non confermato da studi scientifici a prova di questo, che l'iper e l'ipoadrenocorticismo causino aborto o riassorbimento anche nel cane (Johnston et al., 2001).

### ***2.4.2 Insufficienza luteinica***

Il mantenimento della gravidanza nelle cagne dipende dalla concentrazione del progesterone, che deve essere superiore a 1-2 ng/ml: l'ormone è prodotto dai corpi lutei, la cui funzionalità nella prima metà della gravidanza non dipende dalla secrezione degli ormoni ipofisari, mentre nella seconda metà i prodotti luteotrofici prodotti dalla ghiandola pituitaria, come prolattina ed LH, sono necessari per l'attività luteinica (Okkens et al., 1986; Okkens et al., 1990; Onclin e Verstegen, 1997; Onclin et al., 2000).

Dato che l'aborto è accompagnato da concentrazioni di progesterone inferiori a quelle necessarie per mantenere la gravidanza, alcuni autori suggeriscono che il riassorbimento, l'aborto o la nascita prematura osservati in alcune cagne possono essere il risultato di una inadeguata produzione di progesterone da parte del tessuto luteinico (Purswell, 1992; Hayer, 1997; Estill, 1998; Von Root Kustritz, 2002). I casi segnalati, però, non possono ritenersi valide prove a favore di questa teoria, in quanto in questi studi non è stato misurato frequentemente il progesterone sierico, oppure il dosaggio è stato effettuato con kit ELISA (semi-quantitativi), o ancora la somministrazione ormonale suppletiva ha interferito con i test. Görlinger et al. (2005) riportano, invece, un caso di sospetta insufficienza luteinica, confermando l'ipotesi diagnostica tramite regolari dosaggi ormonali sierici eseguiti con metodica RIA nei quali non interferiva la supplementazione con medrossiprogesterone acetato (0,1 mg/kg al giorno): il livello di progesterone endogeno ha iniziato a calare a partire dal 26° giorno dopo l'accoppiamento.

L'insufficienza luteinica può essere la spiegazione in caso di morte fetale senza riconoscimento di altre cause, oppure quando una cagna, che ha precedentemente avuto perdite del prodotto del concepimento, porta a termine la gravidanza tramite supplementazione esogena di progesterone (Johnston et al., 2001). Alcuni autori suggeriscono che tale disturbo endocrino sia collegato ad intervalli interestrili brevi, e che vi possa essere alla base una ereditarietà genetica (Günzel-Apel et al., 2006). È necessaria cautela nel diagnosticare insufficienza luteinica, poiché il calo del progesterone e la lisi dei corpi lutei sono la risposta fisiologica ad infezioni uterine; la

somministrazione di progesterone per il mantenimento della gravidanza in cagne affette da placentite o da endometrite può esitare in distocia, piometra o setticemia.

Se una cagna ha una storia di sospetta insufficienza luteinica, dovrebbero essere raccolti campioni di sangue per effettuare dosaggio del progesterone ogni settimana: qualora l'ormone scendesse sotto i 10 ng/ml, i test dovrebbero essere effettuati ogni 2-4 giorni, e poi eventualmente iniziata la terapia ormonale (Gobello e Corrada, 2002). L'integrazione ormonale può essere fornita mediante progesterone in veicolo oleoso (2-3 mg/kg per via intramuscolare ogni 1-2 giorni) fino ad una settimana prima del previsto parto (Hashimoto et al., 1982): il progesterone cala sotto i 2 ng/ml 48-72 ore dopo l'ultima iniezione (Scott-Moncrieff et al., 1990). In alternativa, il 17- $\alpha$ -etil-19-nortestosterone (1 mg/kg sottocute ogni giorno) è stato utilizzato con successo per il mantenimento della gravidanza in cagne ovariectomizzate (Steinetz et al., 1989). Eilts et al. (1994) hanno somministrato un progestinico orale (allitrenbolone) a cagne gravide ovariectomizzate (0,088 mg/kg ogni giorno): una delle tre ha avuto un parto distocico con morte dell'intera cucciolata e nessuna delle tre ha prodotto latte normalmente dopo il parto; in questo lavoro si presuppone che la secrezione di prolattina sia stata soppressa a causa del farmaco. Anche il megestrolo acetato (0,1 mg/kg per via orale ogni giorno) è considerato come una valida opzione per il trattamento dell'insufficienza luteinica (Verstegen, 2001). È importante considerare che la terapia con progestinici può comportare mascolinizzazione dei feti femmina e criptorchidismo nei maschi (Ettinger e Feldman, 2008; Verstegen et al., 2008).

#### *2.4.3 Ipotiroidismo*

Non è ancora del tutto noto se l'ipotiroidismo possa causare infertilità o morte fetale nella specie canina (Johnston et al., 2001) Ulteriori informazioni sulla patologia sono riportate nel paragrafo 1.3.1- anestro persistente primario.

#### *2.4.4 Diabete mellito*

Durante la gravidanza la richiesta di insulina è più elevata rispetto al normale; poiché questo fenomeno si verifica anche durante il diestro, si ritiene che il progesterone sia implicato nell'alterazione del metabolismo glucidico: il progesterone stimola la secrezione dell'ormone della crescita, che agisce come insulino-antagonista (Eigenmann, 1981). Per questo motivo la regolazione della glicemia delle cagne diabetiche durante la gravidanza risulta più difficile (Johnston et al., 2001). Questi animali abortiscono frequentemente, a causa degli effetti dell'iperglicemia cronica. I cambiamenti vascolari relativi al diabete possono danneggiare i vasi sanguigni placentari, contribuendo alla morte fetale o provocando una riduzione dell'apporto sanguigno con conseguente

scarso sviluppo dei feti (Feldman e Nelson, 2004). Al contrario, è stata anche osservata macrosomia fetale e predisposizione alla distocia in cuccioli nati da cagne diabetiche, probabilmente come risultato dell'incremento della produzione di insulina da parte del tessuto pancreatico fetale in risposta all'eccessiva disponibilità di glucosio della madre (Johnson, 1986); questi neonati saranno predisposti all'ipoglicemia per diverse settimane. L'ovarioisterectomia è fortemente raccomandata per tutte le cagne nelle quali è diagnosticato il diabete mellito.

#### *2.4.5 Tossiemia da gravidanza*

La tossiemia da gravidanza che si verifica nelle ultime settimane di gestazione è associata ad una mancanza di carboidrati (cibo carente oppure impossibilità ad assumerne la dose necessaria), o ad un'alterazione del loro metabolismo. È stato dimostrato (Romsos et al., 1981) che madri affette da questa patologia partoriscono un numero inferiore di cuccioli vivi.

Sebbene possa colpire tutte le razze, si osserva soprattutto negli Yorkshire Terrier e nei Labrador Retriever (Johnston et al., 2001). I fattori che predispongono allo sviluppo della patologia sono: forma fisica carente durante la gravidanza, malnutrizione, cibo ricco di lipidi ma povero di carboidrati e cucciolate molto numerose (Debraekeleer et al., 2010; Johnston et al., 2001).

La diagnosi si basa sulla presenza di un elevato livello di chetoni nelle urine; spesso è riscontrata anche ipoglicemia (Johnston et al., 2001).

Il trattamento, qualora la patologia venisse riconosciuta precocemente, si basa sulla somministrazione intravenosa di un bolo con una soluzione al 20-50% di glucosio, che può essere seguita da un'infusione intravenosa di una soluzione al 5% di glucosio al dosaggio di 2 ml/kg/ora. Durante, o subito dopo l'infusione, l'animale dovrebbe essere nutrito con un alimento appetibile, altamente digeribile, ricco di carboidrati, proteine e calorie (Debraekeleer et al., 2010). Se le cagne sono gravemente compromesse, potrebbe essere necessario interrompere la gravidanza per diminuire la richiesta di energia e salvare la fattrice (Johnston et al., 2001).

### **2.5 Altre cause**

Qualsiasi causa responsabile di stress materno o danno all'utero o al feto può esitare in morte del prodotto del concepimento (Feldman e Nelson, 2004; Verstegen et al., 2008). Per questo motivo alcune patologie materne gravemente debilitanti o una scadente forma fisica non sono compatibili con una gravidanza: queste situazioni, comunque, sono più facilmente responsabili di un mancato concepimento rispetto a perdite embrionali e fetali (Verstegen et al., 2008).

Anomalie uterine, talvolta senza sintomatologia clinica, comportano incapacità a sostenere una gravidanza; se presenti prima dell'accoppiamento, sono responsabili di mancato impianto. Tra

queste, si ricorda l'iperplasia cistica endometriale, le infezioni uterine o le neoplasie (Feldman e Nelson, 2004; Verstegen et al., 2008).

Meno comuni come possibili fattori implicati in morte embrionale/fetale sono la scorretta nutrizione ed i traumi, sebbene qualsiasi trauma all'addome può potenzialmente danneggiare l'utero o il feto, provocando aborto (Feldman e Nelson, 2004). La rottura dell'utero è molto rara: se la circolazione fetale non viene compromessa, questa condizione può passare inosservata fino a quando esita in una distocia dal momento che i feti non riescono ad entrare nel canale del parto (Johnston et al., 2001). Altre volte dopo la rottura dell'utero i feti vengono espulsi in cavità peritoneale, dove possono essere riassorbiti se la calcificazione non è ancora avvenuta, oppure andare incontro a mummificazione.

Come nella specie umana, alcune anomalie cromosomiche (ad es. mosaicismo, aneuploidia, riarrangiamenti cromosomici) sono associate a riassorbimento, aborto, natimortalità o mummificazione nella specie canina (Sandusky e Cho, 1984; Johnston et al., 1989; Herzog e Hohn, 1972). Più di 400 patologie genetiche sono state descritte in cani nati e sopravvissuti (Smith, 1994), e questo ci permette di credere che solo le anomalie più gravi siano responsabili di morte embrionale/fetale. L'inbreeding contribuisce alle ridotte performance riproduttive (Fox, 1963; Wildt et al., 1982) poiché aumenta le possibilità di anomalie genetiche.

Infine, va ricordato che nella specie umana alcuni aborti inspiegabili sono connessi a fattori immunitari (Orvieto et al., 1991). Ad esempio, il lupus eritematoso sistemico è ritenuto essere causa di aborti spontanei o parti prematuri con morte neonatale. Nella specie canina non è noto il ruolo di fattori immunologici (Johnston et al., 2001).

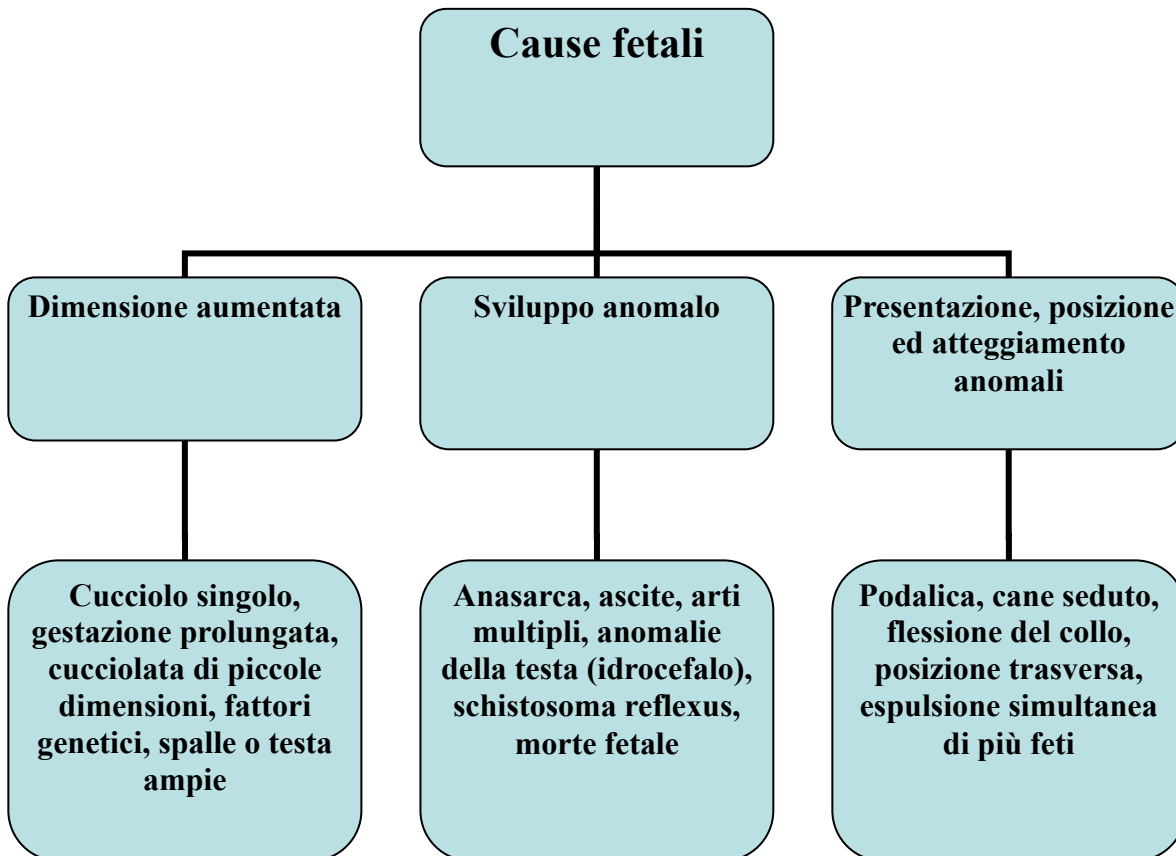
<b>AGENTE EZIOLOGICO</b>	<b>CARATTERISTICHE CLINICHE</b>	<b>TEST DIAGNOSTICO</b>
Brucellosi	Aborto tardivo	Coltura (scolo vulvare e sangue) o sierologia
Salmonellosi	Patologia sistemica; scolo vulvare purulento	Coltura (scolo vulvare e tessuti fetali)
Campylobacter	Diarrea	Coltura (scolo vulvare e tessuti fetali)
E. coli	Scolo vulvare purulento	Coltura (scolo vulvare e tessuti fetali)
Streptococchi	Patologia sistemica	Coltura (scolo vulvare e tessuti fetali)
Herpesvirus canino	Cani portatori asintomatici; vescicole vaginali; natimortalità e mortalità neonatale; infertilità; patologia respiratoria	Sierologia
Micoplasmi ed Ureaplasmi	Cagne asintomatiche; scolo vulvare; infertilità	Coltura (scolo vulvare e tessuti fetali)
Toxoplasma gondii	Cagne asintomatiche; coinvolgimento sistemico	Sierologia
Insufficienza luteinica	Riassorbimento/aborto ?	Dosaggio del progesterone durante la fase luteinica
Ipotiroidismo	Obesità; letargia; alopecia simmetrica; infertilità e aborto ?	Test di stimolazione con TSH; dosaggio ormoni tiroidei
Patologie uterine	Cagne asintomatiche; infertilità; scolo vulvare; aborto	Esame ecografico; istopatologia
Farmaci		Anamnesi
Cause genetiche		Cariotipizzazione
Carenze nutrizionali		Anamnesi; test di supplementazione nutrizionale
Traumi		Anamnesi

Tabella 18- Alcune cause di aborto, relative caratteristiche cliniche e test diagnostici (adattato da Feldman e Nelson, 2004; Gobello e Corrada, 2002)

### 3 DISTOCIA

La distocia è definita come la difficoltà o l'incapacità di espellere la cucciolata attraverso il canale del parto (Feldman e Nelson, 2004). Ci sono molti fattori materni e fetali che contribuiscono alla distocia canina, spesso concomitanti (Bennett, 1980) (vedi figura 16 e tabella 19).

L'esatta incidenza del fenomeno non è nota: pare sia inferiore al 5% (Linde-Forsberg e Persson, 2007), ma può arrivare fino al 100% in alcune razze (in particolare quelle brachicefale), predisponendo le cucciolate a parti prolungati, ipossia e natimortalità (Eneroth et al., 2000; Gill, 2002; Ettinger e Feldman, 2008; Bergström et al., 2006). Münnich e Küchenmeister (2009) riportano una durata media della fase espulsiva in cucciolate normali di circa 5,5 ore contro le 10 ore in parti con cuccioli morti ed ipossici.



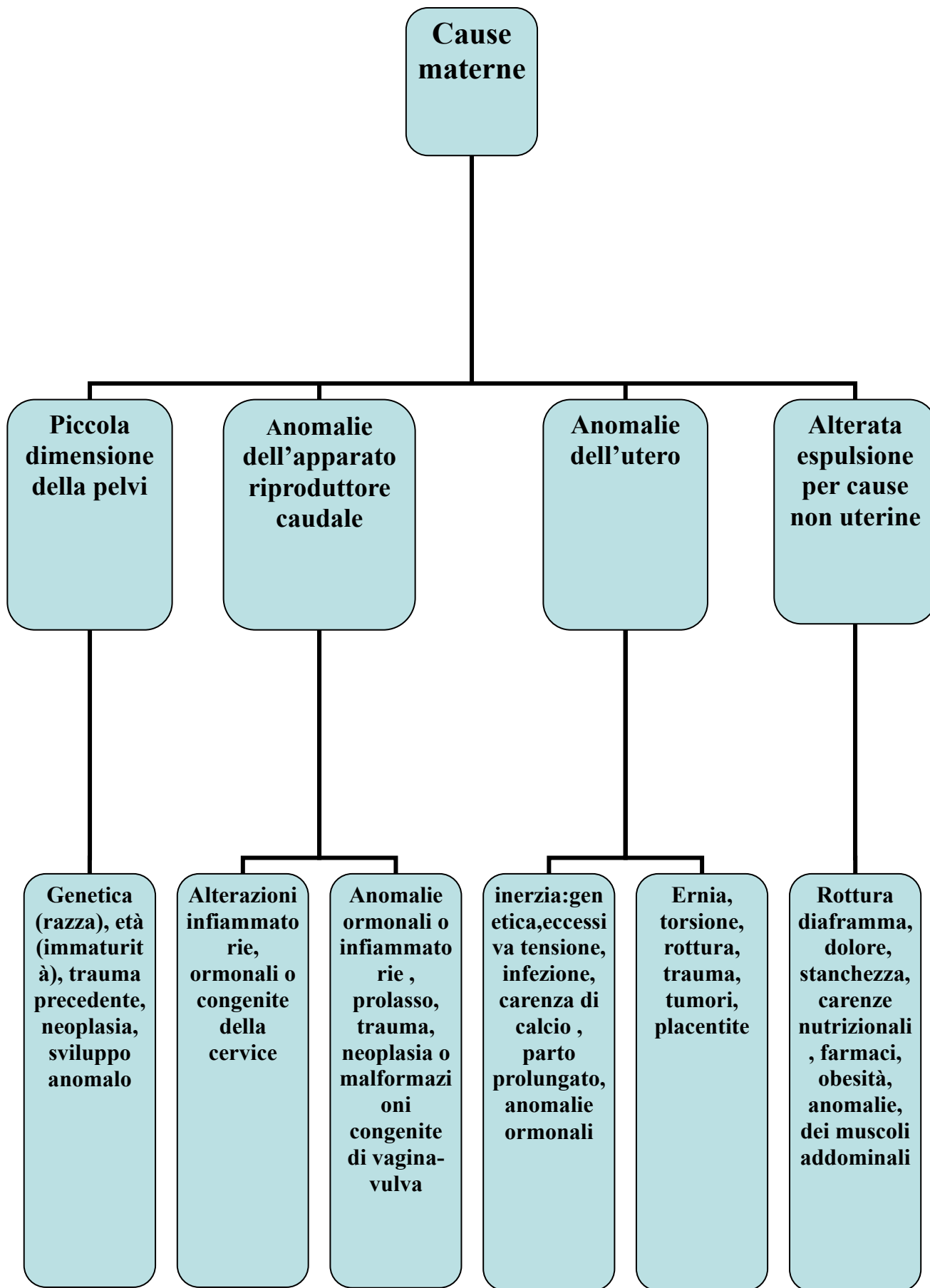


Figura 16 - Cause materne e fetali di distocia (adattato da Johnston et al., 2001)

	<b>FREQUENZA NELLE CAGNE CON DISTOCIA (%)</b>
<b>CAUSE MATERNE</b>	75,3
Inerzia primaria completa	48,9
Inerzia primaria parziale	23,1
Canale del parto troppo stretto	1,1
Torsione uterina	1,1
Prolasso uterino	-
Idrallantoide	0,5
<b>CAUSE FETALI</b>	24,7
Malpresentazione	15,4
Malformazioni	1,6
Dimensione fetale aumentata	6,6
Morte fetale	1,1

Tabella 19– *Alcune cause di distocia nella cagna con relativa incidenza* (Linde-Forsberg e Eneroth, 1998)

L'inerzia uterina primaria è caratterizzata da canale del parto normale e presentazione e dimensione del feto normali, ma le contrazioni uterine non sono sufficienti a permettere l'espulsione della cucciolata. Può essere completa, quando nessun feto viene espulso, o incompleta, nel qual caso una parte della cucciolata viene espulsa ma le contrazioni uterine si riducono prima che il parto sia terminato. Sebbene la causa dell'inerzia uterina primaria non sia ancora del tutto nota, si presuppone sia multifattoriale, con coinvolgimento di fattori meccanici, ormonali, fisici e genetici (Jones e Joshua, 1988).

Nell'inerzia uterina secondaria le contrazioni sono presenti, ma la difficoltà è causata da altri fattori: il feto potrebbe essere troppo grande, come si è osservato in cagne con un solo cucciolo (Bennett, 1980), o potrebbe essere cresciuto oltre i limiti del canale del parto, come avviene nelle gestazioni prolungate. L'inerzia secondaria può anche essere presente in caso di feto normale ma canale del parto ristretto, sia per cause congenite (razza, difetti anatomici quali restringimenti vaginali) sia per cause acquisite (fratture della pelvi, neoplasie vaginali).

Presentazione, posizione ed atteggiamento dei cuccioli al momento del parto possono predisporre alla distocia (Johnston et al., 2001). La presentazione craniale si riscontra nel 60% dei parti normali, il rimanente 40% dei cuccioli è nato con presentazione caudale; quest'ultima è considerata normale, anche se si ipotizza che possa causare prolungamento del primo stadio del parto (contrazioni uterine e dilatazione della cervice), poiché il mancato posizionamento della testa fetale nel canale del parto

può diminuire la stimolazione uterina (Roberts, 1986). Anche la posizione trasversa spesso esita in ostruzione del canale (Darvelid e Linde-Forsberg, 1994). Altre presentazioni e atteggiamenti responsabili di distocia sono: presentazione caudale con arti posteriori estesi sotto il corpo, presentazione craniale con arti anteriori estesi sotto il corpo, deviazione laterale o ventrale della testa (Johnston et al., 2001).

La razza è un fattore importante che influenza la probabilità di distocia: razze brachicefale (ad es. Bulldog, Carlini, Boxer) tipicamente hanno pelvi ristretta e testa/spalle larghe, quindi sono predisposte all'inerzia uterina secondaria (Johnston et al., 2001). Per questo motivo, spesso gli allevatori pianificano un cesareo. Cagne di taglia piccola hanno più probabilità di avere un solo cucciolo (che comporta inerzia uterina secondaria) ed inoltre sono spesso più nervose ed apprensive (inerzia uterina primaria), quindi mostrano un'incidenza più elevata rispetto a quelle grandi (Münnich e Küchenmeister, 2009). Nelle razze di taglia grande occasionalmente le cucciolate sono molto numerose: in questo caso un'inerzia uterina secondaria può essere il risultato della fatica o della sovradistensione dell'utero (Feldman e Nelson, 2004).

E' importante innanzitutto, in caso di sospetta distocia, confermare che la gravidanza sia presente e che il parto non stia effettivamente procedendo normalmente, successivamente cercare di individuarne la causa e di evidenziare l'eventuale compromissione materna e fetale (Johnston et al., 2001). Per fare ciò sono necessarie un'anamnesi completa (storia riproduttiva, compresi eventuali precedenti parti distocici visto il coinvolgimento della componente genetica, e stato attuale) ed una visita, accompagnata qualora possibile da esame radiografico (utile per determinare la situazione dei feti e della pelvi) o ecografico (per monitorare la vitalità fetale tramite l'osservazione di un'eventuale bradicardia, poiché sotto i 130 battiti/minuto il feto necessita di essere espulso in 2-3 ore, e sotto i 100 battiti/minuto immediatamente) ed esame emocromo-biochimico e delle urine.

La diagnosi si basa principalmente sull'osservazione da parte dell'allevatore di (Schweizer e Meyers-Wallen, 2000):

- 20-30 minuti di forti contrazioni addominali senza espulsione di alcun cucciolo
- dopo espulsione di uno o più cuccioli, passano più di 4-6 ore senza altre nascite in cagne con altri feti in utero presenti
- la cagna non partorisce 24-36 ore dopo che la temperatura rettale è scesa di circa 1°C
- la cagna vocalizza e si lecca insistentemente la vulva durante il parto
- la cagna non espelle i cuccioli dopo 8-12 ore dall'inizio del primo stadio del parto
- la cagna ha una gestazione prolungata oltre la data prevista del parto (61-64 giorni dall'ovulazione)

La gestazione prolungata, in realtà, deve essere valutata con attenzione: spesso il parametro usato dagli allevatori per predire la data del parto è il giorno dell'accoppiamento, ma la lunghezza della gestazione canina può variare molto (da 57 a 72 giorni dal momento dell'accoppiamento). È importante, quindi, aver individuato il primo giorno di diestro citologico, poiché la gravidanza dura 57-58 giorni a partire da questo (Feldman e Nelson, 2004). In ogni caso, è stata discussa da vari ricercatori la possibilità che la dimensione della cucciolata possa influire sulla lunghezza della gestazione, dal momento che pochi feti potrebbero non fornire l'adeguata stimolazione per l'inizio del parto (Darvelid e Linde-Forsberg, 1994; Gaudet, 1985).

Il trattamento può essere manipolativo, medico o chirurgico. Il primo corrisponde all'estrazione di feti malposizionati o lievemente più grandi del normale, ma gli strumenti necessari (quali l'uncino di Hook o forcipi) sono spesso responsabili di danni sui cuccioli o traumi ai tessuti materni, quindi il loro utilizzo è sconsigliato se non per estrarre un feto già morto. Infatti, forcipi applicati alla testa del feto potrebbero provocare rottura del cranio, oppure un'eccessiva torsione può esitare nella dislocazione delle vertebre, o ancora una trazione effettuata sulla sola coda o su un arto può comportare strappamento di questi (Johnston et al., 2001). È consigliabile ricorrere, piuttosto, a lubrificazione e leggera trazione manuale con l'aiuto di una garza per mantenere la presa sui feti (Feldman e Nelson, 2004). Il trattamento medico è utile in caso di inerzia uterina primaria, ma bisogna essere certi che non siano presenti ostruzioni, o il rischio è di stimolare contrazioni che comportino rottura uterina o morte fetale (Feldman e Nelson, 2004). Il trattamento medico consiste nell'iniezione intramuscolare di ossitocina (0,5-2 IU) per aumentare la frequenza delle contrazioni uterine, da ripetersi più volte ogni 30-40 minuti se non si osserva risposta (Pretzer, 2008a). La seconda dose di ossitocina può essere preceduta da infusione intravenosa lenta di gluconato di calcio (2-10 ml in soluzione al 10%) controllando l'eventuale aritmia cardiaca, poiché il calcio aumenta la forza delle contrazioni (Davidson, 1998). La terza dose di ossitocina può essere accompagnata, soprattutto in cagne con diagnosi di ipoglicemia, da infusione intravenosa lenta di destrosio (5-10 ml in soluzione al 50%). In cagne nervose può essere utile somministrare tranquillanti, quale l'acepromazina (Feldman e Nelson, 2004), prestando attenzione alla possibile depressione fetale conseguente. In caso di mancata espulsione dei feti anche dopo trattamento medico, salute della madre fortemente compromessa (setticemia), presenza di feti morti in utero è necessario ricorrere al cesareo: un pronto intervento è fondamentale per minimizzare la morte dei cuccioli (Johnston et al., 2001).

#### 4 MORTALITA' PERINATALE

La morte dei cuccioli è un problema diffuso e spesso inevitabile negli allevamenti canini (Münnich, 2008). La morte può avvenire in utero, durante l'espulsione, dopo la nascita, nelle prime settimane di vita o dopo lo svezzamento. In particolare, il tasso di natimortalità è riportato essere tra 5% e 33% (Moon et al., 2001; Carmichael, 1999; Indrebo et al., 2007); anche la mortalità neonatale (periodo che comprende le prime 2-3 settimane di vita) è variabile, tra 9% e 26% (Davidson, 2003), ed è comunque maggiore nelle prime ore e nei primi giorni di vita (mortalità perinatale). Indrebo et al. (2007) riportano una mortalità neonatale pari al 7%, ma sottolineano il fatto che questo valore possa essere inferiore rispetto ad altri studi poiché in Norvegia, paese indagato dagli autori, l'Herpesvirus è rara.

Il periodo perinatale è critico per il cane, specie che nasce meno matura rispetto ad altre (Münnich, 2008); i cuccioli nascono quindi ancora esclusivamente dipendenti dalla madre e solo nelle settimane successive iniziano gradualmente a svilupparsi e a diventare autonomi. È perciò possibile attribuire la mortalità perinatale a diversi fattori: materni, in quanto dipendenti da ciò che avviene nella vita intrauterina, durante il parto o dovuti a disturbi della cagna nell'immediato postpartum; fetali, in quanto patologie congenite che si sviluppano nel periodo fetale possono esitare nella morte durante il parto o nell'immediato postpartum; ambientali, poiché parte dei disturbi riproduttivi che si sviluppano dipendono anche dal management di allevamento e dalla gestione dell'igiene, temperatura e umidità delle sale parto.

Vi sono molte cause infettive e non infettive responsabili di morte precoce della cucciolata; la maggior parte dei fattori non infettivi predispongono comunque i neonati a patologie infettive (Farstad, 2003).

La frequenza dei neonati morti dopo il parto risulta meno frequente nelle cucciolate poco numerose rispetto a quelle più numerose (vedi tabella 20).

<b>NUMERO DI NATI PER CUCCIOLATA</b>	<b>NUMERO DI CUCCIOLATE</b>	<b>MORTALITA' PRENATALE (%)</b>	<b>MORTALITA' POSTNATALE (%)</b>	<b>PERDITA MEDIA CUCCIOLATA</b>
1-7	41	4,7	24,9	1,41
8-13	52	4,6	38,6	3,56

Tabella 20- *Tasso di mortalità in relazione al numero di nati per cucciolata* (Christiansen, 1984)

#### **4.1 Ipotermia, ipoglicemia, disidratazione e patologie connesse**

La sindrome di ipotermia/ipoglicemia/disidratazione è la patologia più comunemente osservata nei neonati, soprattutto se orfani. Queste tre condizioni sono correlate tra loro: ognuna può essere la causa o la conseguenza delle altre due (Debraekeleer et al., 2010).

Le prime ore sono le più critiche: la temperatura dei neonati può scendere di 4-5°C immediatamente dopo il parto, ed inoltre i cuccioli perdono circa 0,5 g ogni 30 minuti in cui dormono senza mangiare (Debraekeleer et al., 2010). Nei neonati non è presente il riflesso dei brividi ed i meccanismi di vasocostrizione non sono completamente attivi; inoltre, la copertura di grasso sottocutaneo, fondamentale per la termogenesi, è estremamente scarsa (Johnston et al., 2001). Dalla seconda settimana di vita i cuccioli iniziano gradualmente la termoregolazione autonoma: la temperatura rettale passa da 35°C-37°C a 36°C-37,8°C (Johnston et al., 2001). Per questi motivi, è vitale per i cuccioli mangiare ed essere tenuti a contatto con la madre, in modo da garantire il mantenimento della temperatura corporea ad almeno 36°C (vedi tabella 21) (Davidson, 2003). Qualora ciò non fosse sufficiente, è possibile ricorrere all'utilizzo di coperte, bottiglie di acqua calda, lampade ad infrarossi (vedi figura 17), tappetini elettrici impermeabili, incubatrici nello specifico caso degli orfani, ma i neonati devono poter essere in grado di allontanarsi dalla fonte di calore per evitare scottature e disidratazione (Macintire, 2001).

Il trattamento in caso di animali ipotermici richiede un aumento graduale della temperatura, poiché un riscaldamento rapido ed aggressivo può compromettere l'integrità vascolare ed aggravare le perdite di fluidi (disidratazione); è consigliata la somministrazione sottocutanea di una soluzione al 5% di glucosio, necessaria a soddisfare l'improvviso aumento del fabbisogno energetico dovuto al riscaldamento (Debraekeleer et al., 2010).

Il controllo ambientale dovrebbe prevedere anche un'adeguata umidità, per evitare che le mucose dei cuccioli divengano troppo secche. Mosier (1978a) riporta che l'umidità adeguata per prevenire la disidratazione è di circa 55-65%, e di 85-90% in caso di cuccioli deboli ed immaturi.

<b>ETA' (IN GIORNI)</b>	<b>TEMPERATURA (IN ° C)</b>
0-7	29,5-32,2
8-14	26,5
15-28	26,5
29-35	21-24
35+	21

Tabella 21- Guida per il mantenimento della temperatura ambientale in cuccioli orfani (Monson, 1987)



Figura 17– *Lampada ad infrarossi utilizzata per scaldare i neonati*

Le normali funzioni fisiologiche vengono compromesse quando un cucciolo diventa ipotermico: questa condizione comporta depressione respiratoria, bradicardia, paralisi gastroenterica e di conseguenza mancanza della poppata, disidratazione ed ipoglicemia, predisposizione alle infezioni (a causa della diminuzione dell'attività immunitaria), coma, morte (Macintire, 2001; Poffenbarger et al., 1990; Mosier, 1978a). Se un cucciolo ipotermico e con ileo viene forzato a nutrirsi può verificarsi rigurgito e polmonite ab ingestis (Johnston et al., 2001). Le cagne stesse potrebbero non prendersi cura dei cuccioli con bassa temperatura cutanea, allontanandoli e non rispondendo ai loro pianti (Mosier, 1978a).

Il digiuno può comportare ipoglicemia nei cuccioli, dal momento che essi hanno poche riserve di grasso e di glicogeno epatico, ed i meccanismi di gluconeogenesi non sono ancora sviluppati (Hoskins, 1990; Kliegman e Morton, 1987). Anche endotossiemia, sepsi, shunt portosistemici, anomalie dei meccanismi di riserva del glicogeno possono essere responsabili di ipoglicemia, soprattutto se ricorrente anche dopo trattamento (Young et al., 1983). Le razze di taglia piccola possono essere predisposte alla sindrome ipoglicemica, forse a causa delle limitate riserve di energia corporea rispetto al fabbisogno metabolico (Johnson e Atkins, 1980).

Si considera ipoglicemico un neonato con meno di 30 mg/dl di glucosio ematico (Atkins, 1984), ed i sintomi clinici includono letargia, mancanza del riflesso di suzione, depressione o stupore, tremori, nervosismo, irritabilità (Johnston et al., 2001). Qualora il cucciolo fosse ancora in grado di poppare, è preferibile somministrare fluidi ed integrazioni di glucosio per via orale; in caso contrario, è indicata la somministrazione endovenosa di soluzioni al 5-10% di destrosio (0,5-1 g/kg o 2-4 ml/kg di soluzione al 10% di destrosio). Soluzioni a concentrazione più elevata di destrosio dovrebbe essere somministrate solo direttamente sulle mucose, poiché potrebbero causare flebite se applicate

per via endovenosa (Davidson, 2003). Tutti i neonati cui viene somministrato destrosio dovrebbero essere monitorati per il rischio di sviluppare iperglicemia, poiché i meccanismi di regolazione dell'omeostasi glicemica non sono ancora sviluppati.

I neonati sono predisposti anche al fenomeno della disidratazione, poiché il turnover dell'acqua corporea è molto rapido. Lo stato di idratazione non è semplice da valutare: il test del turgore cutaneo non è realizzabile a causa dell'incremento del contenuto di acqua e del ridotto contenuto di grasso. Le mucose dovrebbero essere umide ed iperemiche nei primi 4-7 giorni di vita (pallore delle mucose e tempo di riempimento capillare aumentato sono indice di disidratazione del 12-15%) (Macintire, 2001). In caso di disidratazione, è raccomandata la somministrazione endovenosa di fluidi (1ml/30 g) per 5-10 minuti, fino al miglioramento del tempo di riempimento capillare e del colore delle mucose; successivamente un controllo del paziente è effettuato ogni 30 minuti fino a quando è stabile.

L'eziologia della sindrome da ipotermia/ipoglicemia/disidratazione include, oltre ad uno scorretto controllo ambientale, l'inadeguata produzione di latte/colostro da parte della madre e l'incapacità ad alimentarsi da parte del cucciolo (Debraekeleer et al., 2010). È fondamentale per la sopravvivenza dei cuccioli, infatti, che, dopo una iniziale perdita del peso durante le prime ore di vita, essi crescano costantemente. Il peso dovrebbe aumentare del 10-15% rispetto a quello della nascita ogni giorno (Sheffy, 1978), quindi è necessario che i cuccioli siano pesati regolarmente, anche perché un non aumento o addirittura la diminuzione del peso potrebbe essere un segnale precoce di patologia.

#### *4.1.1 Inadeguata produzione di colostro/latte da parte della madre*

Nelle prime settimane di vita il nutrimento del cucciolo è esclusivamente costituito dal latte materno. In particolare, nelle prime 24 ore di vita la madre fornisce ai neonati l'immunità passiva tramite il colostro (Johnston et al., 2001), fondamentale per la protezione nei confronti delle principali patologie infettive (Herpesvirus canino per i primi giorni di vita, ma anche le infezioni tipicamente più tardive). Durante la vita intrauterina solo il 5-10% degli anticorpi materni è trasferito ai feti attraverso la placenta (Winters, 1981; Tizard, 1996), e il sistema immunitario dei neonati non è ancora funzionale. Il colostro rappresenta la secrezione delle ghiandole mammarie accumulata durante l'ultima parte della gravidanza, e le immunoglobuline in esso contenute (IgG ed IgA) sono velocemente assorbite dai cuccioli nel piccolo intestino poche ore dopo la nascita: l'assorbimento intestinale è diminuito già dopo 12 ore (Bouchard et al., 1992). Il colostro contiene 1500 mg di immunoglobuline/100 ml al parto, ma la concentrazione decresce a meno di 300

mg/100 ml 2 giorni dopo (Heddle e Rowley, 1975). Le sostanze presenti nel latte (linfociti, neutrofili, macrofagi, IgA- resistenti alla digestione gastrica- proteine, fattori di crescita), sebbene non velocemente assorbiti dai cuccioli, continuano a essere un valido supporto alla protezione dalle infezioni fino almeno alle 6 settimane di vita (Johnston et al., 2001). Sebbene il siero di cane adulto possa essere somministrato ai neonati che non ricevono il colostro, i benefici di questo sono difficilmente sostituibili (Poffenbarger et al., 1991; Bouchard et al., 1992).

In presenza di mastite cronica, spesso l'unico sintomo è proprio la mancata crescita dei cuccioli. Se si dimostra la presenza di mastite, i cuccioli dovrebbero essere nutriti con sostitutivi del latte oppure rimanere a poppare dopo aver iniziato un trattamento antibiotico sulla cagna, scelto in base alle caratteristiche di antibioticoresistenza riscontrate e sulla sicurezza dei farmaci per i neonati (Johnston et al., 2001); inoltre, antibiotici in grado di sopprimere le colonie batteriche aerobiche gastroenteriche dei cuccioli comportano una sovraccrescita di batteri potenzialmente patogeni (Poffenbarger et al., 1991a).

Non è ancora del tutto certa l'origine della "sindrome da latte tossico": vi sono sospetti in relazione al fatto che l'eziologia sia riconducibile a mastite cronica, metrite o subinvoluzione dei siti placentari (Mosier, 1978a; Macintire, 2001). In ogni caso, la sindrome comporta gonfiore addominale, diarrea, pianto incessante ed infiammazione rettale; i cuccioli andrebbero rimossi dalla madre e nutriti con sostitutivi del latte.

L'agalassia è definita come l'assenza nella produzione o secrezione di colostro e latte per la cucciolata; nel caso di agalassia primaria (dovuta ad anomalie anatomiche o fisiologiche), l'unica soluzione è nutrire i cuccioli con sostitutivi del latte. Nell'agalassia secondaria, invece, è sufficiente individuare e trattare la causa, ovvero stress, inadeguata nutrizione, parto prematuro, mastite, metrite, nervosismo, malattie sistemiche (Johnston et al., 2001).

#### *4.1.2 Inadeguata assunzione di colostro/latte da parte dei cuccioli*

La mancata assunzione del colostro e del latte da parte dei neonati può essere dovuta ad un rifiuto materno del neonato, a traumi (in genere causati da distocia, allontanamento da parte della madre, cannibalismo materno spesso connesso al nervosismo), all'ipossia conseguente a parti distocici, a parti prematuri o neonati con scarso peso corporeo, a difetti congeniti, e può essere causa/conseguenza di patologie infettive (Debraekeleer et al., 2010).

### ➤ SCARSO PESO ALLA NASCITA

Lo scarso peso alla nascita è associato ad elevata probabilità di morte dei cuccioli (Hoskins, 2001). Alcuni autori sostengono che il sesso, la dimensione della cucciolata ed il peso della madre non influiscano sul peso alla nascita (Festing e Bleby, 1970; Lawler e Monti, 1984); Debraekeleer et al. (2010) hanno individuato, però, un rapporto tra il peso della madre e quello dell'intera cucciolata: quest'ultimo dovrebbe essere il 12-14% di quello della cagna.

La nutrizione inadeguata delle madri durante la gravidanza comporta scarso peso alla nascita ed una bassa concentrazione di glucosio ematico nei neonati (Johnston et al., 2001). Anche se il ridotto peso dei neonati è spesso attribuito a parti prematuri, la maggior parte dei cuccioli eccessivamente piccoli nascono normalmente a fine gravidanza: anomalie congenite o inadeguata nutrizione successivamente al parto contribuiscono alla loro dimensione ridotta (Hoskins, 2001).

### ➤ ANOMALIE CONGENITE

Le anomalie congenite sono presenti alla nascita per cause non specifiche: spesso sono di origine genetica con predisposizione di razza, ma a volte derivano dall'effetto teratogenico di alcuni farmaci somministrati in gravidanza. Alcune di queste anomalie sono incompatibili con la vita, e comportano morte appena dopo il parto (in particolare quando il sistema nervoso centrale, cardiovascolare e respiratorio sono coinvolti); altre rimangono nascoste fino a quando l'animale inizia a muoversi (Hoskins, 2001). Spesso i difetti congeniti sono portati alla luce perché il cucciolo non poppa e non cresce: per questo motivo, è importante esaminare alla nascita almeno la cavità orale per verificare che non vi siano palatoschisi o altre anomalie (Johnston et al., 2001), ed il retto per individuare l'eventuale imperforazione anale.

Le alterazioni congenite di natura microanatomica o biochimica probabilmente sono responsabili di un numero eguale di perdite perinatali rispetto a quelle anatomiche (Pedersen 1991): questi difetti non sono individuati, e sono inclusi generalmente nella categoria della "*fading puppy syndrome*". Quest'ultima è una sindrome ancora non del tutto definita, che include tutti quei cuccioli che nascono normali ma che muoiono immediatamente dopo la nascita o che non sopravvivono oltre le 2 settimane, senza una causa precisa (Hoskins, 2001). I cuccioli iniziano a perdere peso nelle prime ore di vita, si alimentano poco, mostrano segni di debolezza e atassia, pianto incessante, diarrea, difficoltà respiratorie fino a morte (Indrebo et al., 2007); i sintomi clinici non sono specifici e l'esame post-mortem rileva solo un peso corporeo al di sotto della norma e stomaco ed intestino quasi completamente privi di contenuto (Blunden, 1998). Le cause di questa sindrome possono essere anomalie congenite, scorretta nutrizione materna, peso scarso alla nascita, insulti traumatici durante o dopo il parto, patologie infettive, e qualsiasi altra causa non individuata (Hoskins, 2001).

## **4.2 Malattie infettive responsabili di mortalità perinatale**

Le patologie infettive sono una causa molto importante di morte dei cuccioli, soprattutto durante la prima settimana di vita (Münnich, 2008): in questo periodo sono più frequenti le infezioni batteriche, piuttosto che virali (Nielen et al., 1998; Rota et al., 2009), ad eccezione dell'Herpesvirosi.

Molti fattori inerenti al parto o alle prime ore di vita influiscono sulla predisposizione dei neonati allo sviluppo delle infezioni: “*respiratory distress disease*” dopo compressione della circolazione ombelicale (Van Der Weyden et al., 1989), procedure ostetriche (Moon et al., 2000), danno ipossico (Lelli et al., 1992), ipotermia/ipoglicemia/disidratazione (Atkins, 1984), anomalie congenite (Farstad, 2003).

### **4.2.1 Setticemia**

La setticemia neonatale è stata a lungo associata alla “*fading puppy sindrome*” a causa della morte rapida senza sintomi clinici. La reale incidenza di questa patologia non è tuttora conosciuta, perché spesso manca la conferma della diagnosi (Johnston et al., 2001).

La rapidità della morte spesso è responsabile della mancanza di alterazioni macroscopiche ed istologiche all'esame autoptico: ne deriva quindi l'importanza dell'esame batteriologico su organi apparentemente privi di lesioni macroscopiche e su versamenti cavitari, ai fini di evidenziare la presenza dei microrganismi coinvolti e, quindi, di poter impostare scelte terapeutiche mirate nelle restanti cucciolate e un'adeguata profilassi materno-ambientale (Rota et al., 2009). Va però sottolineato che non sempre l'isolamento batterico è diagnostico: ad esempio *E. coli* è stato implicato sia in casi di morte neonatale sia isolato come invasore post-mortem (Staley et al., 1969). I batteri principalmente coinvolti in caso di infezioni neonatali sono: *E. coli*, streptococchi, stafilococchi (*S.aureus* e *S. intermedius*) (Schäfer-Somi et al., 2003), *Klebsiella sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Enterobacter sp.*, *Proteus sp.* e anaerobi (Mosier, 1981; Rota et al., 2009). In particolare, gli streptococchi sembrano essere una comune causa di infezione molto grave, caratterizzata da sepsi, tossiemia, shock (Münnich, 2008).

Un dato emergente significativo è l'antibioticoresistenza (talvolta anche multipla, ovvero nei confronti di 4 o più principi attivi appartenenti a famiglie farmacologiche diverse) di questi batteri, come si evidenzia da vari studi (Rota et al., 2009; Milani et al., 2008; Corrà et al., 2009). L'ambiente e la madre (scolo vulvare, latte, feci, cute, orofaringe) sono sospettati essere le principali fonti d'infezione (Münnich e Lübke-Becker, 2004), soprattutto in caso di metrite/endometrite, mastite subclinica e parto prolungato (che comporta un maggior tempo di

esposizione nel canale del parto) (Johnston et al., 2001).

Milani et al. (2008) hanno effettuato uno studio sulla presenza di batteri e Micoplasmi nel tratto vaginale e nel latte di cagna nel peripartum: dall'analisi dei dati non si rileva l'esistenza di una correlazione significativa tra i batteri potenzialmente patogeni riscontrati (*E. coli*, *S. canis*, *S. intermedius*, *St. aureus*, *P. multocida*) ed il tasso di mortalità neonatale. È importante tenere controllata una probabile via d'entrata dei neonati, l'ombelico: si può ricorrere anche alla somministrazione locale di tintura di iodio per ridurre la contaminazione prevenire il passaggio di batteri in cavità peritoneale (Davidson, 2003).

La sintomatologia clinica è molto variabile: la morte può avvenire molto rapidamente senza che alcun segno sia notato dall'allevatore (Johnston et al., 2001), oppure si evidenziano eccessivo rilassamento e debolezza, scarso accrescimento, mancanza della poppata, pianto prolungato oltre i 20 minuti (i neonati dovrebbero piangere solo in risposta a dolore, freddo, fame), talvolta cianosi, ematuria, diarrea, febbre, ipotermia, coma (Münnich, 2008; Johnston et al., 2001). La diagnosi in animali vivi è spesso limitata dall'assenza della variabilità di segni clinici e dalla difficoltà di ottenere sangue o di eseguire procedure diagnostiche (Hoskins, 1991).

Il trattamento con antibiotici prima dei risultati dell'antibiogramma potrebbe essere salva-vita (Poffenbarger et al., 1991a), preferibilmente utilizzando amoxicillina-acido clavulanico o cefalosporine (Münnich, 2008). Il principio attivo potrebbe essere cambiato in seguito ai risultati dell'antibiogramma o al fallimento della terapia (Johnston et al., 2001). La somministrazione di fluidi con glucosio, vitamine o siero di adulti (22 ml/kg sottocute, soprattutto in neonati che non hanno ricevuto il colostro) rappresenta il trattamento di supporto. È importante superare l'ipotermia/ipoglicemia/disidratazione tramite fonti di calore ed alimentazione, mediante sonda gastrica se il cucciolo non è in grado di alimentarsi (Davidson, 2003; Farstad, 2003). Va prestata però attenzione a non sovralimentare i cuccioli, specialmente se è presente ileo (Johnston et al., 2001).

#### 4.2.2 *Herpesvirus canino*

I cuccioli sono particolarmente suscettibili all'infezione da Herpesvirus canino, per loro fatale entro le prime 3 settimane di vita (Johnston et al., 2001), e in particolare nei primi giorni a causa della bassa temperatura corporea che favorisce la replicazione del virus; l'Herpesvirus canino, infatti, replica solo se la temperatura corporea scende al disotto dei 36,7°C (Macintire, 2001). I neonati con infezione da CHV spesso sono quelli nati da madri non esposte al virus e che non hanno sviluppato la risposta anticorpale fino a 3 settimane prima del parto. La trasmissione alla cucciolata può essere

verticale in utero oppure derivare dal contatto con fluidi vaginali (anche durante il passaggio nel canale del parto) o secrezioni oronasali (Davidson, 2003). Dopo replicazione nei tessuti linfoidei, il virus provoca una viremia durante la quale infetta le cellule dell'endotelio; le necrosi che ne derivano causano perdita di sangue e shock immediato nel cucciolo (Nauwynck, 2010).

La sintomatologia dei neonati include anoressia (mancato aumento di peso), dispnea, addome acuto, pianto incessante, diarrea, vomito, edema sottocutaneo, incoordinazione, scolo nasale iperoemorragico, petecchie mucosali; il tasso di mortalità nelle cucciolate colpite si aggira intorno al 100% nei primi giorni di vita (Davidson, 2003; Nauwynck, 2010).

La diagnosi pre-mortem è spesso infruttuosa, e generalmente si ricorre all'esame necroscopico e a quello istologico dopo la morte: segni patognomonicici sono aree necrotico-emorragiche soprattutto nei reni ed il ritrovamento di corpi inclusi intranucleari. Sebbene non esista una terapia ufficialmente valida, Davidson (2003) suggerisce di aver ottenuto risultati positivi dopo trattamento con acyclovir e riscaldamento ambientale.



## **SEZIONE 2: ASPETTI ZOOTECNICI**

Nella seconda sezione della tesi sono illustrati gli aspetti zootecnici che potrebbero influire sui disturbi riproduttivi delle cagne in allevamento.

In particolare, sono indagati l'organizzazione delle strutture, le prassi igieniche e l'alimentazione.

I fattori citati in questa sezione sono il risultato di scelte specifiche dell'allevatore, ma dovrebbero essere frutto di decisioni concordate con il medico veterinario di allevamento, il nutrizionista, o il medico veterinario esperto di management di allevamento.

La corretta progettazione dei locali adibiti ad accogliere gli animali è fondamentale a garantire il benessere degli stessi e la prevenzione delle patologie infettive, quest'ultimo aspetto fortemente dipendente anche dal rispetto delle prassi igieniche.

L'alimentazione delle fattrici nelle diverse fasi della vita riproduttiva (ciclo estrale, gravidanza, lattazione) è molto importante poichè deve soddisfare i loro fabbisogni nutrizionali, in modo da garantire le migliori performance riproduttive in termini di concepimento, gravidanza e lattazione.

In ogni capitolo, quindi, sono proposte le strategie manageriali migliori inerenti a questi aspetti, talvolta limitate dalla scarsa presenza di fonti bibliografiche cui attingere.

## 1 STRUTTURE

Per migliorare le performance riproduttive, la struttura di un allevamento canino dovrebbe essere da una parte favorevole al mantenimento delle condizioni ideali per limitare il diffondersi delle patologie infettive, dall'altra il più possibile confortevole per gli animali per favorire il loro benessere. Nell'ambito dell'allevamento canino non esistono numerosi studi scientifici che abbiano valutato l'effetto delle caratteristiche delle strutture sulla fertilità delle fattrici; è necessario quindi attingere a fonti limitate e paragonare il settore canino a quello di altre specie animali nelle quali i dati sono più precisi.

### *1.1 Prevenzione delle patologie infettive*

Per quanto riguarda la prevenzione delle patologie infettive, è importante innanzitutto tenere in considerazione l'orientamento dell'edificio rispetto ai venti dominanti per evitare la diffusione dei microrganismi potenzialmente patogeni.

Va poi prevista la separazione dei soggetti d'allevamento predisponendo dei locali adatti a diversi stadi fisiologici (nascita, crescita, mantenimento, gestazione e lattazione, anzianità) e patologici (animali sospetti d'infezione, malati o contagiosi). I locali suscettibili di contaminazione, ovvero i "settori sporchi" (soggetti con patologie, ospiti della pensione, maschi esterni utilizzati per la monta, cani da addestrare), vanno posizionati in una zona separata con ingresso distinto dalla zona che accoglie gli animali sani dell'allevamento. Anche le aree di svago dovrebbero essere separate dagli alloggi per evitare di suscitare invidie e quindi latrati tra i cani negli alloggi e quelli che sgambano nell'area di svago (Grandjean et al., 2003).

Anche il controllo dell'ambiente interno ai box è fondamentale (Grandjean et al., 2003). Un buon sistema di aerazione riveste un ruolo fondamentale ai fini di evitare l'accumulo di gas irritanti o maleodoranti, di limitare i rischi di contaminazione per via aerogena (coinvolta in quasi tutte le patologie infettive responsabili di problemi di fertilità); inoltre influisce sulla temperatura (un incremento di velocità dell'aria pari a 0,4 km/h equivale ad un abbassamento di temperatura di circa 1°C). In caso l'allevatore non facesse ricorso a tecniche onerose come la ventilazione meccanica, basta un buon orientamento delle aperture rispetto ai venti dominanti, un'attenta gestione del gradiente di temperatura, la tenuta delle giunture e la regolazione dei punti di aerazione ed estrazione. All'interno dei box l'umidità ideale corrisponde a circa 65%, anche se questo parametro è considerato poco influente sulla salute degli animali e sulla regolazione termica se la temperatura ambientale è mantenuta intorno ai 15-20°C; un livello ottimale di umidità nell'ambiente è garantito dall'assenza di odori e di condensa su muri o vetri; la presenza di goccioline d'acqua indica

un'umidità superiore a quella ottimale, e ciò favorisce lo sviluppo di muffe così come l'insorgenza di malattie respiratorie e cutanee negli animali ospitati in questi ambienti.

Il controllo della temperatura è fondamentale soprattutto nel settore maternità [vedi capitolo 4, sezione2: mortalità perinatale]. Una temperatura complessivamente troppo alta all'interno dei locali maternità rischia però di nuocere alla produzione latte della fattrice, in quanto la dilatazione dei capillari cutanei che consegue alla necessità di eliminare il calore in eccesso, produce una deviazione della circolazione verso la periferia a discapito delle ghiandole mammarie: la cagna deve quindi avere la possibilità di sottrarsi a queste condizioni, restando lontana dal cono di riscaldamento tra una poppata e l'altra (Grandjean et al., 2003). Per questo motivo la fonte di riscaldamento consigliata all'interno della sala maternità è rappresentata dalle lampade infrarossi appese al soffitto.

Infine, la luce solare influenza la comparsa e la sincronizzazione dei calori in alcune specie (e.g. gatti, pecore); nella specie canina questo non si verifica, ma 12-14 ore di illuminazione al giorno (naturale e/o artificiale) sembrerebbero importanti per garantire l'equilibrio sessuale e fisico degli animali; inoltre, la proliferazione di elementi nocivi (microbi, funghi, insetti, roditori) è favorita dall'oscurità.

## ***1.2 Stress***

Non vi sono indagini in grado di stabilire inequivocabilmente il ruolo dello stress (e delle condizioni di allevamento che lo causano) sul benessere e sulle performance riproduttive delle cagne. Il riferimento nei testi, comunque raramente presente, è limitato a fonti aneddotiche.

È sicuramente noto che lo stress è responsabile di alterazioni comportamentali negli animali. Vari studi hanno infatti evidenziato che condizioni stressanti (confinamento in spazi ristretti, solitudine, sovraffollamento, noia) comportano depressione e sviluppo di stereotipie nel cane: l'animale può smettere di leccarsi, alimentarsi, muoversi, oppure incrementare l'attività motoria con movimenti anche bizzarri, la frequenza dell'urinazione, il leccamento del muso, può emettere vocalizzazioni, morsiarsi con insistenza le zampe, scavare (Beerda et al., 1997; Beerda et al., 1999; Beerda et al., 2000; Hetts et al., 1992; Hubrecht et al., 1992; Mertens e Unshem, 1996; Rooney et al., 2007).

Lo stress causa anche immunosoppressione in tutti gli esseri viventi (Khansari et al., 1990): l'alterazione dello stato immunitario predispone allo sviluppo di malattie infettive e questo può determinare scarse performance riproduttive.

È generalmente condivisa la teoria secondo la quale qualunque esperienza stressante inibisce direttamente la funzionalità riproduttiva (Wingfield e Sapolsky, 2003; Von Borell et al., 2007; Rivier e Rivest, 1991): nelle femmine di mammifero, in particolare, lo stress è responsabile di

interruzione dell'ovulazione, mancato impianto e comportamento sessuale anomalo. L'aumento del cortisolo, in questo caso dovuto allo stimolo stressante, inibisce il rilascio di GnRH e diminuisce la sensibilità ipofisaria a questo ormone con conseguente diminuzione della produzione di gonadotropine, come dimostrato negli animali da laboratorio (Ching, 1983; Suter e Schwartz, 1985), nella scrofa (Schneider et al., 2004; Turner et al., 1999), nei ruminanti (Breen et al., 2005; Smith et al., 2003), nella cagna (Kemppainen, 1983). I glucorticoidi inibiscono anche la risposta ovarica all'LH, comportando cicli riproduttivi lunghi ed irregolari (Negro-Vilar, 1993). Il declino del progesterone e l'aumento dei livelli di prolattina (antagonista del progesterone) osservati in soggetti stressati sono responsabili del mancato impianto (Negro-Vilar [1993] lo riporta nella donna, Wettemann e Bazer [1985] nella scrofa). Infine lo squilibrio ormonale e lo stato di ansietà e vigilanza indotti dallo stress sopprimono il comportamento sessuale, come evidenziato da vari autori nella donna, nella scrofa, nei ruminanti (Carter, 1992; Walker et al., 2008; Von Borrell et al., 2007; Turner et al., 1999).

Numerosi studi inerenti le condizioni di benessere di vacche e scrofe hanno dimostrato che condizioni stressanti sono responsabili di scarse performance riproduttive, così come del resto avviene nell'uomo. Si è osservato, in particolare, che lo stress da caldo nelle vacche influisce sullo sviluppo dei follicoli ovarici (Wolfenson et al., 1995), sul tasso di concepimento (Thatcher, 1974; Garcia-Ispierito et al., 2006) e sulla produzione di latte (West, 2003), perché ad elevate temperature l'animale spende la maggior parte dell'energia per disperdere il calore (Fuquay, 1981). Alcuni parametri riproduttivi (quali tasso di concepimento, durata dell'estro, quantità di latte prodotta/giorno, durata dell'intervallo parto-concepimento) risentono dei cambiamenti gerarchici all'interno del gruppo (Dobson e Smith, 2000; Orihuela, 2000). Lopez-Gatius (2003), tramite uno studio retrospettivo, suggerisce che limitando le pratiche manageriali stressanti la fertilità della bovina migliora.

Anche suini sottoposti a stress da caldo hanno dimostrato scarsa efficienza riproduttiva soprattutto durante i primi 16 giorni di gravidanza, evidenziando minor tasso di concepimento e nidiate meno numerose. (Wettemann e Bazer, 1985). Scrofe con un limitato spazio a disposizione hanno mostrato alterazioni del comportamento estrale (Hemsworth et al., 1986).

Nella specie bovina alcuni aspetti strutturali e manageriali quali lo spazio disponibile alla mangiatoia (Gottardo et al., 2004), la numerosità degli animali, la carenza di dispensatori d'acqua, l'alimentazione povera in fibra (Cozzi et al., 2009), la manipolazione ed il trasporto (Mitchell et al., 1988) sono stati riconosciuti come fattori limitanti il benessere animale e per questo responsabili di alterazioni comportamentali nella specie bovina e di modificazioni ormonali tipiche dello stress (rialzo di cortisolo, T3, acido lattico, catecolamine).

Anche nei suini è stata analizzata la risposta comportamentale a diverse metodiche di allevamento: quelli legati con catena al collo hanno mostrato depressione ed elevati livelli di cortisolo plasmatico (Barnett et al., 1985); ancora, si sono osservati perdita di peso e cambiamenti comportamentali in seguito a trasporti e cambiamenti climatici (Hicks et al., 1998).

La vasta numerosità di dati risultanti da molteplici studi condotti sul benessere degli animali da reddito ha permesso la stesura di normative europee a tutela dello stato psico-fisico di queste specie, dove è specificato l'obbligo di garantire determinate condizioni all'interno dell'allevamento (e.g. idoneità di temperatura, spazio, illuminazione, alimentazione).

Per quanto riguarda l'ambito canino, non vi sono studi volti con precisione ad indagare la connessione tra stress e fertilità mentre le uniche informazioni sul benessere di questa specie derivano dall'analisi degli animali confinati nei canili. In questi, i livelli di cortisolo plasmatico (indice di stress) sono più elevati rispetto a cani tenuti in casa (Hennessy et al., 1997); Tuber et al. (1999) suggeriscono che ciò sia connesso all'isolamento, al rumore, all'ambiente spesso non idoneo. Nemmeno sullo stress da caldo, di cui si presuppone possano soffrire anche i cani, si trovano dati riferiti agli effetti sulla fertilità. Sono tuttavia stati dimostrati cambiamenti fisiologici e patologici su animali sottoposti sperimentalmente a stress termico. In un gruppo di Greyhound sottoposto a stress termico (Hales e Dampney, 1975) è stato osservato l'aumento dell'output cardiaco con ripartizione del flusso sanguigno verso cute, lingua, apparato respiratorio e milza a discapito degli altri organi. In un altro esperimento (Hannemann et al., 1977), 20 cani sono stati esposti a temperature di 54,4° C per 30 minuti (10 cani ad umidità relativa del 15% e 10 ad umidità relativa pari al 35%) e la risposta a tale stress è stata rilevante: aumentata della temperatura rettale e del pH ematico, aumento della concentrazione emoglobinica e degli eritrociti, fino a frammentazione miocardica, necrosi corticale renale, degenerazione cerebrale e cerebellare. Hammel et al. (1958) suggeriscono che lo stress da caldo faccia consumare molta energia nella dispersione del calore. Nonostante all'interno di un allevamento canino non si raggiungeranno mai le temperature utilizzate nello studio di Hannemann et al. (1977) (questo studio era stato condotto allo scopo di riprodurre temperature che potevano riscontrarsi nelle stive di alcuni aerei utilizzate per il trasporto degli animali), è possibile pensare che lo stress da caldo nel cane si manifesti quando le temperature aumentano al di sopra della sua zona di neutralità termica e permangano per un periodo di tempo sufficientemente lungo ad impedire all'animale di contrastare tale condizione avversa. Possiamo quindi solo dedurre che anche nel cane lo stress da caldo sia responsabile di mutazioni che potrebbero alterare anche la normale fisiologia riproduttiva.

La mancanza di dati scientifici a questo proposito si riflette anche nella scarsa legislazione in merito: l'unico riferimento è il D.M. 08/02/2003, il cui testo si ripropone di "garantire il benessere

dei cani, evitarne usi riprovevoli sia diretti che indiretti”, e nel quale l’unica indicazione utile per gli allevamenti è quella relativa allo spazio minimo dei box e dei cortiletti (vedi tabella 22).

PESO DEL CANE IN KG	SUPERFICIE MINIMA DEL PAVIMENTO DEL BOX COPERTO/CANE IN MQ	SUPERFICIE MINIMA ADIACENTE AL BOX PER IL MOVIMENTO DEL CANE	
		FINO A 3 CANI M <sup>2</sup> PER CIASCUN CANE	OLTRE 3 CANI M <sup>2</sup> PER CIASCUN CANE
Meno di 10	1,0	1,5	1,0
Da 11 a 30	1,5	2,0	1,5
Più di 30	2,0	2,5	2,0

Tabella 22- *Dimensioni minime dei box per cani e degli annessi recinti all’aperto* (D.M.08/02/2003)

Ai fini del benessere animale, e quindi della supposta maggiore probabilità di avere migliori performance riproduttive, Grandjean et al. (2003) suggeriscono la soluzione “box doppio più cortiletto” (valido anche per le fattrici), ovvero due box con un limitato numero di animali che abbiano in comune un cortiletto esterno. Infatti, i cani stabulati singolarmente si annoiano correndo il rischio di stressarsi; tuttavia, troppi animali all’interno della stessa zona aumentano il rischio di trasmissione di microrganismi patogeni e di conflitti gerarchici. Nonostante il comfort degli alloggi, l’accesso ad un’area di svago di circa un’ora al giorno resta indispensabile per l’equilibrio fisico, fisiologico e sociale (Grandjean et al., 2003; Beerda et al., 1999). Tale area dedicata allo svago dovrebbe essere separata dagli alloggi, sufficientemente ampia, ma soprattutto non umida, melmosa, possibilmente non erbosa, sabbiosa o argillosa, poiché questi terreni sono molto difficili da decontaminare ed inoltre favoriscono il completamento del ciclo vitale di alcuni parassiti. Sono pertanto da preferire aree rivestite di ciotoli.

Per quanto riguarda il settore riproduttivo, all’interno di un allevamento sarebbe consigliabile un locale di monta o inseminazione che sia posizionato lontano da fonti di disturbo per la coppia, ma

soprattutto è necessario un reparto maternità separato dagli altri alloggi. In esso la sala parto va progettata in modo da favorire il migliore confort possibile sia per la madre che per i cuccioli, controllando l'assenza di asperità pericolose per gli animali, offrendo alla cagna un ambiente familiare e spazio sufficiente per potersi stendere, e mantenendo condizioni climatiche confortevoli. I box destinati ad accogliere le madri con i cuccioli dovrebbero prevedere la presenza di specifiche casse da parto o di giacigli provvisti di sbarre laterali anti-schiacciamento da posizionare sui lati per evitare lo schiacciamento dei cuccioli da parte della madre (soprattutto per le razze di taglia grande-gigante) (vedi figura 18).

È consigliabile che la struttura sia facilmente lavabile e disinfettabile, poiché il rispetto delle corrette prassi igieniche risulta fondamentale in questo reparto: il pavimento piastrellato viene suggerito da Casseleux (2006), mentre il legno non trattato è da evitare.



Figura 18- Giaciglio provvisto di sbarre anti-schiacciamento per le sale parto

## 2 IGIENE

In un allevamento canino, ambiente in cui sono presenti molti animali e nel quale si introducono periodicamente nuovi soggetti, è importante applicare delle corrette norme di profilassi igienico-sanitaria ai fini di evitare l'insorgenza e la trasmissione di episodi di malattie infettive, in particolare quelle responsabili di infertilità. È stato dimostrato che l'igiene è il principale fattore responsabile della riduzione della diffusione e della manifestazione di alcune patologie, tra cui l'Herpesviriosi (Ronsse et al., 2004). Con il termine igiene si intende l'insieme di metodi utilizzati per la prevenzione delle contaminazioni, di metodi applicati per garantire un'efficiente pulizia, di vaccinazioni e trattamenti antiparassitari (Casseleux, 2006).

La prevenzione delle contaminazioni è diretta principalmente a contrastare la presenza degli agenti nocivi quali insetti, acari e roditori, che sono vettori responsabili della diffusione degli agenti eziologici di leishmaniosi, toxoplasmosi, pasteurellosi, salmonellosi e leptospirosi (Grandjean et al., 2003). Garantire la salute ed il benessere degli animali dell'allevamento, con particolare riferimento alle femmine in gravidanza che ne rappresentano il delicato fulcro, è pertanto il principale obiettivo dell'allevatore. Di seguito saranno discussi i metodi di prevenzione e trattamento dei principali elementi di nocività in un allevamento canino. Queste pratiche dovrebbero essere applicate in qualsiasi struttura adatta ad accogliere cani, la presenza di femmine in gravidanza in allevamento le rende necessarie per evitare l'insorgenza di patologie che possano mettere a rischio la gravidanza.

In genere gli insetti vengono attirati dalla presenza di cani, dalle scorte di alimenti, ma anche dalle acque stagnanti o dalle feci; per questo motivo, soprattutto ove siano ricoverate cagne gravide e cuccioli, è indicato evitare la presenza di pozzanghere o recipienti abbandonati, e provvedere alla rimozione degli escrementi con regolarità, oltre che limitare l'accesso degli insetti mediante l'uso di zanzariere sulle finestre. È utile inoltre non favorirne lo sviluppo tramite l'instaurarsi di aree calde e molto umide, quindi limitare l'uso dell'acqua per la pulizia allo stretto necessario. In zone particolarmente colpite a causa della vicinanza dell'allevamento a specchi d'acqua, può essere consigliato di chiudere i cani nel box al crepuscolo (periodo di attivazione delle zanzare), proteggere gli animali dalle punture con collari insetto-repellenti (in cagne gravide è preferibile l'utilizzo di collari a base di oli naturali-ad es. Beaphar Bio Band-, più sicuri). In termini di lotta attiva, vi sono le lampade attiniche, le trappole adesive o i prodotti insetticidi, da applicare in modo preventivo o terapeutico: questi ultimi non devono essere tossici per gli animali che potrebbero ingerirli tramite leccamento o assorbirli per contatto; in particolare il contatto di piretroidi (e.g. deltametrina, permetrina) e carbammati nelle femmine in gestazione può causare malformazioni embrionali (Grandjean et al., 2003) quindi è d'obbligo evitare il loro utilizzo all'interno dell'area maternità.

Per quanto riguarda i roditori, la pulizia dei locali e l'assenza di avanzi alimentari costituiscono la prima tappa fondamentale per una buona prevenzione; dopodichè, sono da evitare fossati intorno all'allevamento in caso di presenza di animali acquatici (e.g., nutrie) così come sono da evitare piante rampicanti sulle pareti delle strutture poiché gli animali potrebbero arrampicarsi per accedere ai locali interni. Sarebbe indicato interrare delle grate a maglie non troppo larghe intorno all'edificio e utilizzarne altre in corrispondenza delle aperture delle zone di stoccaggio di alimenti, così come su tutte le aperture verso l'esterno (canali di scolo, ondulazioni della tettoia,..) e nelle finestre attraverso le quali si accede alle sale maternità. La lotta attiva prevede la presenza di gatti (difficilmente applicabile per non suscitare continui latrati da parte dei cani) o di esche con prodotti rodenticidi, da manipolare con cautela e da usare con precauzione perché, se ingerite, mortali per i cani stessi.

Anche i visitatori, i fornitori di alimenti, il personale stesso sono veicoli potenzialmente pericolosi di malattie infettive, per questo motivo è indicato far indossare loro abiti protettivi, calzari, cuffie, guanti in caso di manipolazione degli animali, ma soprattutto è auspicabile far visitare l'allevamento secondo percorsi specifici. In particolare, i visitatori che desiderano vedere i cuccioli per un eventuale acquisto, dovrebbero evitare di circolare per l'intero allevamento prima di giungere al locale maternità.

Per quanto concerne la pulizia dei locali, si può ricorrere all'utilizzo di mezzi fisici (calore, raggi ultravioletti, alta pressione) o chimici (detergenti e disinfettanti) (Grandjean et al., 2003). Una pulizia giornaliera della sala maternità è assolutamente consigliabile. E' altrettanto importante che questo sia il primo locale ad essere pulito e non l'ultimo, perché gli stessi strumenti utilizzati per la pulizia e spostati da un locale all'altro possono fungere da veicolo di infezione. Naturalmente l'obiettivo dell'allevatore non è quello di mantenere le strutture in una condizione di sterilità, ma solo di arrivare ad un equilibrio tra il microbismo ambientale dell'allevamento e la capacità di difesa dei cani, mantenendo un ambiente sfavorevole allo sviluppo dei patogeni.

La regola principale consiste nel procedere prima con la detersione e poi con la disinfezione (Casseleux, 2006): la prima, che dovrebbe essere fatta sistematicamente per evitare che si formi un legame stabile tra le superfici e i microrganismi, tende a disincrostare le sostanze organiche (detergente, alta pressione, raschiamento e spazzolamento); la seconda, che si può effettuare meno frequentemente, mira a combattere lo sviluppo dei germi persistenti (effetto batteriostatico, virustatico,..) o a distruggere la maggioranza di essi (effetto battericida, virucida,..). Terminata la profilassi igienica, la superficie trattata dovrebbe essere sanificata dal punto di vista fisico (priva di sporczia visibile), chimico (senza residui delle sostanze trattanti) e biologico (microrganismi in numero molto ridotto). La pratica di detersione dovrebbe essere praticata quotidianamente in sala

maternità e quella di detersione-disinfezione una volta alla settimana.

La scelta del detergente, alla cui applicazione segue sempre una fase di rimozione meccanica della componente più grossolana, è abbastanza semplice. Un disinfettante, invece, deve essere selezionato con attenzione in quanto dovrà possedere uno spettro d'attività in grado di coprire la maggior parte dei germi presenti, ovvero distruggerne il 99% al primo utilizzo e l'1% restante al secondo passaggio prima che abbiano avuto il tempo di riprodursi. La diversa struttura della parete dei batteri Gram positivi e Gram negativi determina una loro differente resistenza ai disinfettanti; in particolare la lipofilia della membrana dei Gram negativi li rende refrattari ai principi attivi idrofili, quali sali quaternari di ammonio e clorexidina. Per questo motivo, in allevamenti in cui è nota la presenza di patologie infettive o parassitarie ricorrenti (anche in seguito a precisi campionamenti ambientali) è importante selezionare un prodotto il cui spettro d'azione sia mirato all'eliminazione dei microrganismi in questione. Nella scelta del prodotto per la disinfezione, oltre allo spettro d'azione, vanno considerati anche altri criteri quali la persistenza (alcuni durano meno di 6 ore), l'assenza di tossicità, il costo, l'attività in presenza di sostanze organiche (ad esempio la candeggina è inattiva in presenza di materiale organico), la facilità di conservazione (alcuni sono instabili alla luce), il materiale da disinfettare (ad esempio il cloro è incompatibile con il ferro; gli iodofori ed i composti ossidanti con alluminio, rame, ottone, ferro; i sali quaternari d'ammonio con cellulosa, nylon, legno, gomma, materiali porosi). Il metodo di disinfezione più economico rimane, comunque, quello del calore, per quanto sia difficilmente applicabile nella pratica di gestione quotidiana di un allevamento canino (Casseleux, 2006).

Un metodo di sanificazione molto efficace è il vuoto sanitario: esso consiste nella sospensione della normale attività all'interno di un locale (8 giorni in genere) per disinfestarlo il più possibile e per far sì che i germi sopravvissuti muoiano per essiccazione, per mancanza di supporto organico e per semplice invecchiamento (Grandjean et al., 2003). Questo è consigliabile all'interno di una sala parto/maternità, quando a seguito di elevata mortalità neonatale, si sospetti o si evidenzi la presenza di Herpesvirus o altri agenti infettivi che possano mettere a rischio la fertilità delle femmine ospitate.

### 3 ALIMENTAZIONE

Le cagne in riproduzione hanno dei fabbisogni e delle attitudini alimentari peculiari e quindi necessitano di un razionamento adatto alle loro esigenze, dal momento della monta al termine della lattazione (Case et al., 1995). Gli obiettivi di un programma di alimentazione per questi soggetti sono quelli di ottimizzare (Grandjean e Paragon, 1986):

- ✓ Concepimento
- ✓ Numero di cuccioli per cucciolata
- ✓ Capacità della cagna di partorire
- ✓ Vitalità dei feti e neonati

Un'alimentazione adeguata ad ogni fase del ciclo riproduttivo della cagna incrementerà le possibilità di successo delle performance, mentre la scorretta nutrizione può influirvi negativamente. Gli allevatori spesso basano la scelta dei loro programmi nutrizionali sull'esperienza personale; tuttavia esistono delle precise informazioni scientifiche riguardanti i fabbisogni energetici e nutrizionali di cagne in estro, gravidanza e lattazione (Debraekeleer et al., 2010). Va inoltre considerato che ogni cagna ha delle esigenze individuali che sono determinate dalla genetica, dalle caratteristiche dell'ambiente in cui vive, dalla dimensione della cucciolata e dal suo stato di salute. Le principali conseguenze riproduttive e di salute nella cagna a seguito di carenze o eccessi nutrizionali durante il ciclo riproduttivo sono elencate in tabella 23.

FATTORI	CONSEGUENZE RIPRODUTTIVE E SULLA SALUTE
Alimentazione carente	Cucciolata poco numerosa Scarso peso dei cuccioli alla nascita Aumento della morbilità e mortalità neonatale Diminuzione della quantità di latte prodotta Calo dello stato immunitario dei cuccioli e della loro risposta ai vaccini Calo della fertilità Perdita di peso nelle cagne
Obesità	Riduzione dell'ovulazione Calo della fertilità Calori silenti Intervallo interestrile prolungato Anestro persistente Cucciolate meno numerose
Carenza di proteine	Scarso peso alla nascita Aumento della morbilità e mortalità neonatale Calo dell'immunità neonatale
Cibo povero di carboidrati	Scarso peso alla nascita Aumento della morbilità e mortalità neonatale Aumento del numero dei nati-morti
Carenza di zinco	Riassorbimento fetale Cucciolate poco numerose
Carenza di ferro	Calo dello stato immunitario dei cuccioli e della loro risposta ai vaccini
Carenza di piridossina e biotina	Calo dello stato immunitario dei cuccioli e della loro risposta ai vaccini
Ipervitaminosi D	Calcificazione dei tessuti molli
Ipervitaminosi A	Anomalie congenite Cucciolate poco numerose

Tabella 23– *Effetti di una nutrizione scorretta sulle performance riproduttive e sulla salute delle cagne* (Debraekeleer et al., 2010)

### ***3.1 Estro ed accoppiamento***

Un'alimentazione ottimale per gli animali inseriti in un programma di riproduzione dovrebbe essere iniziata già prima dell'accoppiamento (Sheffy, 1978). Solo cagne in buono stato di salute e di nutrizione (Body Condition Score -BCS- compreso tra 2.5/5 a 3.5/5) dovrebbero essere accoppiate (vedi tabella 24). Se una cagna è sottopeso durante la fase estrale è prudente posticipare l'accoppiamento: qualora ciò non fosse possibile, particolare attenzione dovrà essere posta all'alimentazione della stessa durante la gravidanza in modo tale da garantire un miglioramento del BCS durante questo delicato periodo (Meyer, 1990). Anche un BCS>3 potrebbe essere responsabile di difficoltà nel concepimento: le fattrici in sovrappeso dovrebbero quindi perdere peso prima dell'accoppiamento per migliorare la loro fertilità (Grandjean e Paragon, 1986).

Il periodo di estro non impone esigenze nutrizionali particolari nella cagna, contrariamente a quanto avviene in alcune specie (ad es. suino) nelle quali è comune praticare una sovralimentazione transitoria del 5-10 % rispetto al periodo di mantenimento chiamata "flushing" (Case et al., 1995). È necessario semplicemente verificare che la leggera perdita di appetito che si manifesta nella fase estrale sia eventualmente compensata da un aumento dell'appetibilità della razione (ad es. mediante reidratazione). Durante il picco estrale ci si può aspettare un calo dell'ingestione pari al 17% (Haupt et al., 1979).

Occasionalmente può verificarsi vomito o nervosismo a causa di cambiamenti ormonali, trasporto o mutazioni ambientali associati alla fase di accoppiamento. Per questo motivo è indicato non nutrire le cagne o farlo con dosi limitate immediatamente prima o dopo questo momento (Bebiak et al., 1987).

<b>PUNTEGGIO</b>	<b>DESCRIZIONE</b>
1_molto magro	<u>coste</u> : facilmente palpabili senza copertura di grasso <u>base della coda</u> : le ossa sono molto evidenti, non c'è copertura di grasso <u>cane visto di lato</u> : profonda curvatura addominale <u>cane visto dall'alto</u> : forma a clessidra molto accentuata
2_sottopeso	<u>coste</u> : facilmente palpabili con una minima copertura di grasso <u>base della coda</u> : le ossa sono evidenti con una lieve copertura di grasso <u>cane visto di lato</u> : la curvatura addominale è molto evidente <u>cane visto dall'alto</u> : forma a clessidra marcata
3_ideale	<u>coste</u> : facilmente palpabili con una lieve copertura di grasso <u>base della coda</u> : profilo regolare con una lieve copertura di grasso <u>cane visto di lato</u> : curvatura addominale visibile <u>cane visto dall'alto</u> : addome ben proporzionato, è visibile il restringimento addominale dietro le coste
4_sovrappeso	<u>coste</u> : difficilmente palpabili sotto una moderata copertura di grasso <u>base della coda</u> : qualche ispessimento, le ossa sono palpabili con difficoltà sotto una moderata copertura di grasso <u>cane visto di lato</u> : è difficilmente evidenziabile la curvatura addominale <u>cane visto da sopra</u> : il restringimento addominale dietro le coste è assente o visibile con difficoltà
5_obeso	<u>coste</u> : non palpabili sotto una spessa copertura di grasso <u>base della coda</u> : ispessita e non palpabile sotto una spessa copertura di grasso <u>cane visto di lato</u> : completa assenza della curvatura addominale; si notano depositi di grasso a livello di collo ed arti. <u>cane visto dall'alto</u> : completa assenza del restringimento addominale; è evidente la distensione addominale.

Tabella 24- BCS del cane in scala 1 a 5

### **3.2 Gravidanza**

Cagne alimentate correttamente al momento del parto dovrebbero pesare dal 15% (cagne di taglia grande) al 25% (cagne di taglia piccola) in più rispetto al loro peso al momento dell'accoppiamento (Meyer, 1990; Leibetseder, 1989) a causa dell'aumentato sviluppo del tessuto mammario, dell'acqua extracellulare e della crescita dei tessuti extragenitali (Meyer, 1990; Leibetseder, 1989; Mosier, 1978) (vedi tabella 25). Dopo il parto, invece, vanno incontro ad un forte calo e dovrebbero quindi arrivare a pesare dal 5% al 10% in più.

Una nutrizione inadeguata durante la gravidanza potrebbe essere responsabile di riassorbimento embrionale, ridotto sviluppo fetale, morte, aborto o natimortalità (McDonald et al., 1995), ma anche di scarso peso dei cuccioli alla nascita e calo della loro immunocompetenza (in particolare se la qualità proteica nella dieta è scarsa) con predisposizione degli stessi all'ipoglicemia, alla setticemia, alla polmonite ed all'emorragia (Mosier, 1978; Schroeder e Smith, 1994). Inoltre, la restrizione alimentare in questo periodo può compromettere la successiva produzione di latte (Mosier, 1977). Al contrario, l'obesità a fine gravidanza può incrementare le possibilità di avere un parto distocico, e di conseguenza dei cuccioli ipossici ed ipoglicemici. Alcuni studi hanno dimostrato che nella donna l'obesità è il maggior fattore predisponente a parti prematuri e mortalità perinatale (Prentice e Goldberg, 1996). Ratto obese durante la gestazione e la lattazione hanno manifestato una ridotta capacità di produrre di latte e di mantenere la cucciolata (Rasmussen, 1992).

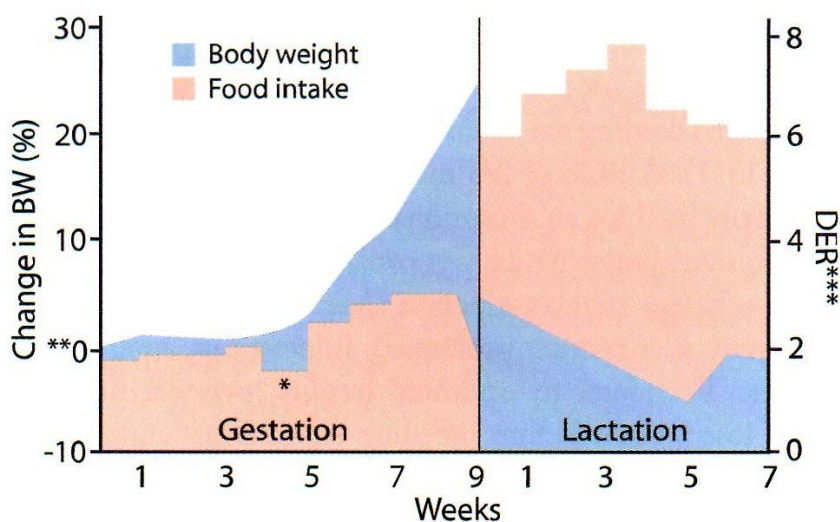
<b>TESSUTI</b>	<b>% DI ACCRESCIMENTO</b>
Massa fetale	12
Placenta	3
Crescita di utero, ghiandole mammarie e fluido amniotico	3
Accrescimento extragenitale ed acqua extracellulare	7
Accrescimento totale	25

Tabella 25- *Distribuzione dell'accrescimento del peso della cagna alla fine della gestazione* (Meyer, 1990)

Nelle prime sei settimane di gestazione le esigenze nutrizionali della madre sono pressochè invariate rispetto al mantenimento. Infatti, la crescita dei feti è ancora scarsa, la mineralizzazione dei loro scheletri non è ancora iniziata ed il loro volume non riduce ancora le capacità gastriche della madre (Case et al., 1995). Nella terza-quarta settimana, le cagne generalmente manifestano un calo transitorio dell'appetito che può esitare in una riduzione dell'ingestione pari o superiore al 30%: questo calo può essere dovuto all'effetto dell'impianto embrionale, che inizia intorno ai 20 giorni di gestazione (vedi figura 19) (Lewis et al., 1987; Schroeder e Smith, 1994). In compenso,

l'importante sviluppo ponderale e scheletrico dei feti a partire dalla 6<sup>a</sup> settimana di gestazione porta ad un aumento progressivo dei fabbisogni proteici, energetici e minerali della cagna (Meyer, 1990; Ontko e Philips, 1958; Romsos et al., 1981), motivo per cui l'assunzione di cibo dovrebbe essere gradualmente aumentata ogni settimana a partire dalla sesta (Grandjean et al., 2003) (vedi figura 20). I fabbisogni energetici in questo periodo aumentano fino al 30% in più rispetto a quelli di mantenimento per animali con cucciolate di piccole dimensioni, ed arrivano al 50-60% in più in fattrici con cucciolate molto numerose (Romsos et al., 1981; Meyer, 1990). Negli ultimi giorni, però, questo incremento dei fabbisogni sarà ostacolato dalla ridotta capacità di ingestione della cagna, dovuta all'espansione uterina nello spazio addominale che comprime lo stomaco impedendone una adeguata distensione (Zentek e Meyer, 1992). Alcune cagne appena prima del parto diventano anoressiche (Romsos et al., 1981).

Gli animali dovranno quindi essere nutriti con un alimento appetibile, di alta densità energetica e digeribilità in modo da permettere un aumentato apporto di energia e nutrienti in un più ridotto volume. Sarà inoltre preferibile distribuire la razione giornaliera in diversi piccoli pasti nel corso della giornata o lasciare l'alimento sempre a disposizione della cagna in modo tale che essa possa auto-regolarsi secondo le proprie esigenze.



\*Calo transitorio dell'ingestione

\*\* Peso prima dell'accoppiamento

\*\*\* Daily energy requirement (Fabbisogno energetico giornaliero)- i numeri sono multipli del fabbisogno di mantenimento

Figura 19- *Tipici cambiamenti del peso e dell'ingestione di una cagna durante gestazione e lattazione* (Debraekeleer et al., 2010)

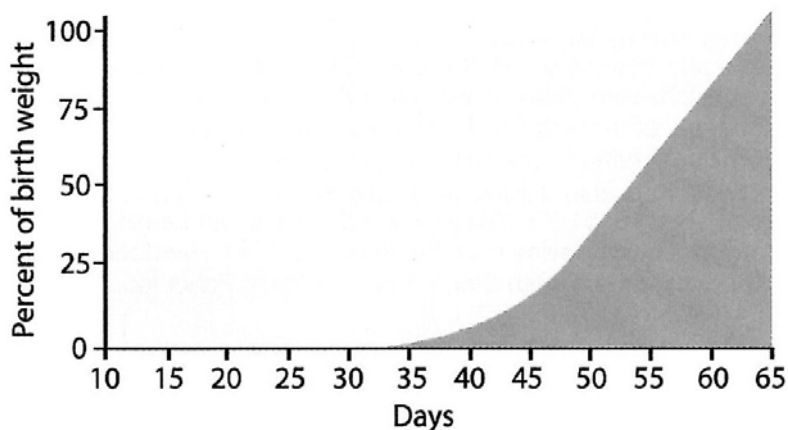


Figura 20- Lo sviluppo della massa fetale durante la gravidanza in cagne di razza Beagle. Solo il 2% della massa totale è sviluppata prima dei 35 giorni di gestazione ed il 5,5% ai 40 giorni. Dopo il 40° giorno la crescita dei tessuti fetali diventa esponenziale (Leibedsteder, 1989)

### 3.3 Lattazione

Il neonato necessita di una corretta nutrizione fornita dal latte materno. Una lattazione ottimale dipende dallo stato nutrizionale prima dell'accoppiamento e dall'adeguata nutrizione in gestazione e lattazione (Debraekeleer et al., 2010). Durante questo stadio i fabbisogni nutrizionali sono direttamente connessi alla produzione di latte (Meyer et al., 1985; Oftedal, 1984) che a sua volta è influenzata dal momento della lattazione e dal numero di cuccioli (Meyer et al., 1985; Ontko e Philips, 1958). In questo periodo le richieste energetiche sono le più elevate rispetto a qualsiasi altra fase di vita dell'animale. La produzione di latte durante la prima settimana equivale circa al 2,7% del peso corporeo della fattrice e successivamente aumenta per raggiungere, durante il picco della lattazione (3°- 4° settimana), una quantità superiore all'8% del peso corporeo (Ontko e Philips, 1958; Meyer et al., 1985; Zentek e Meyer, 1992; Scantlebury et al., 2000).

Il latte di cagna, oltre ad essere prodotto in notevoli quantità, contiene più di due volte la concentrazione di proteine e grassi rispetto a quello vaccino; esso deve infatti essere molto nutriente per supportare la crescita più rapida dei cuccioli rispetto ai vitelli (vedi tabella 26).

<b>SPECIE</b>	<b>GIORNI RICHIESTI DAL NEONATO PER RADDOPPIARE IL PESO CORPOREO</b>	<b>PROTEINA (%)</b>	<b>GRASSO (%)</b>	<b>CALCIO (%)</b>	<b>FOSFORO (%)</b>
<b>Donna</b>	180	1,6	3,75	0,03	0,014
<b>Cavalla</b>	60	2	1,4	0,1	0,07
<b>Vacca</b>	47	3,3	3,7	0,12	0,1
<b>Capra</b>	22	2,9	3,8	0,13	0,1
<b>Pecora</b>	15	4,1	7,3	0,19	0,1
<b>Scrofa</b>	14	6	8	0,21	0,15
<b>Gatta</b>	9,5	7,5	8,6	0,18	0,16
<b>Cagna</b>	9	7,5	9,6	0,24	0,18
<b>Coniglia</b>	6	11,5	15	0,61	0,38

Tabella 26- *Composizione del latte di mammiferi e tasso di crescita della prole* (Debraekeleer et al., 2010)

La cagna in lattazione, infatti, presenta un fabbisogno energetico giornaliero 2-4 volte superiore a quello di adulti non in lattazione (Grandjean e Paragon, 1986; Bebiak et al., 1987; Meyer et al., 1985), ovvero di circa 145 kcal DE (Energia digeribile)/PC(Peso corporeo espresso in kg)<sup>0,75</sup> (Meyer et al., 1985). Esso si compone del fabbisogno di mantenimento (in ogni caso più elevato del normale a causa dello stress e della cura dei cuccioli) e di quello della produzione di latte (Debraekeleer et al., 2010), ovvero circa 1200-1500 kcal/kg di latte prodotto. È fondamentale quindi fornire un alimento ad elevata densità energetica, altrimenti la cagna potrebbe non essere in grado di assumere la quantità di nutrienti necessaria a soddisfare gli elevati fabbisogni, con conseguente perdita di peso, minore produzione di latte e segni di stress (Meyer et al., 1985), questi ultimi più pronunciati in cagne di razza gigante con cucciolate molto numerose (Zentek e Meyer, 1992).

Un'alimentazione corretta permette alla fattrice di mantenere un BCS adeguato (2,5/5-3,5/5) e ai cuccioli di crescere con un normale tasso di accrescimento (Debraekeleer et al., 2010). Il migliore metodo per nutrire le madri in lattazione consiste nel lasciare un alimento altamente energetico e digeribile sempre a disposizione (Lewis et al., 1987), ad eccezione del caso in cui le cagne abbiano un solo cucciolo o manifestino una tendenza ad ingrassare.

### **3.4 Singoli nutrienti**

Visti gli aumentati fabbisogni, durante l'ultimo terzo della gravidanza ed in lattazione dovrà essere posta particolare attenzione a quantità e qualità dei singoli nutrienti (vedi tabella 27).

Il calcio ed il fosforo, ad esempio, sono fondamentali per la crescita scheletrica dei feti, per evitare l'inerzia uterina e prevenire l'eclampsia durante la lattazione; il fabbisogno di questi minerali aumenta del 60% durante l'ultima parte della gestazione (Debraekeleer et al., 2010). La quantità minima di calcio raccomandata durante questa fase è di circa 1% sulla sostanza secca (SS) secondo l'AAFCO (Association of American Feed Control Officials) e di 0,7%SS per quanto riguarda il fosforo (Debraekeleer et al., 2010), mantenendo un rapporto calcio:fosforo pari all'1,1:1-2:1. In lattazione il fabbisogno di calcio aumenta a causa della produzione di latte, fino a raggiungere 2-3 volte quello necessario al mantenimento di un adulto (Meyer, 1982): a seconda del numero della dimensione della cucciolata, una cagna dovrebbe essere alimentata con 250-500 mg di calcio e 175-335 mg di fosforo/kg di peso corporeo/ giorno. Tuttavia, la somministrazione eccessiva di calcio durante la gravidanza, a causa di scorrette integrazioni, può provocare calcificazione dei tessuti molli, deformità fetali e predisporre l'animale ad eclampsia durante la lattazione a seguito della diminuita attività delle paratiroidi (Smith, 1986; Grandjean et al., 2003).

Anche il fabbisogno proteico aumenta del 40-70% in gravidanza avanzata rispetto al mantenimento (Leibetseder, 1989); in particolar modo la qualità delle proteine dovrebbe essere superiore al fine di migliorare il vigore dei neonati e minimizzare la mortalità, poiché è dimostrato che una carenza proteica in gravidanza comporta scarso peso alla nascita, mortalità nelle prime 24 ore di vita e carente immunocompetenza dei cuccioli (Ontko e Phillips, 1958). Durante la lattazione, il fabbisogno proteico aumenta in proporzione più del fabbisogno energetico (Meyer et al., 1985). Il livello minimo raccomandato di proteina grezza nell'alimentazione di cagne gravide ed in lattazione è di 22%SS secondo l'AAFCO (2007), e dovrebbe aggirarsi intorno al 25-35%SS (Debraekeleer et al., 2010).

I lipidi forniscono gli acidi grassi essenziali ed influiscono sull'assorbimento delle vitamine liposolubili, oltre ad essere fondamentali a garantire la corretta densità calorica dell'alimento. Sebbene secondo l'AAFCO la concentrazione minima di lipidi nell'alimentazione di cagne gravide ed in lattazione dovrebbe essere pari all'8%SS, è raccomandabile che si aggiri intorno al 20%, almeno per razze di taglia gigante (Debraekeleer et al., 2010). In particolare, l'efficienza della lattazione è fortemente dipendente dalla presenza di lipidi nell'alimento: aumentando il contenuto lipidico alimentare dal 12 al 20%SS, il contenuto lipidico nel latte incrementa del 30% (Gross, 1993); dal momento che i cuccioli nascono con riserve energetiche molto basse, l'energia deve essere fornita loro tramite il latte.

Come evidenziato da numerose ricerche, soprattutto in medicina umana, gli omega-3 sono indispensabili per lo sviluppo neurologico: il DHA (acido docosaesanoico), in particolare, si trova in concentrazioni elevate nelle membrane delle sinapsi neuronali e nei segmenti esterni dei fotorecettori della retina (Blanchard, 2006) e supporta, quindi, durante l'ultimo trimestre di gravidanza ed il primo mese di vita, lo sviluppo della retina, dell'udito, del cervello e la capacità di apprendere (Diau et al., 2003; Birch et al., 2002). Nell'uomo, come nel cane, la desaturazione enzimatica fetale, però, è incapace di fornire sufficienti ed adeguati livelli di acidi grassi polinsaturi a lunga catena (Innis, 2008). Il DHA è trasferito al feto attraverso la placenta materna durante la gestazione, e continua a giungere al neonato, dopo la nascita, attraverso il latte materno. Risulta, quindi, di fondamentale importanza la dieta materna nel provvedere ad un adeguato e sufficiente livello di acidi grassi polinsaturi per lo sviluppo e la crescita di feto e neonato (Innis, 2008; Helland et al., 2006). Nel cane, in particolare, è stato dimostrato che l'integrazione con olio di pesce (fonte di DHA) nei cuccioli aumenta la capacità di addestramento (Kelley et al., 2004), e che la somministrazione di un alimento ricco di acidi grassi polinsaturi a lunga catena omega-3 nella cagna gravida ed in lattazione favorisce lo sviluppo retinico dei cuccioli (Bauer et al., 2006; Heinemann et al., 2005). È quindi raccomandabile includere fonti di DHA nelle fattrici, come il pesce, in modo da garantire in gestazione avanzata e lattazione almeno lo 0,05%SS di DHA e acido eicosapentanoico (EPA), come suggerito dagli standard NRC (Debraekeer et al., 2010).

<b>FATTORI</b>	<b>LIVELLI RACCOMANDATI DURANTE L'ACCOPIAMENTO</b>	<b>LIVELLI RACCOMANDATI PER GESTAZIONE/LATTAZIONE</b>
<b>Acqua</b>	Acqua fresca sempre disponibile	Acqua fresca sempre disponibile
<b>Densità energetica (kcal EM/g alimento)</b>	3,5-4,5	>4
<b>Proteina grezza (%SS)</b>	15-30	25-35
<b>Lipidi grezzi (%SS)</b>	10-20	>20
<b>DHA (%SS)</b>	-	0,05
<b>Carboidrati digeribili (%SS)</b>	>23	>23
<b>Calcio (%SS)</b>	0,5-1	1-1,7
<b>Fosforo (%SS)</b>	0,4-0,7	0,7-1,3
<b>Rapporto Ca:P</b>	1:1-5:1	1:1-2:1
<b>Digeribilità</b>	Alta	Alta

EM= energia metabolizzabile; kcal= kilocalorie; DHA= acido decosaesaenoico appartenente alla categoria degli acidi grassi essenziali omega-3.

Tabella 27- *Fattori nutrizionali chiave per cani in riproduzione* (Debraekeleer et al., 2010)



## **SEZIONE 3: QUESTIONARIO**

### **1 PREMESSA**

Come evidenziato nella presente tesi, la diagnosi differenziale in caso di disturbi riproduttivi delle cagne in allevamento prende in considerazione sia aspetti ginecologici che quelli zootecnici.

E' stato proposto a 27 allevatori canini un questionario allo scopo di indagare le caratteristiche e le modalità di gestione del proprio allevamento. Scopo dell'indagine è stato quello di valutare se tali parametri potessero essere in relazione con problemi riproduttivi eventualmente riscontrati in queste strutture.

Il questionario ha indagato principalmente 3 aspetti:

1. la presenza di problemi riproduttivi
2. le caratteristiche delle strutture
3. la gestione dell'allevamento

L'attenzione è stata posta inizialmente sulla rilevazione dei disordini riproduttivi tra gli allevamenti canini indagati e le possibili cause. Nella seconda parte del questionario, sono state valutate le caratteristiche delle strutture e dei ricoveri in quanto rappresentano un elemento chiave per garantire il benessere degli animali, in particolare delle fattrici e dei loro cuccioli. Allo stesso modo, una non adeguata gestione dell'allevamento, intesa come aspetti igienico-sanitari, alimentazione ed aspetti medico-veterinari, può essere responsabile di problemi del settore riproduttivo. Questa pertanto è stata oggetto di valutazione della terza parte del questionario.

## 2 MATERIALI E METODI

Il questionario proposto si compone di 39 domande, che sono di seguito riportate:

### PARTE 1: PROBLEMI RIPRODUTTIVI IN ALLEVAMENTO

- 1) Avete mai avuto problemi riproduttivi in allevamento?
- 2) Ed in particolare nell'ultimo anno?
- 3) In cosa consistono i problemi riproduttivi evidenziati nell'ultimo anno?
  - mancato concepimento
  - perdita degli embrioni (riassorbimento o aborto)
  - nati-morti
  - cuccioli morti pochi giorni dopo il parto
  -
- 4) Siete riusciti a capirne la causa?
- 5) Se sì, in che modo?
  - indagine all'istituto zooprofilattico
  - esperienza personale precedente
  - consigli da parte di amici/conoscenti
  - veterinario curante
  - altro (specificare)
  -
- 6) Quanto siete soddisfatti da 1 a 10 della fertilità nel vostro allevamento?

### PARTE 2: CARATTERISTICHE DELLE STRUTTURE

- 7) Qual è la densità massima per ogni box?
- 8) C'è un cortiletto adiacente al box per far muovere gli animali?
- 9) Esiste un'area di svago?
- 10) Se sì, quante ore/giorno vengono lasciati i cani correre?
- 11) Qual è il sistema di aerazione nei box?
  - naturale
  - artificiale
- 12) Quali sono i valori di umidità nei box (se conosciuti)?
- 13) E della temperatura nei box?
- 14) I cuccioli dopo la nascita vengono riscaldati? Con cosa?
- 15) Avete sistemi di raffreddamento dei box durante l'estate?

16) E sistemi di riscaldamento durante l'inverno?

17) Dove sono tenute le cagne in gestazione?

- nel solito box
- in un box-parto specifico
- 

Quali caratteristiche hanno questi box?

Da quando e fino a quando le femmine vengono accolte nel box-parto?

18) Sono stati fatti negli ultimi 2 anni cambiamenti alle strutture?

Quali?

19) Gli animali ne hanno risentito? Da cosa lo ha notato?

### PARTE 3: GESTIONE DELL'ALLEVAMENTO

20) Vengono applicati sistemi per la lotta ad insetti,acari,roditori?

- gatti contro i roditori
- esche rodenticide
- zanzariere e tendine
- insetticidi
- nessun metodo
- 

21) Quando entrano altre persone in allevamento,vengono prese delle precauzioni? Quali?

- calzari
- cuffie
- entrambi
- altro
- nessuna precauzione
- 

22) Esistono percorsi obbligati da seguire quando si entra in allevamento?

23) Ogni quanto vengono puliti i locali?

24) Ogni quanto vengono disinfettati?Con quali prodotti?

25) Che tipo di alimentazione usate?

- casalinga
- commerciale
- mista
- crocchette
- umido
- sia crocchette che umido
- mantenimento o diete specifiche
- 

26) Cambiano in gravidanza la tipologia di alimento e/o le dosi? Se sì, quando iniziate a cambiarle e fino a quando le mantenete?

- 27) Vengono date integrazioni alle cagne in gravidanza?
- 28) Le cagne scelte per la riproduzione vengono prima controllate? Se sì, a quali esami le sottoponete?
- 29) La monta è naturale o artificiale?  
Se naturale, con maschio interno o esterno all'allevamento?  
Se artificiale, con seme fresco, refrigerato o congelato?
- 30) Il calore viene seguito dal veterinario?
- no
  - con citologia
  - con dosaggio progesterone
  - con ecografia
  -
- 31) E la gravidanza?
- no
  - con rx
  - con ecografia
  - con dosaggio ormonale
  -
- 32) In prossimità del parto si pone maggiore attenzione alle cagne? Se sì, con quali accorgimenti?
- 33) Assistete sempre ai parti o solo in condizioni particolari? Se sì, restate dentro ai box oppure seguite il parto a distanza?
- 34) Le madri sono sempre regolarmente vaccinate? Se sì, con quale protocollo?
- 35) Viene fatta la prevenzione vaccinale per l'herpesvirus?
- 36) Fino a che età tenete le madri in riproduzione? Dopo quanti parti le escludete dalla riproduzione?
- 37) Le femmine che hanno avuto più di un episodio di distocia vengono escluse dalla riproduzione?
- 38) Vengono praticate terapie antibiotiche regolarmente in estro?  
Ed in prossimità del parto?
- 39) A seguito di episodi di mortalità dei cuccioli, sono effettuati esami per appurarne la causa del decesso?

La scelta degli allevatori cui sottoporre il questionario è stata effettuata senza restrizioni di razza o dimensione degli allevamenti, tramite ricerche effettuate online. Gli allevamenti indagati sono stati 27, tutti localizzati nel territorio della Regione Veneto.

La raccolta dei dati è stata effettuata in forma anonima, mediante contatto telefonico (16 allevamenti), via mail (10 allevamenti) o tramite visita in allevamento (1 caso).

### 3 RISULTATI

#### PARTE 1

Venti dei ventisette allevatori contattati hanno accettato di partecipare all'indagine. Dai risultati ottenuti, 19/20 dichiarano di aver avuto problemi di fertilità da quando è nato l'allevamento; tra questi, 9 riconoscono di averne riscontrati nell'ultimo anno. I disordini riproduttivi più frequentemente riscontrati nell'ultimo anno sono il mancato concepimento e la mortalità perinatale (vedi figura 21).

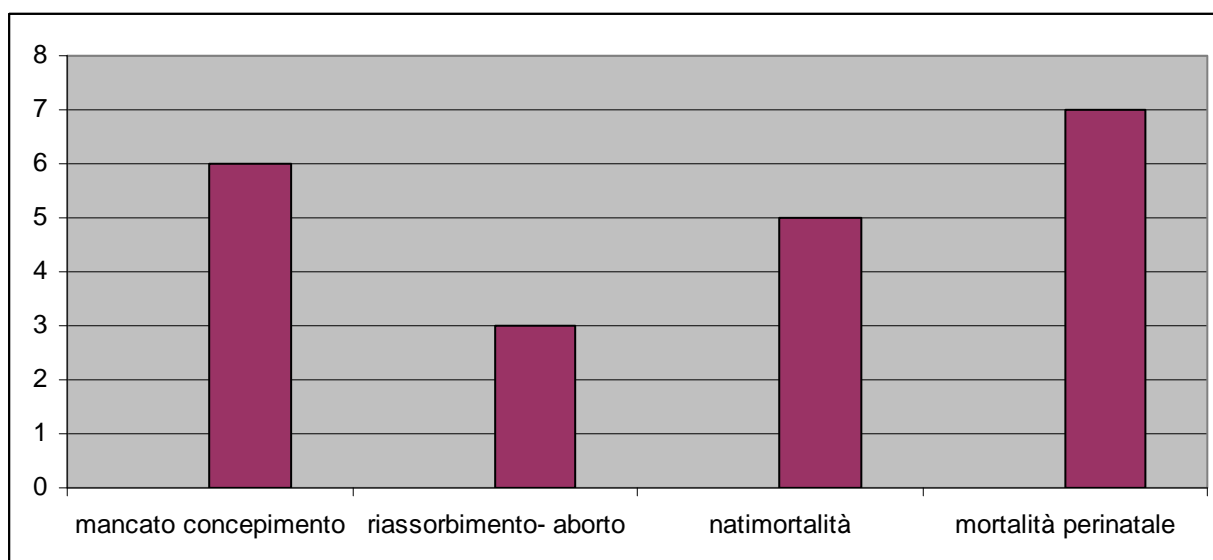


Figura 21- *Distribuzione dei disordini riproduttivi verificatisi nell'ultimo anno negli allevamenti indagati*

Otto/9 allevatori sostengono di conoscerne la causa e la figura 22 evidenzia come dichiarano di averla individuata. Cinque/8 si affidano all'esperienza personale o ai consigli di colleghi allevatori mentre solo 3 persone chiedono consiglio o effettuano indagini più approfondite con l'aiuto di figure competenti (veterinario o personale dell'istituto zooprofilattico).

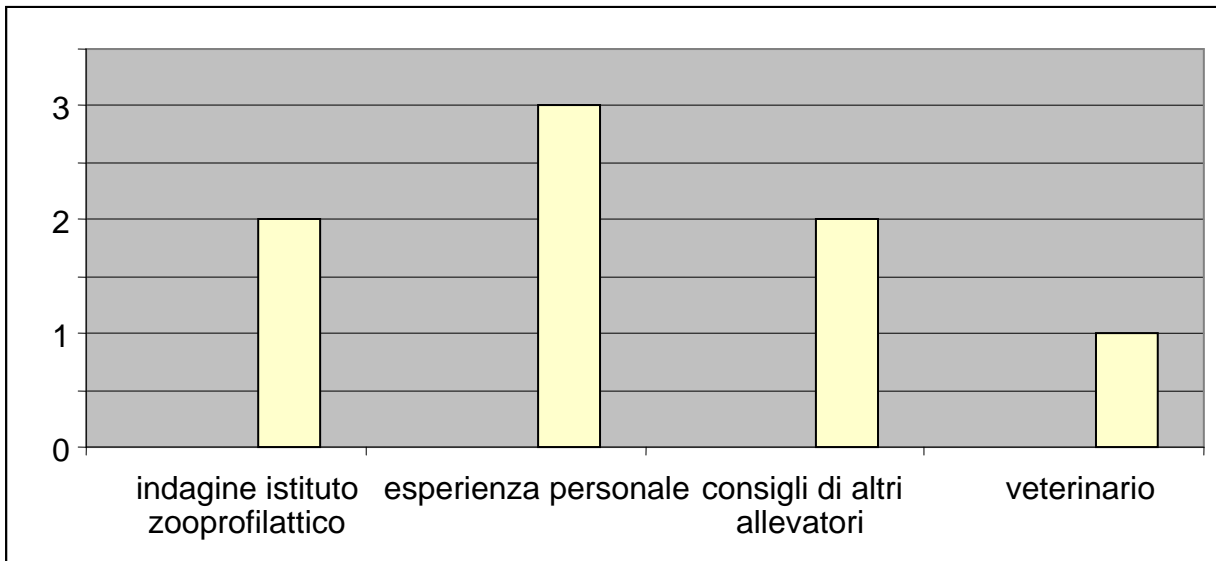


Figura 22- *Distribuzione della metodica con cui gli allevatori con disordini riproduttivi verificatisi nell'ultimo anno ne hanno individuato la causa*

Nei 2 allevamenti in cui sono state effettuate indagini presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale, le diagnosi sono state le seguenti: in un caso natimortalità e mortalità perinatale causati da Streptococchi, nell'altro caso riassorbimento-aborto, natimortalità e mortalità perinatale sono state imputate all'Herpesvirus canino. L'allevatore che ha effettuato indagini presso il veterinario dichiara che la causa di natimortalità e mortalità perinatale è stata una batteriemia generica. Per i restanti allevatori mancato concepimento, riassorbimento-aborto, natimortalità e mortalità perinatale sono imputabili a "cause batteriche" generiche (1/8) o ad errori di alimentazione delle cagne gravide (4/8); un allevatore specifica che pensa si tratti di cibo carente in acido folico e vitamina E.

In una scala da 1 a 10, 4/20 allevatori (20%) si ritengono molto soddisfatti (punteggio 9) della fertilità all'interno dell'allevamento, 7/20 allevatori hanno dichiarato punteggio 8 (35%), 4/20 punteggio 7 (20%) e 5/20 allevatori punteggio 6 (25%).

PARTE 2

<b>DOMANDA</b>	<b>OPZIONI DI RISPOSTA</b>	<b>DISTRIBUZIONE RISPOSTE</b>
Densità animali/box	1	12
	2	4
	≥ 3	4
Cortiletto adiacente box	Si	10
	No	10
Area di svago	Si	20
	No	0
Tempo trascorso dai cani in area di svago (ore/giorno)	Da mattina a sera	7
	6-8	13
	2-3	0
Sistema aerazione box	Naturale	18
	Artificiale	2
Valori umidità	Conosciuti	0
	Sconosciuti	20
Valori temperatura	12-14°C	15
	16-18°C	3
	> 20°C	2
Riscaldamento cuccioli dopo nascita	No	0
	Tappetini	2
	Lampade	18
	Incubatrici a disposizione	3
Sistemi raffreddamento in estate	Naturale	17
	Condizionatori	3
Sistemi riscaldamento in inverno	Termosifoni	3
	Stufette	10
	Lampade	5
	Nessuno	2
Cagne in gestazione	Solito box	12
	Box differente	8
Caratteristiche box cagne in gestazione	Casse da parto	11
	Barre anti-schiacciamento	7
	Nessuna	2
Periodo trascorso dalle cagne nei box adatti a gestazione	Da 10-15 giorni prima del parto a fine lattazione	18
	Da accoppiamento a fine lattazione	2
Cambiamenti apportati alle strutture negli ultimi 2 anni	Nessuno	15
	Interno box/ cortiletti	4
	Area di svago	1
Animali hanno risentito dei cambiamenti	No	4
	Si	1

Tabella 28- Distribuzione delle risposte inerenti alla gestione delle strutture negli allevamenti indagati

La tabella 28 illustra la gestione delle strutture da parte degli allevatori.

Nella maggior parte degli allevamenti gli animali sono alloggiati singolarmente nei box; 4/20 allevatori alloggiano 3 o più cani insieme, e 2 tra questi allevano gli animali in casa, con molto spazio a disposizione. Solo nel 50% degli allevamenti sono presenti dei cortiletti adiacenti al box, ma tutti hanno un'area di svago dove gli animali sono tenuti liberi per molte ore al giorno.

Il sistema di aerazione dei box è naturale e non vi sono sistemi di raffreddamento per l'estate, fatta eccezione per gli animali allevati in casa e per un allevatore che ha installato nelle aree di ricovero dei condizionatori. Durante l'inverno 18/20 allevatori ricorrono a sistemi di riscaldamento dei box (stufette, lampade, termosifoni), e la temperatura minima varia dai 12-14°C ai 16-18°C, tranne nel caso degli animali alloggiati in casa (dove supera i 20°C). I cuccioli dopo la nascita sono comunque sempre riscaldati, soprattutto tramite l'utilizzo di lampade ad infrarossi; 3/20 allevatori hanno a disposizione delle incubatrici per i cuccioli più deboli. Al contrario, la percentuale di umidità relativa nell'ambiente dove vivono gli animali non è rilevata da alcun allevatore, tuttavia un allevatore ha dichiarato di utilizzare dei deumidificatori in quanto trova i box molto umidi.

Otto/20 allevatori, sia tra coloro che utilizzano abitualmente box multipli sia tra coloro che allevano gli animali in casa, alloggiano le cagne in gravidanza in box (o stanze) differenti, dove sono sole e quindi più tranquille. In ogni caso tutti i box delle cagne gravide presentano alcune caratteristiche: il pavimento è sempre rivestito con cotone o altro materiale assorbente (generalmente carta o segatura), sono presenti coperte ed in 18/20 allevamenti sono allestite casse da parto o cucce provviste di barre anti-schiacciamento. Uno/20 allevatori ha dotato i locali destinati alle cagne gravide di pareti in legno e pavimento in linoleum. Il cambiamento del box o il trasferimento nel nuovo ambiente avviene a partire da circa 10-15 giorni prima del parto fino a fine lattazione, tranne in 2/20 allevamenti in cui le cagne vengono spostate in box singoli fin dall'accoppiamento.

Cinque/20 allevatori dichiarano di aver operato recentemente dei cambiamenti strutturali all'interno dell'allevamento (in tutti i casi si tratta di rifacimenti generici all'interno dei box o dell'area di svago), ma soltanto uno di questi sostiene di aver notato dei vantaggi negli animali che manifestano più voglia di giocare.

### PARTE 3

Per quanto riguarda le prassi igieniche, le figure 23 e 24 illustrano le metodiche utilizzate dagli allevatori come prevenzione nei confronti dei potenziali vettori di microrganismi: 15/20 allevatori non applicano alcuna strategia preventiva nei confronti di insetti/acari/roditori, 5/20 allevatori non adottano alcuna strategia preventiva quando entrano persone in allevamento. Solo un allevatore ha istituito percorsi obbligati da seguire durante la visita e la pulizia dell'allevamento, in particolare effettua sempre il passaggio nel settore maternità per primo e quello nel settore geriatrico per ultimo.

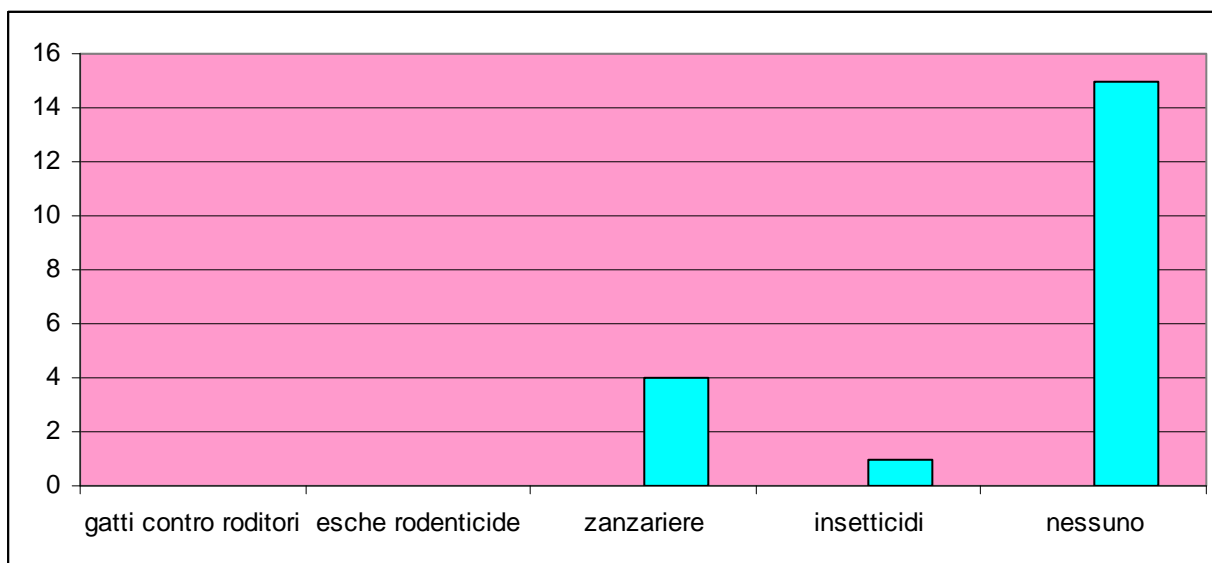


Figura 23- Distribuzione delle metodiche per la lotta ad insetti /acari/roditori applicate negli allevamenti indagati

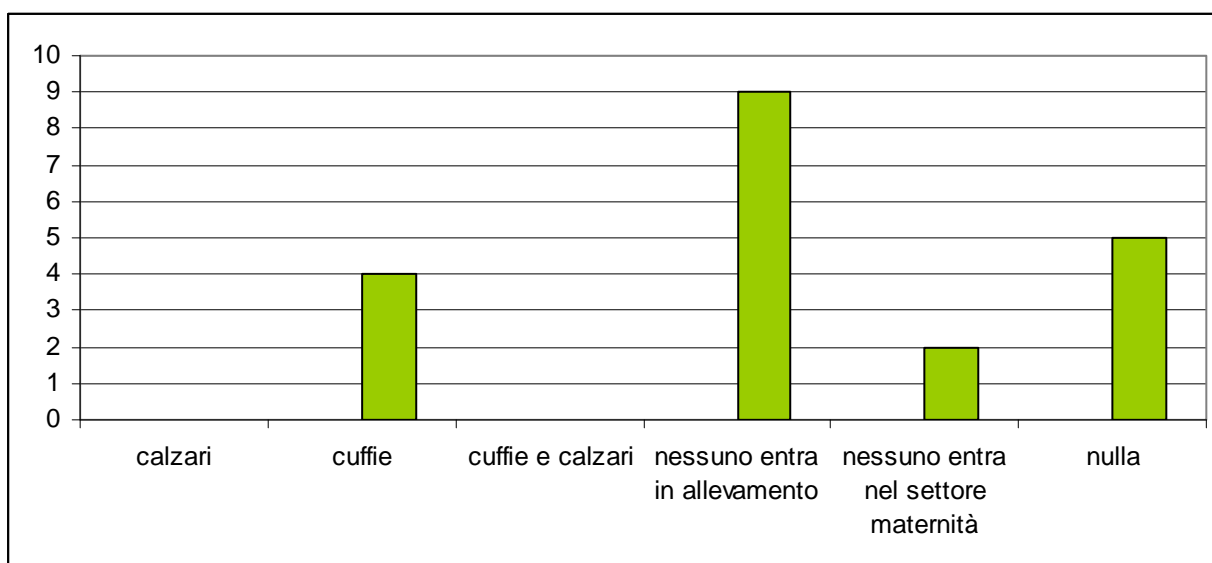


Figura 24- Distribuzione delle metodiche preventive quando entrano persone in allevamento applicate negli allevamenti indagati

Tutti gli allevatori detergono e/o disinfettano ogni giorno i box o i locali della casa dove sono alloggiati gli animali: 12/20 usano acqua e candeggina, 6/20 acqua e disinfettanti comunemente utilizzati per la pulizia della casa (a base di ipoclorito di sodio- come candeggina-), 2/20 solo acqua e detergente, ma disinfettano ogni settimana con prodotti a base di sali quaternari; 1 allevatore disinfetta inoltre mensilmente con steramina ed alcol.

L'alimentazione si basa in tutti gli allevamenti su preparazioni commerciali di mantenimento, in particolare mangime secco in 15/20 allevamenti e misto (secco+umido) nei restanti 5/20. Tutti gli allevatori modificano la tipologia di alimento da somministrare alle cagne in gravidanza a partire dal 40-45° giorno di gestazione fino a fine lattazione, utilizzando un mangime "starter" (lo stesso utilizzato per lo svezzamento dei cuccioli). Un allevatore, inoltre, ricorre ad un mangime di mantenimento ma ricco di acido folico e vitamina E dal calore al 40° giorno di gravidanza. Solo 2/20 allevatori somministrano integrazioni vitaminiche dal calore a fine lattazione.

Tre/20 allevatori effettuano esami particolari sulle cagne prima della monta (e.g. esame emocromocitometrico, ecocardiografia ed ecografia addominale), 2/20 allevatori sottopongono le fattrici solo ad un esame fisico generico.

La monta è naturale in 15/20 allevamenti, in particolare 10/15 utilizzano un maschio interno e 5/15 utilizzano un maschio esterno all'allevamento; i restanti 5/20 allevatori ricorrono ad inseminazione artificiale con seme fresco. Le metodiche di monitoraggio del calore (per individuare il momento dell'ovulazione) e della gravidanza sono illustrate nelle figure 25 e 26. Il calore viene seguito nella maggior parte degli allevamenti, ma solo 5/20 allevatori ricorrono sia a citologia vaginale che al dosaggio del progesterone; 2/20 allevatori effettuano in casi particolari (cagne che hanno avuto precedenti difficoltà a rimanere gravide) anche un esame ecografico addominale per monitorare lo sviluppo dei follicoli. La gravidanza viene monitorata da tutti gli allevatori con una radiografia verso il 45-50° giorno, ed inoltre 7/20 effettuano più di un esame ecografico durante la gestazione (tutti gli altri allevatori eseguono comunque esami ecografici solo se la cagna ritarda il parto o presenta segni di malessere).

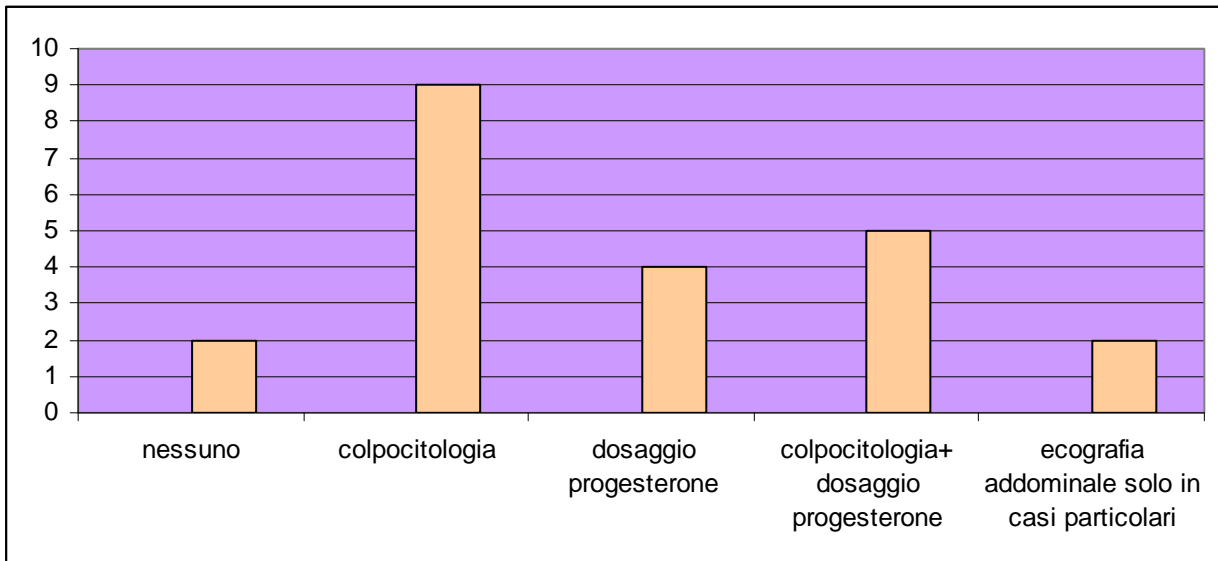


Figura 25- Distribuzione delle metodiche di monitoraggio del calore negli allevamenti indagati

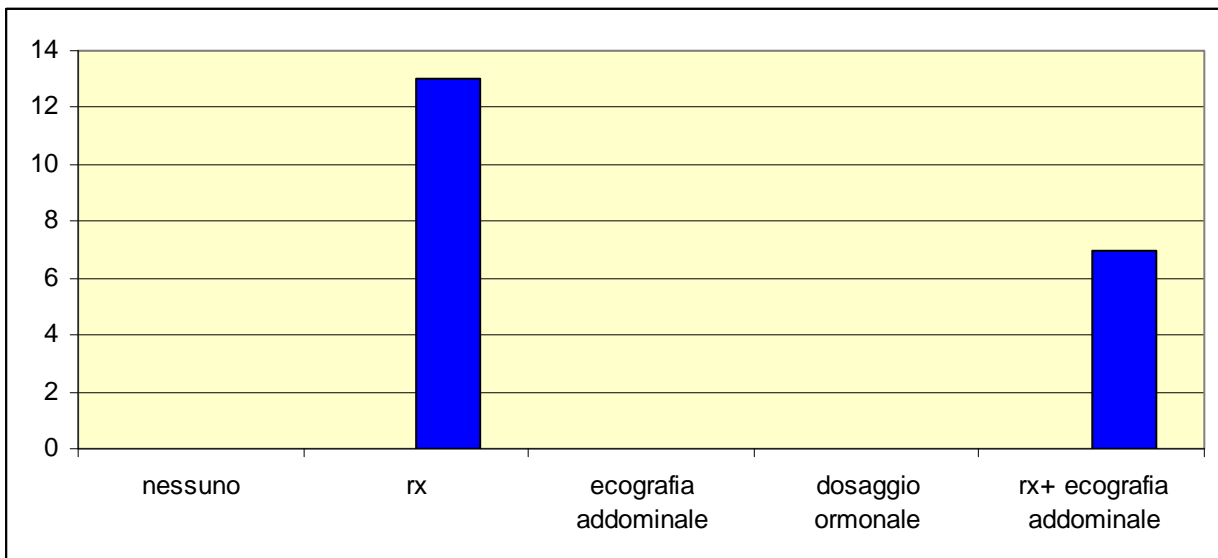


Figura 26- Distribuzione delle metodiche di monitoraggio della gravidanza negli allevamenti indagati

In prossimità del parto 7/20 allevatori pongono particolare attenzione alle cagne misurando regolarmente la temperatura rettale (4 di questi allevano razze ad elevato rischio di distocia, ovvero Boxer e Chihuahua). Il parto viene seguito direttamente all'interno del box da 5/20 allevatori (4 dei quali sono quelli di Boxer e Chihuahua), esternamente da 12/20, mentre 3/20 non seguono regolarmente i parti.

Tutte le fattrici sono vaccinate contro cimurro, epatite infettiva, parvovirosi, parainfluenza, leptospirosi; 18/20 allevatori provvedono anche alla vaccinazione antirabbica; solo 5/20 allevatori anche a quella contro Herpesvirus in quanto gli altri non la ritengono efficace.

Diciassette/20 allevatori tengono le fattrici in riproduzione fino a 7 anni: di questi, 15/17 consentono un massimo di 5-6 parti (in caso di cesareo 2/15 allevatori riducono a 3 le gravidanze), 2/17 solo 2-3, mentre 3/20 allevatori tengono le fattrici in riproduzione fino a 5 anni, con un massimo di 4 cucciolate. In caso di distocia ricorrente (più di due volte), tutti gli allevatori eliminano le fattrici dalla riproduzione, tranne che in 4/20 allevamenti di razze predisposte al fenomeno.

Solo 2/20 allevatori effettuano regolarmente terapie antibiotiche preventive in cagne in prossimità del parto.

Due/20 allevatori dichiarano di richiedere esami specifici presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale ogniqualvolta si manifestino aborti, natimortalità o mortalità neonatale in circostanze particolari (inaspettati, ricorrenti o che interessino più di un cucciolo), 9/20 effettuano la richiesta solo in caso di morte ricorrente di più cucciolate, 9/20 non ricercano la causa mediante esami specifici.

## 4 DISCUSSIONE

Lo scopo di sottoporre il questionario agli allevatori è stato quello di raccogliere determinate informazioni relativamente ai disturbi riproduttivi all'interno degli allevamenti e ai fattori potenzialmente in grado di causarli. Dalla raccolta dei dati emerge che i disordini riproduttivi sono un problema diffuso negli allevamenti canini (la totalità degli allevatori intervistati ha dichiarato di averne avuti, e molti anche nell'ultimo anno), in particolare problemi di mancato concepimento e mortalità neonatale. Risulta interessante il ruolo-chiave che assume l'alimentazione secondo gli allevatori stessi: sebbene non siano state effettuate indagini accurate da quasi nessun allevatore (la maggior parte delle informazioni deriva da esperienza personale o da consigli di altri allevatori), 4/9 allevatori con problemi riproduttivi nell'ultimo anno dichiarano che la causa di mancato concepimento, riassorbimento-aborto, natimortalità e mortalità neonatale sia imputabile a squilibri nutrizionali. Questa deduzione non è in però in accordo con le scelte nutrizionali applicate in allevamento, dal momento che tutti gli allevatori intervistati cambiano l'alimentazione delle cagne gravide (scegliendone una più adatta allo stato fisiologico, i.e. alimento starter o per cuccioli in accrescimento) a partire dal 40-45° giorno di gestazione, come suggerito da Grandjean et al. (2003). La gestione degli animali nei box (fattrici in estro, in gravidanza, neonati) appare corretta sia dal punto di vista sanitario che da quello del benessere. I cani sono allevati in box singoli o con una bassa densità di soggetti, ma hanno la possibilità di accedere insieme all'area di svago per molte ore al giorno. Infatti, nonostante il comfort offerto dagli alloggi, l'accesso ad un'area di svago resta indispensabile per l'equilibrio psico-fisico dei cani confinati in un recinto, i quali necessitano di trascorrere del tempo insieme all'aperto per non stressarsi (Grandjean et al., 2003; Beerda et al., 1999). La temperatura è adeguata in tutti gli allevamenti, in particolare nel settore maternità i neonati vengono ulteriormente riscaldati con lampade, tappetini ed incubatrici, al fine di mantenere un'adeguata temperatura corporea (Davidson, 2003): questo fattore è indispensabile nella prevenzione della sindrome da ipotermia/ipoglicemia/disidratazione e delle patologie infettive, responsabili di notevoli perdite nelle cucciolate. La gestione dei neonati, quindi, non rappresenta una problematica negli allevamenti indagati. Le cagne a fine gestazione, inoltre, sono alloggiare singolarmente, il pavimento dei locali coperto con cotone o materiale assorbente, sono presenti coperte, e in 18/20 allevamenti nei box sono inserite apposite casse o sbarre anti-schiacciamento. È importante creare un ambiente tranquillo e confortevole per le cagne che devono partorire, al fine di garantire le migliori condizioni nel momento del parto e della successiva lattazione: gli allevatori pongono attenzione a questo aspetto, che quindi non necessita di essere corretto. La pulizia è giornaliera, e la candeggina si conferma il disinfettante più comunemente utilizzato: in realtà, sarebbe più efficace ricorrere ad un comune detergente giornalmente, ed utilizzare il

disinfettante ogni 3-4 giorni (anche perché la candeggina è inattivata da sostanze organiche, e quindi è necessario pulire prima a fondo il locale) (Casseleux, 2006). Per quanto riguarda la prevenzione delle contaminazioni, è rilevante il fatto che 9/20 allevatori non consentano ad estranei l'accesso in allevamento ed 1/20 non permette l'entrata nel settore maternità; nonostante ciò, un solo allevatore prevede dei percorsi obbligati per il personale (durante distribuzione di cibo, pulizia, controlli) con il passaggio nel settore maternità per primo rispetto agli altri, come invece raccomandato da Grandjean et al. (2003). Inoltre, 15/20 allevatori non applicano alcuna strategia preventiva nei confronti di insetti/acari/roditori, e tra questi rientrano 8 dei 9 allevatori che hanno avuto problemi riproduttivi nell'ultimo anno. Va evidenziato il fatto che insetti, acari e roditori sono possibili veicoli di micorganismi responsabili dell'insorgenza di patologie infettive che provocano disturbi riproduttivi (quali Leishmaniosi, Toxoplasmosi, Pasteurellosi, Salmonellosi, Leptosirosi), e quindi è fondamentale applicare delle strategie preventive per limitare l'accesso di questi in allevamento (Grandjean et al., 2003).

Diciotto/20 allevatori effettuano il monitoraggio del calore delle fattrici presso un veterinario, ma è interessante osservare che 13/18 ricorrono esclusivamente al dosaggio del progesterone (4) o alla citologia vaginale (9): proprio tra questi, 5/18 hanno dichiarato di aver avuto problemi di fertilità legati al mancato concepimento, e 2 tra questi ultimi ricorrono ad inseminazione artificiale con seme fresco. È importante sottolineare che questi test per la rilevazione del momento adatto all'accoppiamento sono più efficaci se utilizzati insieme: in particolar modo la citologia vaginale risente di notevole variabilità tra soggetti (Luchetti et al., 2005; Lindsay e Concannon, 1986), soprattutto nel caso in cui si utilizzi inseminazione artificiale, poiché l'individuazione del giorno dell'ovulazione deve essere il più precisa possibile per migliorare il tasso di concepimento (Levy and Fontbonne, 2007; Linde-Forsberg e Forsberg, 1993; Johnston et al., 2001).

Gli allevatori che pongono maggiore attenzione alle cagne in prossimità del parto (misurando ad esempio la temperatura rettale) e che osservano il parto direttamente dentro ai box sono quasi esclusivamente quelli che allevano razze a rischio di distocia, probabilmente perché ritengono indispensabile un monitoraggio più attento.

Un'osservazione particolare è quella relativa al fatto che solo 5/20 allevatori effettuano profilassi vaccinale nei confronti dell'Herpesvirus canino: tutti gli altri hanno dichiarato di essere certi (per convinzione personale, senza aver effettuato indagini precise) di non avere cagne affette da Herpesviroosi, e che la vaccinazione non è in ogni caso efficace, ma non sono stati in grado di specificarne la motivazione. Fenomeni di riassorbimento-aborto, natimortalità e mortalità neonatale senza la presenza di segni patognomonicamente indicativi proprio della presenza di questo virus. I neonati, infatti, talvolta muoiono dopo aver manifestato solo scarso accrescimento,

vomito/diarrea, difficoltà respiratorie (Ronsse et al., 2005; Davidson, 2003; Nauwynck, 2010), motivo per cui la presenza del patogeno negli allevamenti dovrebbe venire sempre esclusa quando si ha mortalità neonatale. Solo 2/20 allevatori richiedono esami specifici all'Istituto Zooprofilattico Sperimentale per riconoscere la causa di sospetti aborti, natimortalità o mortalità neonatale (uno dei quali è quello che ha individuato nell'Herpesvirosi la causa di problemi riproduttivi nell'allevamento e che non effettuava regolarmente la vaccinazione fino ad allora). Nove/20 allevatori indagano sull'eziologia solo se muoiono molteplici cucciolate e 9/20 dichiarano di non effettuare mai esami specifici. La prevenzione delle patologie infettive è fondamentale negli allevamenti, ed una metodica certamente efficace è quella di individuare la presenza degli agenti eziologici per poter applicare la migliore terapia sui soggetti ancora vivi (Rota et al., 2009), e mettere a punto una adeguata profilassi al fine di limitare ulteriori future perdite.

L'età massima in cui le cagne sono eliminate dalla riproduzione si aggira intorno ai 5-7 anni, in accordo con i dati che indicano un calo della fertilità proprio a partire da questa età (Christiansen, 1984; Johnson et al., 1987), ma tutti gli allevatori sostengono di non far più riprodurre fattrici che manifestino almeno due episodi di distocia. Questo è molto importante, data l'ereditabilità del fenomeno (Jones e Joshua, 1988).

Infine, è emerso che 2/20 allevatori somministrano terapie antibiotiche alle cagne in prossimità del parto: questo impiego indiscriminato è segnalato in numerosi allevamenti (sebbene in questa indagine risulti limitato), ma si dimostra allo stesso tempo spesso infruttuoso e nocivo, in quanto responsabile dello sviluppo di antibioticoresistenza, come risulta da studi effettuati sui microrganismi isolati dagli organi di cuccioli morti in seguito a setticemia, dal tratto vaginale e dal latte delle cagne nel peripartum (Rota et al., 2009; Milani et al., 2008; Corrà et al., 2009).

In conclusione, l'indagine effettuata non permette di stabilire con certezza quali sono le possibili cause di infertilità all'interno degli allevamenti di cani. Il questionario ha però consentito di suggerire alcune ipotesi, che andrebbero confermate tramite ulteriori indagini in allevamento. Dallo studio è infatti emerso che alcuni aspetti del management delle cagne in riproduzione viene gestito in modo non corretto da alcuni allevatori; in particolare, i punti più rilevanti sono le scorrette prassi igienico-sanitarie, la mancanza di indagini sulla ricerca dei microrganismi responsabili di disturbi riproduttivi, l'assenza di una profilassi vaccinale nei confronti dell'Herpesvirus canino ed il monitoraggio del calore esclusivamente tramite dosaggio del progesterone o citologia vaginale.

Il limite principale che si evince corrisponde all'esiguo numero di risposte fornite dagli allevatori, ma potrebbe essere migliorabile attraverso una diversa modalità di somministrazione del questionario, utilizzando ad esempio altri metodi che non implicino un contatto telefonico. Dall'altra parte, il focalizzarsi su un corretto metodo di indagine allarga le possibilità di ottenere un

cospicuo database: i dati ottenuti da questo questionario potrebbero essere utili a fini statistici, per ottenere una fotografia sullo stato attuale del management dell'allevamento canino in ambito regionale, con la previsione sul medio-lungo periodo di avere dati ottenibili dall'intero territorio italiano. Inoltre, sempre sul lungo periodo, tale approccio potrebbe esser utilizzato per ottenere un'anamnesi di allevamento durante le visite *in loco*, così da uniformare l'approccio anamnestico in strutture contenenti animali da compagnia adibiti però ad un utilizzo più tipicamente zootecnico. Dal momento che i disturbi di fertilità nell'allevamento canino sono responsabili di notevoli perdite produttive, ascrivibili sia al mancato concepimento che all'aborto o alla mortalità nel peripartum, indagini effettuate sui possibili fattori manageriali coinvolti e sulle alternative ai fini di migliorare le performance riproduttive possono risultare utili anche agli allevatori e al veterinario coinvolto nella risoluzione del problema.

## BIBLIOGRAFIA

- Andersen K.: Insemination with frozen dog semen based on a new insemination technique, *Reprod Dom Anim*, vol.10, pag.1-4, 1975
- Andersen A.C., Simpson M.E.: Pathology of the ovary and genital tract, in Andersen A.C., Simpson M.E. (eds): *The Ovary and Reproductive Cycle of the Dog (Beagle)*, Los Altos, CA, Geron-X, pag.247, 1973 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Anvik J.O.: Clinical considerations of *Canine Herpesvirus* infection. *Vet Med*, vol.4, pag.394-403, 1991
- Aras Z., Uçan U.S.: Detection of *Brucella canis* from inguinal lymph nodes of naturally infected dogs by PCR, *Theriogenology*, vol.74, pag.658-662, 2010
- Arbeiter K.: Anovulatory ovarian cycles in dogs, *J Reprod Fertil Suppl*, vol.47, pag.453-456, 1993
- Arbeiter K., Dreier H.K.: Pathognomonic symptoms and possible methods of treating suboestrus, anoestrus and anaphrodisia in breeding bitches, *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, vol.85, pag.341-344, 1972 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Archbald L.F. Baker, B.A., Clooney, L.L., Godke, R.A.: A surgical method for collecting canine embryos after induction of oestrus and ovulation with exogenous gonadotropins, *Vet Med Small Anim Clin*, vol.75, pag.228, 1980 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Archbald L.F., Wolfsdorf K.: Theriogenology question of the month: vaginal constriction, *J Am Vet Med Assoc*, vol.208, pag.1651-1652, 1996 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Arnold S., Arnold P., Concannon P.W.: Effect of duration of PMSG treatment on induction of oestrus, pregnancy rates, and the complications of hyperestrogenism in dogs, *J Reprod Fertil Suppl*, vol.39, pag.115-122, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Atkins C.E.: Disorders of glucose homeostasis in neonatal and juvenile dogs: hypoglycaemia-part II, *Compend Contin Educ Pract Vet*, vol.6, pag.358, 1984 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Baba E., Hata H., Fukata T., Arakawa A.: Vaginal and uterine microflora of adult dogs, *Am J Vet Res*, vol. 44, pag. 606, 1983 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Bagcigil A.F., Ikiz S., Dokuzeylu B., Basaran B., Or E., Ozgur N.Y.: Fecal shedding of *Salmonella* spp. in dogs, *J Vet Med Sci*, vol.69, pag.775-777, 2007
- Barber J.S., Trees A.J.: Naturally occurring vertically transmission of *Neospora caninum* in dogs, *Inter J Parasitol*, vol.28 (1), pag.57-64, 1998

Barner D.: Vaginal disorders in the bitch, Doctoral Thesis, Universitäts Bibliothek Berlin, available online <http://www.diss.fu-berlin.de>, (abstract) 2008

Barnett J.L., Winfield G.C., Cronin G.M., Hemsworth P.H., Devar A.M.: The effect of individual and group housing on behavioural and physiological responses related to the welfare of pregnant pigs, *Appl Anim Behav Sci*, vol.14 (2), pag.1549-161, 1985

Bauer J.E., Heinemann K.M., Lees G.E.: Retinal functions of young dogs are improved and maternal plasma phospholipids are altered with diets containing long-chain n-3 polyunsaturated fatty acids during gestation, lactation, and after weaning, *J Nutr*, vol.136, pag.1991s-1994s, 2006

Beale K.M., Bloomberg M.S., Van Gilder J., Wolfson B.B., Keisling K.: Correlation of racing and reproductive performance in greyhounds with response to thyroid function testing, *J Am Anim Hosp Assoc*, vol.28, pag.263-269, 1992

Bebiak D.M., Lawler D.F., Reutzel L.F.: Nutrition and management of the dog, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol.17, pag.503-533, 1987 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*

Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hooff J.A.R.A.M., De Vries H.W.: Manifestations of chronic and acute stress in dogs, *Appl Anim Behav Sci*, vol.53, pag.307-319, 1997

Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., Mol J.A.: Chronic stress in dogs subjected to social and spatial restriction. I. Behavioral responses, *Phis Behav*, vol.66, pag.233-242, 1999

Beerda B., Schilder M.B.H., Van Hoff J.A.R.A.M., De Vries H.W., Mol J.A.: Behavioural and hormonal indicators of enduring environmental stress in dogs, *Anim Welf*, vol.9, pag.49-62, 2000

Beijerink N.J., Buijtel J.J.C.W.M., Okkens A.C., Kooistra H.S., Dieleman SZ.J.: Basal and GnRH-induced secretion of FSH and LH in anestrus versus ovariectomized bitches, *Theriogenology*, vol.67, pag.1039-1045, 2007

Bennett D.: Normal and abnormal partuition, in Morrow D.A. (ed): *Therapy in Theriogenology*, Philadelphia, WB saunders, pag.595-606, 1980 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Bergström A., Nödttvedt A., Lagerstedt A.S., Egenvall A.: Incidence and breed predilection for dystocia and risk factors for Caesarian section in a Swedish population of insured dogs, *Vet Surg*, vol.35, pag.786-791, 2006

Berthelot X., Garin Bastuji B.: Canine Brucellosis, *Point Vet*, vol.25, pag.125-129, 1993

Birch E.E., Hoffman D.R., Casteneda Y.S.: A randomized controlled trial of long-chain polyunsaturated fatty acid supplementation of formula in term infants after weaning at 6 wk of age., *Am J Clin Nutr*, vol.75, pag.570-580, 2002

Blanchard D.S.: Fatty acid supplementation, *MCN Agosto* 2006

Blunden T.S.: The neonate: congenital defects and fading puppies, in Simpson G.M., England G.C.W., Harvey M. (eds): Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology, BSAVA, Cheltenham, pag.143-152, 1998

Bjurström L., Linde-Forsberg C.: Long term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches, Am J Vet Res, vol. 53 (5), pag. 665-669, 1992

Boggiatto P.M., Gibson-Corley K.N., Metz K., Gallup J.M., Hostetter J.M., Mullin K., Petersen K.A.: Transplacental transmission of *Leishmania infantum* as a means for continued disease incidence in North America, PLoS Neglected Tropical Disease, vol.5 (4), available online: e1019 doi:10.1371/journal.pntd.0001019, 2011

Borge K.S., Tonnessen R., Nodtvedt A., Indrebo A.: Litter size at birth in purebred dogs: a retrospective study of 224 breeds, Theriogenology, vol.75, pag.911-919, 2011

Bouchard G., Plata-Madrid H., Youngquist R.S., Buening G.M., Ganjam V.K., Krause G.F., Allen G.K., Paine A.L.: Absorption of an alternate source of immunoglobulin in pups, Am J Vet Res, vol.53, pag.230-233, 1992

Bouchard G.F., Solorzano N., Concannon P.W., Youngquist R.S., Bierschwal C.J.: Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology, and elisa for progesterone, Theriogenology, vol.35, pag.603-611, 1991

Bouchard G., Youngquist R.S., Clark B., Concannon P.W., Braun W.F.: Estrus induction in the bitch using a combination of diethylstilbestrol and FSH, Theriogenology, vol.36, pag.51, 1991a *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Breen, K.M., Billings, H.H., Wagenmaker, E.R., Wessinger, E.W., Karsch, F.J.: Endocrine basis for disruptive effects of cortisol on preovulatory events, Endocrinology, vol.146, pag.2107-2115, 2005

Brugger N., Otzdorff C., Walter B., Hoffmann B., Braun J.: Quantitative determination of progesterone in canine blood serum using an enzyme-linked fluorescence assay, Repr Dom Anim, vol.46 (5), pag.870-873, 2011

Bulgin M.S., Ward A.C., Sriranganathan N., Saras P.: Abortion in the dog due to *Campylobacter species*, Am J Vet Res, vol.45, pag.555-556, 1984

Burr P.D., Campbell M.E.M., Nicolson L.: Detection of *Canine Herpesvirus-1* in a wide range of tissues using the polymerase chain reaction, Vet Microbiol, vol.53, pag.227-237, 1996

Carmichael L.E.: Neonatal viral infections of pups: *Canine Herpesvirus* and Minute virus of canines (*Canine Parvovirus-1*), in Carmichael L.E. (ed): Recent Advances in Canine Infectious Diseases, International Veterinary Information Service, 1999

Carmichael L.E., Greene C.E.: Canine brucellosis, in Greene C.E. (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat, WB Saunders, Philadelphia, pag.573, 1998

Carmichael L.E., Greene C.E.: *Canine Herpesvirus* infection, in Greene C.E. (ed): Infectious Diseases of the Dog and Cat, WB Saunders, Philadelphia, 1998a

- Carmichael L.E., Joubert J.C.: Transmission of *Brucella canis* by contact exposure, Cornell Vet, vol.78, pag.63-73, 1988 IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004
- Carmichael L.E., Kenney R.M.: Canine abortion caused by *Brucella canis*, J Am Vet Assoc, vol.152, pag.605-616, 1968 IN: Wanke M.M.: *Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci*, vol.82-83, pag.195-207, 2004
- Carmichael L.E., Schlafer D.H., Hashimoto A.: Pathogenicity of Minute Virus of Canines (MVC) for the canine fetus, Cornell Vet, vol.81, pag.151-171, 1991
- Carmichael L.E., Shin S.J.: Canine brucellosis: a diagnostician's dilemma, Semin Vet Med Surg, vol.11, pag.161-165, 1996
- Carmichael L.E., Zoha S.J., Flores Castro R.: Biological properties and dog response to a variant (M-) strain of *Brucella canis*, Dev Biol Stand, vol.56, pag.649-656, 1983
- Carter S.: Neuroendocrinology of sexual behaviour in the female, in Becker J., Breedlove S., Crews D. (eds): Behavioral endocrinology, Cambridge, MIT Press, pag.131, 1992 IN: Wingfield J.C., Sapolsky R.M.: *Reproduction and resistance to stress: when and how*, J Neuroend, vol.15, pag.711-724, 2003
- Case L.P., Carey D.P., Hirakawa D.A., Daristotle L.: Canine and feline nutrition, 2<sup>nd</sup> ed, ed. Mosby, 1995
- Casseleux G.: Prevention of diseases in breeding kennels, in Proceedings of 5<sup>th</sup> Biannual Congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), Budapest, Hungary, pag.233-239, 2006
- Castro R.F., Carmichael L.E.: *Brucella canis* infection in dogs: treatment trials, Rev Latinoam Microbiol, vol.23, pag.75-79, 1981 IN: Wanke M.M.: *Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci*, vol.82-83, pag.195-207, 2004
- Chaffaux S., Locci D., Pontois M.: Induction of ovarian activity in anoestrus beagle bitches, Br Vet J, vol.140, pag.1919-195, 1984 IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: *Canine and feline theriogenology*, Saunders Company, Philadelphia, 2001
- Chamberlain D.M., Doctor F.L., Cole C.R.: Toxoplasmosis: intra-uterine infection in dogs, premature birth and presence of organisms in milk, Proc Soc Exp Biol Med, vol.82, pag.198-200, 1953 IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: *Canine and feline theriogenology*, Saunders Company, Philadelphia, 2001
- Chatdarong K., Tummaruk P., Sirivaidyapong S., Raksil S.: Seasonal and breed effects on reproductive parameters in bitches in the tropics: a retrospective study, J Small Anim Pract, vol.48, pag.444-448, 2007
- Ching M.: Morphine suppresses the proestrus surge of GnRH in pituitary portal plasmas of rats, Endocrinology, vol.112, pag.2209-2211, 1983
- Christiansen A.: Reproduction in the dog and cat, ed. Harcourt Canada, Limited, 1984

- Cinone M., Aiudi G., Lacalandra G. M.: Termination of pregnancy in the bitch by means of PGF2 $\alpha$ -gel and cabergoline administration, in Proceedings Advances in Dog, Cat and Exotic Carnivore Reproduction, Oslo, pag.109, 2000
- Cole R.A., Lindsay D.S., Blagburn B.L., Sorjonen D.C., Dubey J.P.: Vertical transmission of *Neospora caninum* in dogs, J Parasitol, vol.81, pag.208-211, 1995
- Concannon P.W.: Use of DES, gonadotropins, GnRH, GnRH agonists and dopamine agonists for rapid induction of fertile estrus in dogs, in Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Theriogenology, Jacksonville, Nashville, Society for Theriogenology, pag.196-200, 1993 IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: *Canine and feline theriogenology*, Saunders Company, Philadelphia, 2001
- Concannon P.W.: Canine pregnancy: predicting parturition and timing events of gestation, in Concannon P.W., England E., Verstegen J. (eds): *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2002
- Concannon P.W., Battista M.: Canine semen freezing and artificial insemination, in Kirk R.W.(ed): *Current Veterinary Therapy X*, Saunders, Philadelphia, pag. 1247-1259, 1989 IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004
- Concannon P.W., Hansel W., Visek W.J.: The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone, Biol Reprod, vol.13 (1), pag.112-121, 1975
- Concannon P.W., Verstegen J.: Estrus induction in dogs: use of of gonadotropin therapies and dopamine agonists, in Proceedings of the Annual Meeting of the Society of Theriogenology, Montreal , Nashville, Society for Theriogenology, pag.245-247, 1997 IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: *Canine and feline theriogenology*, Saunders Company, Philadelphia, 2001
- Cornwell H.J.C., Wright N.G.: Neonatal *Canine Herpesvirus* infection: a review of present knowledge, Vet Rec, vol.84, pag.2-6, 1969 IN: Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: *Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies*, Theriogenology, vol.64 (1), pag.61-74, 2005
- Corrente M., Franchini D., Decaro N., Greco G., D'Abramo M., Greco M.F., Latronico F., Crovace A., Martella V.: Detection of *Brucella Canis* in a dog in Italy, New Microbiol, vol.33, pag.337-341, 2010
- Corrò M., Milani C., Mancin M., Rota A.: Antibioticoresistenza in isolati microbici delle vie genitali e del secreto mammario nel peripartum di cagne in allevamento, in Atti del 7° Congresso Nazionale della Società Italiana di Riproduzione Animale, Messina, Italia, pag.112-114, 2009
- Cozzi G., Brscic M., Gottardo F.: Main critical factor affecting the welfare of beef cattle and veal calves raised under intensive rearing systems in Italy: a review, Ital J of Anim Sci, vol.8, 2009
- Darvelid A.W., Linde-Forsberg C.: Dystocia in the bitch: a retrospective study of 182 cases, J Small Anim Pract, vol.35, pag.402-407, 1994

Davidson A.: Uterine monitoring during pregnancy, in Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology, Baltimore, Nashville, Society for Theriogenology, pag.123-125, 1998  
*IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Davidson A.P.: Approaches to reducing neonatal mortality in dogs, in Concannon P.W., England G., Verstegen J., Linde-Forsberg G. (eds): Recent Advances in Small Animal Reproduction, Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2003

Davidson A.: Current concepts on infertility in the bitch, Waltham Focus, vol. 16 (2), pag.13-21, 2006

De Antonio E.M.M., Martin M.: In vitro efficacy of several antimicrobial combinations against *Brucella canis* and *Brucella melitensis* strains isolated from dogs, Vet Microbiol, vol.45, pag.1-10, 1995

De Gier J., Buijtels J.J.C.W.M., Albers-Wolthers C.H.J., Oei C.H.Y., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Effects of gonadotropin-releasing hormone administration on the pituitary-gonadal axis in male and female dogs before and after gonadectomy, available online: doi: 10.1016/j.theriogenology.2011.10.003, 2011

De Gier J., Kooistra H.S., Djajadiningrat-Laanen S.C., Dieleman S.J., Okkens A.C.: Differential regulation of the secretion of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone around the time of ovulation in the bitch, Theriogenology, vol.66, pag.1419-1422, 2006

De Winter L.M., Prescott J.F.: Relatedness of *Streptococcus canis* from canine streptococcal toxic shock syndrome and necrotizing fasciitis, Can J Vet Res, vol.63, pag.90-95, 1999 *IN: Pretzer S.D.: Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen, Theriogenology, vol.70, pag.320-326, 2008*

Debraekeleer J., Gross K.L., Zicker S.: Feeding reproducing dogs, in Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010

Diau G.Y., Loew E.R., Wijendram V.: Docosahexaenoic and arachidonic acid influence on preterm baboon retinal composition and function, Opth Vis Sci, vol.44, pag.4559-4566, 2003

Dobson H., Smith R.F.: What is stress, and how does it affect reproduction?, Anim Reprod Sci, vol.60-61, pag.743-751, 2000

Doig P.A., Ruhunke H.L., Bosu W.T.K.: The genital Mycoplasma and Ureaplasma of healthy and diseased dogs, Can J Comp Med, vol.45, pag.223-234, 1981

Dubey J.P., Koestner A., Piper R.C.: Repeated transplacental transmission of *Neospora caninum* in dogs, J Am Vet Med Assoc, vol.197, pag.857-860, 1990

Dubey J.P., Lappin M.R.: Toxoplasmosis and Neosporosis, in Greene C.E. (ed): Infectious diseases of dogs and cats. WB Saunders, Philadelphia, 1998

- Dubey J.P., Lindsay D.S.: Transplacental *Neospora caninum* infection in dogs, *Am J Vet Res*, vol.50, pag.1578-1579, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Dubey J.P., Rosypal A.C., Pierce V.: Placentitis associated with Leishmaniasis in a dog, *J Am Vet Med Assoc*, vol.227, pag.1266-1269, 2005
- Dubey J.P., Schares G., Ortega-Mora L.M.: Epidemiology and control of Neosporosis and *Neospora caninum*, *Clin Microbiol Rev*, vol.20, pag.323-67, 2007
- Dunlap S.E., Vincent C.K.: Influence of Postbreeding Thermal Stress on Conception Rate in Beef Cattle, *J Anim Sci*, vol.32 (6), pag.1216-1218, 1971
- Eigenmann J.E.: Diabetes mellitus in elderly female dogs: recent findings on pathogenesis and clinical implications, *J Am Anim Hosp Assoc*, vol.17, pag.805-812, 1981 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Eilts B.E., Davidson A.P.: Approach to infertility in the dog and bitch., in *Proceedings of the American Animal Hospital Association Annual Meeting*, 2005
- Eilts B.E., Paccamonti D.L., Hosgood G.: The use of ally-trenbolone as a progestational agent to maintain pregnancy in ovariectomized bitches, *Theriogenology*, vol.42, pag.1237-1245, 1994
- Ellis W.A.: Leptospirosis, *J Small Anim Pract*, vol.27, pag.683-692, 1986 *IN: Pretzer S.D.: Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen, Theriogenology, vol.70, pag.320-326, 2008*
- Eneroth A., Uhlhorn M., Swensson L., Linde-Forsberg C., Hall M.: Valpningsproblem hos fransk bulldogg, skotsk terrier & bostonterrier (Dystocia in the French Bulldog, Scottish terrier and Boston terrier), *Hundsport*, vol.112, pag.38-41, 2000
- England G.C.W.: Vaginal cytology and cervicovaginal mucus arborisation in the breeding management of bitches, *J Small Anima Pract*, vol.33, pag. 577-582, 1992
- England G.C.W.: Pharmacologic control of reproduction in the dog and bitch, in Simpson G.M., England G.C.W., Harvey M. (eds): *Manual of Small Animal Preproduction and Neonatology*, BSAVA, Cheltenham, pag.197, 1998
- England G.C.W.: Pregnancy diagnosis, abnormalities of pregnancy and pregnancy termination, in Simpson G.M., England G.C.W., Harvey M. (eds): *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, BSAVA, Cheltenham, pag.113-125, 1998a
- England G.C.W., Allen W.E.: Ferning patterns in bitch vaginal fluid can help determine the optimum mating time, *J Reprod Fertil Suppl*, vol. 39, pag.327, 1989 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- England G.C.W., Allen W.E.: Repeatability of events during spontaneous and gonadotrophin induced oestrus in bitches, *J Reprod Fertil*, vol.93, pag.443, 1991

- England G.C., Concannon P.W.: Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations, in Concannon P.W., England E., Verstegen J. (eds): *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2002
- Estill C.T.: Theriogenology question of the month: Hypoluteoidism in a bitch, *J Am Vet Med Assoc*, vol.212, pag.817-818, 1998 *IN: Görlinger S., Galac S., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Hypoluteoidism in a bitch, Theriogenology, vol.64 (1), pag.213-219, 2005*
- Ettinger S.J., Feldman E.C.: *Clinica medica veterinaria. Malattie del cane e del gatto*, 6<sup>a</sup> ed, ed. Elsevier srl, 2008
- Evans J.M., White K.: *The book of the bitch: a complete guide to understanding and caring for bitches*, Henston Ltd ed, 1988
- Evermann J.F.: Comparative clinical and diagnostic aspects of Herpesvirus infections of companion animals with primary emphasis on the dog, in *Proceedings Annual Meeting of the Society for Theriogenology*, pag.335-339, 1989 *IN: Von Root Kustritz M.: Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog, Theriogenology, vol.64 (3), pag.755-765, 2005*
- Farstad W.: Bitch fertility after natural mating and after artificial insemination with fresh or frozen semen, *J Small Anim Pract*, vol.25, pag.561-565, 1984
- Farstad W.: Mating and artificial insemination in the dog, in Simpson G.M., England G.C.W., Harvey M. (eds): *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, BSAVA, Cheltenham, pag.95, 1998
- Farstad W.: Infectious diseases of the neonatal-a review, in *Proceedings of the 2<sup>nd</sup> Course: Reproduction in Companion, Exotic, and Laboratory Animals*, Hannover, vol.20, pag.1-7, 2003 *IN: Münnich A.: The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult, Vet Res Commun, vol.32, pag.81-85, 2008*
- Farstad W., Andersen-Berg K.: Factors influencing the success rate of artificial insemination with frozen semen in dog, *J of Reprod Fert Suppl*, vol. 39, pag. 289-292, 1989
- Feldman E.C., Nelson R.W.: *Canine and feline endocrinology and reproduction*, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004
- Festing M.F.W., Bleby J.: Breeding performance and growth of SPF cats, *J Small Anim Pract*, vol.11, pag.533, 1970 *IN: Hoskins J.D. (ed): Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months), 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001*
- Fontaine E., Mir F., Vannier F., Gerardin A., Albouy M., Navarro C., Fontbonne A.: Induction of fertile oestrus in the bitch using Deslorelin, a GnRH agonist, *Theriogenology*, vol.76, pag.1561-1566, 2011
- Fontbonne A.: Infectious reproductive problems in kennels, in *Proceedings of 5<sup>th</sup> Biannual Congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR)*, Budapest, Hungary, 2006
- Fontbonne A.: How to perform transcervical catheterization in the bitch, *World Congress WSAVA/FECAVA/CSAVA*, 2006a

- Fontbonne A.: Infertility in bitches and queen: recent advances, *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, vol.35 (2), pag. 202-209, 2011
- Fontbonne A., Badinand F.: Canine artificial insemination with frozen semen: comparison of intrvaginal and intrauterine deposition of semen, *J Reprod Fert Suppl*, vol.47, pag. 325-327, 1993
- Fontbonne A., Siliart B., Dadinand F.: Hormonal findings in dogs and bitches showing reproductive disorders, *J Reprod Fert Suppl*, vol.47, pag. 553–554, 1992
- Forbes L.B.: *Brucella abortus* infection in 14 farm dogs, *J Am Vet Med Ass*, vol.196, pag.911, 1990
- Fougner J.A.: Artificial insemination in fox breeding, *J Reprod Fert Suppl*, vol.39, pag. 317-323, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Fox M.W.: Neonatal mortality in the dog, *J Am Vet Med Assoc*, vol.143, pag.1219– 1223, 1963 *IN: Gobello C., Corrada Y.: Noninfectious spontaneous pregnancy loss in bitches, Compendium, vol.24, pag.778-783, 2002*
- Freshman J.L.: Clinical approach to infertility in the cycling bitch, *Vet Clin Nort Am*, vol. 21, pag. 427, 1991 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Fuquay J.W.: Heat stress as it affects animal production, *J Anim Sci*, vol.52, pag.164-174, 1981
- Gaines F.P., Van Vleck L.D.: The influence of Beagle sires on gestation length, litter size, birth weight, and livability, *Carnivore Genet Newslett*, vol.3, pag.75-79, 1976
- Galac S.: Pregnancy termination in bitches with aglepristone, a progesterone receptor antagonist, in *Proceedings Advances in Dog, Cat and Exotic Carnivore Reproduction*, Oslo, pag.103, 2000
- Garcia-Ispuerto I., Lopez-Gatius F., Santolaria P., Yaniz J.L., Nogareda C., Lopez-Bejar M., De Rensis F.: Relationship between heat stress during the peri-implantation period and early fetal loss in dairy cattle, *Theriogenology*, vol.65, pag.799-807, 2006
- Gaudet D.A.: Retrospective study of 128 cases of canine dystocia, *J Am Anim Hosp Assoc*, vol.21, pag.813-818, 1985
- Gavrilovic B.B., Andersson K., Linde-Forsberg C.: Reproductive patterns in the domestic dog: a retrospective study on the Drever bred, *Theriogenology*, vol.70, pag.783-797, 2008
- Gee B.R., Pharr J.W., Furneaux R.W.: Segmental aplasia of the mullerian duct system of a dog, *Can Vet J*, vol.18, pag. 281-286, 1977 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- George L., Carmichael L.: Antisperm responses in male dogs with chronic *Brucella canis* infections, *Am J Vet Res*, vol.45, pag.274, 1984 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Gill M.A.: Perinatal and late neonatal mortality in the dog, PhD thesis, University of Sydney, available online [http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/4137/1/m\\_gill\\_thesis\\_2001.pdf](http://ses.library.usyd.edu.au/bitstream/2123/4137/1/m_gill_thesis_2001.pdf), 2002

- Givens M.D., Marley M.S.D.: Infectious causes of embryonic and fetal mortality, *Theriogenology*, vol.70, pag.270-285, 2008
- Gobello C.: Dopamine agonists, anti-progestins, anti-androgens, long-term-release GnRH agonists and anti-estrogens in canine reproduction: A review, *Theriogenology*, vol.66, pag.1560-1567, 2006
- Gobello C., Corrada Y.: Noninfectious spontaneous pregnancy loss in bitches, *Compendium*, vol.24, pag.778-783, 2002
- Gooding G.E., Robinson W.F.: Maternal antibody, vaccination and reproductive failure in dogs with Parvovirus infection, *Aust Vet J*, vol.59, pag.170-174, 1982 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Goodman M.: Ovulation Timing, concepts and controversies, *Vet Clin of North Am Small Anim Pract*, vol.31 (2), pag. 219-233, 2001
- Görlinger S., Galac S., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Hypoluteoidism in a bitch, *Theriogenology*, vol.64 (1), pag.213-219, 2005
- Gottardo F., Ricci R., Preciso S., Ravarotto R., Cozzi G.: Effect of the manger space on welfare and meat quality of beef cattle, *Liv Prod Sci*, vol.89, pag.277-285, 2004
- Granchamps G.: Diagnostic de l'Herpesvirose virose en élevage canin, Thesis n. 92, Lyon: Lyon Veterinary School, Claude Bernard University, 1998 *IN: Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies, Theriogenology, vol.64 (1), pag.61-74, 2005*
- Grandjean D., Paragon B.M.: Rationnement alimentaire et prévention chez le chien 1, *Le Point Vétérinaire*, vol.18, pag.519-524, 1986 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Grandjean D., Pierson P., Cacciani F., Pawlowicz S., Michallet T., Morchi F., Massoni G.: Guida pratica dell'allevamento canino, Aniwa Publishing, Royal Canin, 2003
- Greene C.E.: Salmonellosis, In Greene C.E. (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, WB Saunders, Philadelphia, 1998
- Greene C.E., Appel M.J.: Canine Distemper Virus, in Greene C.E. (ed): *Infectious Diseases of the Dog and Cat*, WB Saunders, Philadelphia, 1998
- Gross K.L.: Effect of diet on composition of milk from dogs (abstract), *Abstract Book- Walth Symp Nutr Comp Anim*, Adelaide, Australia, 1993 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Grundy S.A., Feldman E., Davidson A.: Evaluation of infertility in the bitch, *Clin Techn Small Anim Pract*, vol.17 (3), pag.108-115, 2002
- Günzel-Apel A.R., Zabel S., Bunck C.F., Dieleman S.J., Einspanier A., Hoppen H.O.: Concentrations of progesterone, prolactin and relaxin in the luteal phase and pregnancy in normal and short-cycling German Shepherd dogs, *Theriogenology*, vol.66, pag.1431-1435, 2006

- Hales J.R.S., Dampney R.A.L.: The redistribution of cardiac output in the dog during heat stress, *J Therm Biol*, vol.1 (1), pag.29-34, 1975
- Hammel H.T., Wyndham C.H., Hardy J.D.: Heat Production and Heat Loss in the Dog at 8–36°C Environmental Temperature, *Am J Physiol*, vol.194, pag.99-108, 1958
- Hannemann G.D., Higgins E.A., Price G.T., Funkhouser G.E., Grape P.M., Snyder L.: Transient and permanent effects of hyperthermia in dogs: a study of a simulated air transport environmental stress, *Am J Vet Res*, vol.38 (7), pag.955-958, 1977
- Harrison L.R., Styer E.L., Pursell A.R.: Fatal disease in nursing puppies associated with Minute Virus of Canines, *J Vet Diagn Invest*, vol.4, pag.19-22, 1992
- Hase M., Hori T., Kawakami E., Tsutsui T.: Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs, *J Vet Med Sci*, vol.62, pag.243-248, 2000
- Hashimoto A., Hirai K., Fukushi H., Fujimoto Y.: The vaginal lesions of a bitch with a history of *Canine Herpesvirus* infection, *Jap J Vet Sci*, vol.45, pag.123-126, 1983 *IN: Ronsse V., Versteegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies, Theriogenology*, vol.64 (1), pag.61-74, 2005
- Hashimoto A., Hirai K., Yamaguchi T., Fujimoto Y.: Experimental transplacental infection of pregnant dogs with *Canine Herpesvirus*, *Am J Vet Res*, vol.43, pag.844-850, 1982 *IN: Ronsse V., Versteegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies, Theriogenology*, vol.64 (1), pag.61-74, 2005
- Hatsuta M., Abe K., Tamura K., Ryuno T., Watanabe G., Taya K.: Effects of hypothyroidism on the estrous cycle and reproductive hormones in mature female rat, *Eur J Pharmacol*, vol.486, pag. 343–348, 2004
- Hayer P.J.: Gelbkörperinsuffizienz als Fertilitätstörung bei zwei Hündinnen, *Kleintierpraxis*, vol.42, pag.335-340, 1997 *IN: Görlinger S., Galac S., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Hypoluteoidism in a bitch, Theriogenology*, vol.64 (1), pag.213-219, 2005
- Hayer P., Gunzel-Apel A.R., Luerssen D., Hoppen H.O.: Ultrasonographic monitoring of follicular development, ovulation and the early luteal phase in the bitch, *J Reprod Fertil Suppl*, vol.47, pag.93-100, 1993
- Heddle R.J., Rowley D.: Dog immunoglobulins- immunochemical characterization of dog serum, parotid saliva, colostrums, milk and small bowel fluid, *Immunology*, vol.29, pag.185-195, 1975
- Heinemann K.M., Waldron M.K., Bigley K.E.: Long-chain (n-3) polyunsaturated fatty acids are more efficient than alpha-linolenic acid in improving electroretinogram responses of puppies exposed during gestation, lactation, and weaning, *J Nutr*, vol.135, pag.1960-1966, 2005
- Helland B.I., Saugstad D.O., Saarem C., Van Houwelingen A.C., Nylander G., Drevon C.A.: Supplementation of n-3 fatty acids during pregnancy and lactation reduces maternal plasma lipid levels and provides DHA to the infants, *J Mat-Fet Neon Med*, vol.197, pag.397-406, 2006

Hemsworth P.H., Barnett J.L., Hansen H., Winfield C.G.: Effects of social environment on welfare status and sexual behaviour of female pigs: II. Effects of space allowance, *Appl Anim Behav Sci*, vol.16, pag.259-267, 1986

Hennessy M.B., Davis H.N., Williams M.T., Mellott C., Douglas C.W.: Plasma Cortisol Levels of Dogs at a County Animal Shelter, *Phys Behav*, vol.62 (3), pag.485-490, 1997

Herzog A., Hohn H.: Chromosomenanomalien mit letaler Wirkung bei Welpen, *Kleintierpraxis*, vol.17, pag.1-4, 1972 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Hetts S., Clark J.D., Calpin J.P., Arnold C.E., Mateo J.M.: Influence of housing conditions on beagle behaviour. *Appl Anim Behav Sci*, vol.34, pag.137-155, 1992

Hewitt D., England G.: Assessment of optimal mating time in the bitch, *Am J Vet Res*, vol. 53(5), pag. 665-669, 1992

Hicks T.A., McGlone J.J., Whisnant C.S., Kattesh H.G., Norman R. L.: Behavioral, endocrine, immune, and performance measures for pigs exposed to acute stress, *J Anim Sci*, vol.76 (2), pag.474-483, 1998

Hollett R.B.: Canine brucellosis: outbreaks and compliance, *Theriogenology*, vol.66, pag.575-587, 2006

Holst P.A., Phemister R.D.: The prenatal development of the dog: preimplantation events, *Biol Reprod*, vol.5, pag.194-206, 1971 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Holst P.A., Phemister R.D.: Onset of diestrus in the beagle bitch: definition and significance, *Am J Vet Res*, vol. 35, pag. 401-406, 1974 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Hoskins J.D.: Examination of the young dog and cat: birth to four months, *Proc Am Coll Vet Intern Med*, vol.8, pag.631, 1990 *IN: Hoskins J.D. (ed): Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months), 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001*

Hoskins J.D.: Special problems in the pediatric patient, in *Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine Forum*, vol.9, pag.351, 1991 *IN: Hoskins J.D. (ed): Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months), 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001*

Hoskins J.D.: Puppy and kitten losses, in *Hoskins J.D. (ed): Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months), 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001*

Haupt K.A., Coren B., Hintz H.F.: Effects of sex and reproductive status on sucrose preference, food intake, and body weight of dogs, *J Am Vet Med Ass*, vol.174, pag.1083-1085, 1979 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotny B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*

Hubrecht R.C., Serpell J.A., Poole T.B.: Correlates of pen size and housing conditions on the behaviour of kennelled dogs, *Appl Anim Behav Sci*, vol. 34, pag. 365-383, 1992

- Ikeda J.S., Hirsh D.C., Jang S.S.: Characteristics of Salmonella isolated from animals at a veterinary medical teaching hospital, *Am J Vet Res*, vol.47, pag.232-235, 1986
- Inaba T., Tani H., Gonda M., Nakagawa A., Ohmura M., Mori J, Torii R., Tamada H., Sawada T.: Induction of fertile estrus in bitches using a sustained-release formulation of a GnRH agonist (leuprolide acetate), *Theriogenology*, vol.49 (5), pag.975-982, 1998
- Indrebo A., Trangerud C., Moe L.: Canine neonatal mortality in four large breeds, *Ac Vet Scandin*, vol.49, pag.2, 2007
- Innis S.M.: Dietary omega-3 fatty acids and the developing brain, *Brain Res*, vol.1237, pag.35-49, 2008
- Jeffcoate I.A.: Identification of spayed bitches, *Vet Rec*, vol.129, pag.58, 1991 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Jiang J.Y., Imai Y., Umezu M., Sato E.: Characteristics of infertility in female hypothyroid mice, *Reproduction*, vol.122, pag. 695–700, 2001
- Jöchle W., Arbeuter K., Post K., Ballabio R., D'Veer A.S.: Effects on pseudopregnancy, pregnancy and interoestrus intervals of pharmacological suppression of prolactin secretion in female dogs and cats, *J Reprod Fert*, vol.39, pag.199-207, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Johnson C.A.: Disorders of pregnancy, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. Vol.16, pag.477-482, 1986 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Johnson C.A.: Thyroid issues in reproduction, *Clin Tech Sm Anim Pract*, vol.17, pag. 129–132, 2002
- Johnson C.A.: Current concepts on infertility in the dog, *Waltham Focus*, vol. 16 (2), pag.7-12, 2006
- Johnson R.K., Atkins C.E.: Non-neoplastic causes of canine hypoglycemia, *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.7, pag.1023-1027, 1980 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Johnson C.A., Grace J.A., Probst M.R.: The effect of maternal illness on perinatal health, *Vet Clin N Am Sm Anim Pract*, vol.17, pag. 555–566, 1987 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Johnson C., Jacobs J., Walker R.: Diagnosis and control of *Brucella canis* in kennel situations, in *Proceedings of Annual Meeting of the Society for Theriogenology, San Diego (California), Nashville, Society for Theriogenology*, pag.236-239, 1991 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Johnson C.A., Nachreiner R.F., Mullaney T.P.: Reproductive manifestation of hypothyroidism, *Canine Pract*, vol.22, pag. 29-30, 1997

Johnson C.A., Olivier N.B., Nachreiner R.F., Mullany T.: Effect of <sup>131</sup>I-induced hypothyroidism on indices of reproductive function in adult male dogs, *J Vet Intern Med*, vol.13, pag. 104–109, 1995

Johnson C.A., Walker R.D.: Clinical signs and diagnosis of *Brucella canis* infection, *Comp Cont Ed*, vol.14, pag.763-772, 1992 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*

Johnston S.D.: Diagnostic and therapeutic approach to infertility in the bitch, *J Am Vet Med Assoc*, vol.176, pag. 1335, 1980 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D.: Noninfectious causes of infertility in the dog and cat, in Laing J.A. (ed): *Fertility and Infertility in Veterinary Practice*, Bailliere Tindall, London, pag.160, 1988 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*

Johnston S.D.: Vaginal prolapse, *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.10, pag.1302-1305, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D.: Premature gonadal failure in female dogs and cats, *J Reprod Fertil Suppl*, vol.39, pag.65-72, 1989a *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2001*

Johnston S.D.: Clinical approach to infertility in bitches with primary anestrus, *Vet Clin North Am*, vol.21, pag. 421, 1991 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D., Buoen L.C., Weber A.F., Lin T.L: Triploidy (117,XXX) in a stillborn canine pup conceived with frozen semen, *J Am Vet Med Assoc*, vol.194, pag.1446-1448, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D., Buoen L.C., Weber A.F., Madl J.E.: X trisomy in an Airedale bitch with ovarian dysplasia and primary anestrus, *Theriogenology*, vol.24, pag.597-607, 1985 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D., Raksil S.: Fetal loss in the dog and cat, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol.17, pag.535-554, 1987 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V.: Serum progesterone timing of ovulation in the bitch, in *Proceedings of the Annual Meeting of the Society for Theriogenology*, San Antonio, TX, Nashville, Society for Theriogenology, pag. 195-203, 1995 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: *Canine and feline theriogenology*, Saunders Company, Philadelphia, 2001

- Jones D.E, Joshua J.O.: Reproductive Clinical problems in the dog, 2<sup>nd</sup> ed, ed.London, Butterworths, 1988 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Kaufman A.F.: Pets and Salmonella infection, J Am Vet Med Ass, vol.149, pag.1655-1661, 1966 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Keid L.B., Soares R.M., Vasconcellos S.A., Chiebao D.P., Megid J., Salgado V.R., Richtzenhain L.J.: A polymerase chain reaction for the detection of *Brucella canis* in semen of naturally infected Dogs, Theriogenology, vol.67, pag.1230-1240, 2007
- Keid L.B., Soares R.M., Vasconcellos S.A., Chiebao D.P., Salgado V.R., Megid J., Richtzenhain L.J.: A polymerase chain reaction for detection of *Brucella canis* in vaginal swabs of naturally infected bitches, Theriogenology, vol.68, pag.1260-1270, 2007a
- Keid L.B., Soares R.M., Vieira N.R., Megid J., Salgado V.R., Vasconcellos, S.A., Da Costa M., Gregori F., Richtzenhain L.J. Diagnosis of canine brucellosis: comparison between serological and microbiological tests and a PCR based on primers to 16S–23S rDNA interspacer, Vet Res Commun, vol.31, pag.951-965, 2007b
- Kelley R.L., Lepine A.J., Burr J.R.: Effect of dietary fish oil on puppy trainability, in Proceedings of 6<sup>th</sup> Congress of the International Society for the Study of Fatty Acids and Lipids, 2004
- Kemppainen R.J.: Effects of prednisone on thyroid and gonadal endocrine function in dogs, J Endocrinol, vol.96, pag.293-302, 1983 IN: *Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Kerwin S.C., Lewis D.D., Hribernik T.N., Partington B., Hosgood G., Eilts B.E.: Dyscospondylitis associated with *Brucella canis* infection in dogs:14 cases (1980-1991), J Am Vet Med Ass, vol.201, pag.1253, 1992
- Khansari D.N., Murgo A.J., Faith R.E.: Effects of stress on the immune system, Immun Tod, vol.11, pag.170-175, 1990
- Kim S., Lee D.S., Suzuki H., Watari M.: Detection of *Brucella canis* and *Leptospira interrogans* in canine semen by multiplex nested PCR, J Vet Med Sci, vol.68, pag.615-618, 2006
- Kliegman R.M., Morton S.: The metabolic response of the canine neonate to twenty-four hours of fasting, Metabolism, vol.36, pag.521-526, 1987
- Kooistra H.S., Okkens A.C., Bevers M.M., Popp-Snijders C., van Haaften B., Dieleman S.J., Schoemaker J.: Concurrent pulsatile secretion of Luteinizing Hormone and Follicle-Stimulating Hormone during different phases of the estrous cycle and anestrus in Beagle bitches, Biol Reprod, vol.60, pag.65-71, 1999
- Kooistra H.S., Okkens A.C., Bevers M.M., Popp-Snijders C., van Haaften B., Dieleman S.J.: Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle stimulating hormone in beagle bitches, J Reprod Fert, vol.117, pag.387-393, 1999a

- Krakowka S., Hoover E.A., Koestner A.: Experimental and naturally occurring transplacental transmission of Canine Distemper Virus, *Am J Vet Res*, vol.38, pag.919-922, 1977 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Kutzler M.A., Wheeler R., Lamb S., Volkmann D.H.: Deslorelin implant administration beneath the vulvar mucosa for the induction of synchronous estrus in bitches, in Proceedings of 3<sup>rd</sup> Congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction, Liege, Belgium, 2002
- Kyles A.E., Vaden S., Hardie E.M.: Vestibulovaginal stenosis in the dog: 18 cases, *J Am Vet Med Assoc*, vol.209, pag. 1889-1893, 1996
- Lacheretz A., Cognard S. : Epidémiologie et diagnostic sérologique de l'Herpès-virose canine, *Rev Méd Vét*, vol.149, pag.853-856, 1998), pp. 853–856, 1998 *IN: Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies, Theriogenology, vol.64 (1), pag.61-74, 2005*
- Lauritsen J.G.: The cytogenetics of spontaneous abortion, *Res Reprod*, vol.14 (3), pag.3-4, 1982
- Lawler D.F., Monti K.L.: Morbidity and mortality in neonatal kittens, *Am J Vet Res*, vol.45, pag.1455, 1984 *IN: Hoskins J.D. (ed): Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months), 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001*
- Leibetseder J.: Ernährung der Zuchthündin und der Junghunde, *Der Praktischer Tierarzt*, vol.70, pag.12-20, 1989 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Lein D.H.: Canine Mycoplasma, Ureaplasma, and bacterial infertility, *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.9, pag.1240-1243, 1986 *IN: Pretzer S.D.: Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen, Theriogenology, vol.70, pag.320-326, 2008*
- Lelli J.L.J., Drongowski R.A., Coran A.G., Abrams G.D.: Hypoxia-induced bacterial translocation in the puppy, *J Pediatr Surg*, vol.28, pag.974-982, 1992
- Lemoule M., Chambon F., Chastant S., Grandjean D., Grellet A.: Reproductive performances of dogs in a large French breeding kennels, in Proceedings 14<sup>th</sup> Congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), Milano, Italia, pag.72, 2011
- Lenghaus C., Studdert M.J., Finnie J.W.: Acute and chronic *Canine Parvovirus* myocarditis infection following intrauterine inoculation, *Aust Vet J*, vol.56, pag.465-468, 1980 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Levy X., Fontbonne A.: Determining the optimal time of mating in bitches: particularities, *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, vol.31 (1), pag.128-134, 2007
- Lewis L.D., Morris M.L. J, Hand M.S.: Dogs—Feeding and care, in Lewis L.D., Morris M.L. J, Hand M.S. (eds): *Small Animal Clinical Nutrition*, 3<sup>rd</sup> ed, Topeka, KS, Mark Morris Associates, 1987 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*

- Lincoln S.R.: Value of screening infertile women for hypothyroidism, *J Reprod Medic*, vol.44, pag.455, 1999
- Linde C.: Partial abortion associated with genital *Escherichia coli* infection in a bitch, *Vet Rec*, vol.112, pag.454-455, 1983
- Linde-Forsberg C., Eneroth A.: Parturition, in Simpson G.M., England G.C.W., Harvey M. (eds): *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, BSAVA, Cheltenham, pag.127-142, 1998
- Linde-Forsberg C., Forsberg M.: Result of 527 controlled artificial inseminations in dogs, *J Reprod Fert Suppl*, vol.47, pag. 313-323, 1993
- Linde-Forsberg C., Persson G.: A survey of dystocia in the Boxer breed, *Act Vet Scand*, vol.49, pag.8, 2007
- Linde-Forsberg C., Ström Holst B., Govette G.: Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study, *Theriogenology*, vol. 52 (1), pag. 11-23, 1999
- Linde-Forsberg C., Meyers- Wallen A.: Effect of whelping and season of the year on the interoestrus intervals in dogs, *J Small Anim Pract*, vol.33, pag.67-70, 1992
- Lindsay F.E.F.: The normal endoscopic appearance of the caudal reproductive tract of the cyclic and non-cyclic bitch: post-uterine endoscopy, *J Small Anim Prac*, vol. 24, pag. 1-15, 1983 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Lindsay F.E.F., Concannon P.W.: Normal canine vaginoscopy, in Burke T. (eds): *Small Animal Reproduction and Infertility*, Lea & Febiger, pag. 112-120, 1986 *IN: Concannon P.W., England E., Verstegen J. (eds): Recent Advances in Small Animal Reproduction, Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2002*
- Lofstedt R.M., Buoen L.C., Weber A.F., Johnston S.D., Huntington A., Concannon P.W.: Prolonged proestrus in a bitch with X chromosomal monosomy (77,XO), *J Am Vet Med Assoc*, vol.200, pag.1104-1106, 1992 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Lopez-Gatius F.: Is fertility declining in dairy cattle? A retrospective study in Northeastern Spain, *Theriogenology*, vol.60, pag.89-99, 2003
- Luchetti E., Pasquini A., Rota A., Cardini G.: Il dosaggio del progesterone sierico nella specie canina: tre metodi a confronto, *J Small Aniim Pract*, vol. 4, pag. 10-14, 2005
- Macintire D.K.: Intensive care management, in Hoskins J.D. (ed): *Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months)*, 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001
- Mahi-Brown C.A., Huang T.T., Yanagimachi N.: Infertility in bitches induced by immunization with porcine zonae pellucidae, *J Exp Zoo*, vol. 222, pag. 89, 1982 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*

- Manning P.J.: Thyroid gland and arterial lesions of beagles with familial hypothyroidism and hyperlipoproteinemia, *Am J Vet Res*, vol.40, pag.820-828, 1979 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Manothaiudom K., Johnston S.D.: Clinical approach to vaginal/ vestibular masses in the bitch, *Vet Clin North Amer*, vol.21, pag.509-521, 1991 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Mantovani A., Restani R., Sciarpa D.: Streptococcus infection in the dog, *J Small Anim Pract*, vol.2, pag.185-194, 1961 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Marseloo N., Cot S., Tual-Vaurs C., Petite J.L., Frontczak N., Fontbonne A.: Study of the aerobic bacterial flora in the anterior vagina of breeding bitches with reproductive disorders and its sensitivity to marbofloxacin, in *Proceedings 4<sup>th</sup> Biannual Congress, European Veterinary Society for Small Animal Reproduction (EVSSAR), Barcelona, Spain, 2004*
- Marseloo N., Fontbonne A., Bassu G., Rivière S., Leblanc B., Rault D., Biourge V., Chastant-Maillard S.: Comparison of ovarian ultrasonography with hormonal parameters for the determination of the time of ovulation in the bitch, *International Symposium on Canine and Feline Reproduction, 5<sup>th</sup>, São Paulo, Brazil, 2004a*
- McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D.: Feeding standards for reproduction, In McDonald P., Edwards R.A., Greenhalgh J.F.D., Morgan C.A. (eds): *Animal Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Harlow (Essex), UK, Longman Scientific & Technical, 1995*
- Meji B.P., Voorhout G., Van Oosterom R.A.A.: Agenesis of the vulva in a Maltese dog, *J Small Anim Pract*, vol. 31, pag. 457-460, 1990 IN: *Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Mertens P.A., Unshelm J.: Effects of group and individual housing on the behavior of kennelled dogs in animal shelters, *Anthrozoos*, vol. 9, pag. 40-51, 1996
- Meunier P.C., Glickman L.T., Appel M.J.C.: Canine Parvovirus in a commercial kennel: epidemiologic and pathologic findings, *Cornell Vet*, vol.71, pag.96-110, 1981
- Meyer H.: Mineralstoffwechsel und Mineralstoffbedarf bei Hündinnen und Saugwelpen (Mineral metabolism and requirements in bitches and suckling pups), in: Anderson R.S. (ed): *Proceedings of First Nordic Symposium on Small Animal Veterinary Medicine, Oslo, Norway, pag.13-24,1982 IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Meyer H.: Praktische Fütterung, In: *Ernährung des Hundes, 2<sup>nd</sup> ed, Stuttgart, Germany, E Ulmer Verlag, 1990 IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*

- Meyer H., Kienzle E., Dammers C.: Milchmenge und Milchzusammensetzung bei und Hündin sowie Futteraufnahme und Gewichtsenwicklung ante und post partum, Tierphysiologie und Tierernährung (Adv Anim Phys Anim Nutr), vol.16, pag.51-72, 1985 IN: *Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Meyer M.E.: Update of canine Brucellosis, Mod Vet Pract, vol.64, pag.987, 1983
- Meyers-Wallen V.N.: Genetics of sexual differentiation and anomalies in dogs and cat, J Reprod Fert Suppl, vol.47, pag. 441-452, 1993
- Meyers-Wallen V.N.: Unusual and abnormal canine estrous cycles, Theriogenology, vol. 68 , pag. 1205–1210, 2007
- Milani C., Faccioli G., Mollo A., Tramontano A., Corrò M., Rota A.: Osservazioni sulla presenza di batteri e Micoplasmi nel tratto vaginale e nel latte della cagna nel peripartum:dati preliminari, in Atti del 6° Congresso Nazionale della Società Italiana di Riproduzione Animale, Lodi, Italia, pag.168-170, 2008
- Miller C.W., Prescott J.F., Mathews K.A.: Streptococcal toxic shock syndrome in dogs, J Am Vet Med Assoc, vol.209, pag.1421-1426, 1996
- Mitchell G., Hattingh J., Ganhao M.: Stress in cattle assessed after handling, after transport and after slaughter, Vet Rec, vol.123, pag.201-205, 1988
- Monson W.J.: Orphan rearing of puppies and kittens, Vet Clin North Am Small Anim Pract, vol.17, pag.567-576, 1987
- Moon P.F., Erb H.N., Ludders G.W., Gleed R.D., Pascoe P.J.: Perioperative risk factors for puppies delivered by caesarean section in the United States and Canada, J Am Anim Hosp Ass, vol.36, pag.359-368, 2000
- Moon P.F., Massat B.J., Pascoe P.J.: Neonatal critical care, Vet Clin North Am Small Anim Pract, vol.31, pag.343-465, 2001
- Moon J.S., Park Y.H., Jung S.C., Ku B.G., Jang G.C., Shin S., Lee S.I., Lee J.M., Shin S.J.: Serological tests in canine brucellosis, RDA J Agric Sci Vet, vol.36, pag.614-621, 1994 IN: *Wanke M.M.: Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci, vol.82-83, pag.195-207, 2004*
- Morreale G., Pator R., Obregon M.J., Escobar del Rey F.: Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues before and after onset of fetal thyroid function, Endocrinology, vol.117, pag. 1890–1900, 1985 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Morse E.V., Duncan M.A.: Canine Salmonellosis: prevalence, epizootiology, signs and public health significance, J Am Vet Med Ass, vol.167, pag.817-820, 1975 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

- Moses D.L., Shille V.M.: Induction of estrus in Greyhound bitches with prolonged idiopathic anestrus or with suppression of estrus after testosterone administration, *J Am Vet Med Assoc*, vol.192, pag.1541, 1988 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Mosier J.E.: Nutritional recommendations for gestation and lactation in the dog, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol.7, pag.683-692, 1977 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Mosier J.E.: Introduction to canine pediatrics, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol.8, pag.3-5, 1978 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Mosier J.E.: The puppy from birth to six week, *Vet Clin North Am*, vol.8, pag.79-100, 1978a *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Mosier J.E.: Canine pediatrics-the neonate, in Proceedings of the 48<sup>th</sup> AAHA Annual Meeting, pag.339-346, 1981 *IN: Münnich A.: The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult, Vet Res Commun, vol.32, pag.81-85, 2008*
- Münnich A.: The pathological newborn in small animals: the neonate is not a small adult, *Vet Res Commun*, vol.32, pag.81-85, 2008
- Münnich A., Lübke-Becker A.: *Escherichia coli* infections in newborn puppies-clinical and epidemiological investigations, *Theriogenology*, vol.65, pag.562-575, 2004
- Münnich A., Küchenmeister U.: Dystocia in numbers – Evidence-based parameters for intervention in the dog: causes for dystocia and treatment recommendations, *Repr Dom Anim*, vol.44, pag.141-147, 2009
- Murakami S., Saitoh M., Kubo T., Tawakami Y., Yamashita K.: A case of mid-trimester intrauterine fetal death with Cushing's syndrome, *J Obstet Gynaecol Res*, vol.24 (2), pag.153-156, 1998
- Mutembei H.M., Mutiga E.R., Tsuma V.T.: A retrospective study on some reproductive parameters of German shepherd bitches in Kenya, *J S Afr Vet Assoc*, vol.71, pag. 115-117, 2000
- Nauwynck H.: Canine Herpesvirus 1- infections in dog: truth and lies, in Proceedings of the 7<sup>th</sup> EVSSAR Congress, Louvain-La-Neuve, Belgium, 2010
- Negro-Vilar A.: Stress and other environmental factors affecting fertility in men and woman: overview, *Environ Health Persp*, vol.101, pag.59-64, 1993
- Nelson R.W., Couto C.G.: *Small animal internal medicine, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier, Torino, 2003*
- Nesbitt G.H., Izzo J., Peterson L., Wilkins R.J.: Canine hypothyroidism: a retrospective study of 108 cases, *J Am Vet Med Assoc*, vol.177, pag. 1117–1122, 1980 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

- Nett T.M., Akbar A.M., Phemister R.D., Holst P.A., Reichert L.E., Niswender G.D.: Level of LH, estradiol and progesterone in serum during the estrous cycle and pregnancy in the Beagle bitch, *Experim Biol Med*, vol.148, pag.134-139, 1975
- Nichols R.: Diagnostic testing for canine hypothyroidism, in Proceedings of the American College of Veterinary Internal Medicine Forum, Lake Buena Vista, FL, pag. 243-245, 1997 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Nickel R.F., Okkens A.C., Vandergaag I.: Oophoritis in a dog with abnormal corpus luteum function, *Vet Rec*, vol.128, pag.333-334, 1991 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Nicoletti P.: Diagnosis and treatment of canine brucellosis, in Kirk R.W. (ed): Current Veterinary Therapy X, WB Saunders, Philadelphia, pag.1317-1320, 1989 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Nicoletti P.: Further studies on the use of antibiotics in canine brucellosis, *Comp Cont Ed*, vol.13, pag.944-946, 1991
- Nielen A.L., Van Der Gaag I., Knol B.W., Shukken Y.H.: Investigation of mortality and pathological changes in 14-month birth cohort of Boxer puppies, *Vet Rec*, vol.142, pag.602-606, 1998
- Nöthling J.O., Gerstenberg C., Volkmann D.H.: Success with intravaginal insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study, *J South Afric Vet Assoc*, vol. 66, pag. 49-55, 1995
- O'Connor C.L., Schweizer C., Gradilil C., Schlaferc D., Lopated C., Prociuka U., Meyers-Wallen V.N., Casala N.M: Trisomy-X with estrous cycle anomalies in two female dogs, *Theriogenology*, vol.76 (2), pag.374-380, 2011
- Odendaal M.W., De Cramer K.G, Van Der Walt M.L., Botha A.D., Pieterse P.M.: First isolation of *Campylobacter jejuni* from the vaginal discharge of three bitches after abortion in South Africa, *Onderstepoort J Vet Res*, vol.61, pag.193-195, 1994
- Oettle E.E.: Sperm morphology and fertility in the dog, *J Reprod Fertil*, vol.47, pag.257-260, 1993
- Oftedal O.T.: Lactation in the dog: Milk composition and intake by puppies, *J Nutr*, vol.114, pag.803-812, 1984
- Okkens A.C., Bevers M.M., Dieleman S.J., Willemsse A.H.: Shortening of the interoestrus interval and the lifespan of the corpus luteum of the cyclic dog by bromocriptine treatment, *Vet Q*, vol.7, pag.173-176, 1985 *IN: Kooistra H.S., Okkens A.C., Bevers M.M., Popp-Snijders C., van Haaften B., Dieleman S.J.: Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle stimulating hormone in beagle bitches, J Reprod Fert, vol.117, pag.387-393, 1999a*
- Okkens A.C., Bevers M.M., Dieleman S.J., Willemsse A.H.: Evidence for prolactin as the main luteotrophic factor in the cyclic dog, *Vet Q*, vol.12, pag.193-201, 1990

- Okkens A.C., Dieleman S.J., Bevers M.M., Lubberink A.A.M.E., Willemse A.H.: Influence of hypophysectomy on the lifespan of the corpus luteum in the cyclic dog, *J Reprod Fertil*, vol.77, pag.187-192, 1986 *IN: Görlinger S., Galac S., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Hypoluteoidism in a bitch, Theriogenology, vol.64 (1), pag.213-219, 2005*
- Okkens A.C., Kooistra H.S., Dieleman S.J., Bevers M.M.: Dopamine agonist effects as opposed to prolactin concentrations in plasma as the influencing factor on the duration of anoestrus in bitches, *J Reprod Fert*, vol.51, pag.55-58, 1997 *IN: Kooistra H.S., Okkens A.C., Bevers M.M., Popp-Snijders C., van Haaften B., Dieleman S.J.: Bromocriptine-induced premature oestrus is associated with changes in the pulsatile secretion pattern of follicle stimulating hormone in beagle bitches, J Reprod Fert, vol.117, pag.387-393, 1999a*
- Okkens A.C, Van Haaften B., Nickel R.: Fertility problems in the bitch, *Anim Reprod Sci*, vol. 28, pag.379, 1992 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Okuda Y., Hashimoto A., Yamaguchi T., Fukushi H., Mori S., Tani M.: Repeated *Canine Herpesvirus* (CHV) reactivation in dogs by an immunosuppressive drug, *Cornell Vet*, vol.83, pag.291-302, 1993
- Olson P.N.: Clinical evaluation of infertility in the bitch, in Ford R.B.(ed): *Clinical Signs and Diagnosis in Small Animal Practice*, New York, Churchill Livingstone, pag.631, 1988 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Olson P.N., Mulnix J.A., Nett T.M.: Concentrations of luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the serum of sexually intact and neutered dogs, *Am J Vet Res*, vol.53, pag.762, 1992
- Onclin K., Murphy B., Verstegen J.P.: Comparisons of estradiol, LH and FSH patterns in pregnant and nonpregnant beagle bitches, *Theriogenology*, vol.57, pag.1957-72, 2002
- Onclin K., Verstegen J.P.: In vivo investigation of luteal function in dogs: effects of cabergoline, a dopamine agonist, and prolactin on progesterone secretion during mid-pregnancy and diestrus, *Dom Anim Endocrinol*, vol.14, pag.25-38, 1997
- Onclin K., Verstegen J.P., Concannon P.W.: Time-related changes in canine luteal regulation: in vivo effects of LH on progesterone and prolactin during pregnancy, *J Reprod Fertil*, vol.118, pag.417-424, 2000
- Onclin K., Verstegen J., Silva L.D.M., Concannon P.: Patterns of circulating prolactin, LH, and FSH during dopamine-agonist induced termination of anestrus in beagle dogs, *Biol Repr*, vol.52, pag.314-319, 1995
- Ontko J.A., Phillips P.H.: Reproduction and lactation studies with bitches fed semipurified diets, *J Nutr*, vol.65, pag.211-218, 1958 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Orihuela A.: Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review, *Appl Anim Behav Sci*, vol.70, pag.1-16, 2000

- Orvieto R., Achiron A., Ben-Rafael Z. : Intravenous immunoglobulin treatment for recurrent abortions caused by antiphospholipid antibodies, *Fertil Steril*, vol.56, pag.1013-1020, 1991
- Pancieria D.L., Purswell B.J., Kolster K.A.: Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch, *Theriogenology*, vol.68 (3), pag.316-321, 2007
- Papich M.G.: Effects of drugs on pregnancy, *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.10, pag.1291-1299, 1989 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Patterson D.F.: Disorders of sexual development, *Am Anim Hosp Ass Sci Proceed*, San Antonio, pag.53, 1983 IN: *Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Pedersen N.C.: Common infectious diseases of multiple-cat environments, in Pedersen N.C. (ed): *Feline Husbandry: Diseases and Management in the Multiple-Cat Environment*, Goleta, CA, American Veterinary Publications, pag.177, 1991 IN: *Hoskins J.D. (ed): Veterinary Pediatrics (Dog and Cat from Birth to 6 Months), 3<sup>rd</sup> ed, WB Saunders, 2001*
- Perkins N.R., Thomas P.G.A.: Infertility in the bitch with abnormal oestrus ciclicity, *Aust Vet Pract*, vol.23, pag.122-126, 1993 IN: *Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Pidgeon G.L., Scanlan C.M., Miller W.R., Mayer T.W.: Experimental infection of dogs with *Brucella abortus*, *Cornell Vet*, vol.77, pag.339, 1987 IN: *Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Pinto C.R.F., Paccamonti D.L., Eilts B.E.: Fertility in bitches artificially inseminated with extended, chilled semen, *Theriogenology*, vol.52 (4), pag. 606-616, 1999
- Poffenbarger E.M., Olson P.N., Chandler M.L.: Use of adult dog serum as a substitute for colostrums in the neonatal dog, *Am J Vet Res*, vol.52, pag.1221-1224, 1991
- Poffenbarger E.M., Olson P.N., Ralston S.L.: Canine neonatology, part II, disorders of the neonate, *Compend Contin Educ Pract Vet*, vol.13, pag.25-37, 1991a
- Poffenbarger E.M., Ralston S.L., Chandler M.L.: Canine neonatology, part I, physiologic differences between puppies and adults, *Compend Contin Educ Pract Vet*, vol.12, pag.1601-1627, 1990
- Post K.: Embryo and fetal loss in the canine: a review, in *Theriogenology Handbook*, Society for Theriogenology, Hastings NE, pag.1-120, 1995 IN: *Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Post G., King N.: Isolation of a Herpesvirus from the canine genital tract: association with infertility, abortion and stillbirths, *Vet Rec*, vol.88, pag.229-233, 1971 IN: *Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies, Theriogenology, vol.64 (1), pag.61-74, 2005*

- Post K., Van Haaften B., Okkens A.C.: Vaginal hyperplasia in the bitch: literature review and commentary, *Can Vet J*, vol.32, pag. 35-37, 1991
- Poulet H., Guigal P.M., Soulier M.: Protection of puppies against Canine Herpesvirus by vaccination of the dams, *Vet Rec*, vol.148, pag.691-695, 2001
- Prentice A., Goldberg G.: Maternal obesity increases congenital malformations, *Nutr Rev*, vol.54, pag.146-152, 1996
- Pretzer S.D.: Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen, *Theriogenology*, vol.70, pag.320-326, 2008  
 Pretzer S.D.: Medical management of canine and feline dystocia, available online <http://dx.doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.04.031>, 2008a
- Pretzer S.D., Lillich R.K., Althouse G.C.: Single, transcervical insemination using frozen-thawed semen in the Greyhound: a case series study, *Theriogenology*, vol.65, pag. 1029–1036, 2006
- Purswell B.J.: Differential diagnosis of canine abortion, *Curr Vet Ther Small Anim Pract*, vol.11, pag.925-929, 1992 *IN: Görlinger S., Galac S., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Hypoluteoidism in a bitch, Theriogenology, vol.64 (1), pag.213-219, 2005*
- Purswell B.J, Parker N.A.: Modern breeding management in dogs, available online <http://www.Hilltopanimalhospital.com>, September 2000
- Purvis D.S.: Isolation of *Brucella canis* from canine with pyogranulomatous dermatitis, in Abstracts of the 81st Annual Meeting of the American Society for Microbiology, pag. 309, 1981 *IN: Wanke M.M.: Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci, vol.82-83, pag.195-207, 2004*
- Ramsey I., Herrtage M.: Distinguishing normal, sick, and hypothyroid dogs using total thyroxine and thyrotropin concentrations, *Can Pract*, vol.22, pag.43-44, 1997 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Rasmussen K.M.: The influence of maternal nutrition on lactation, *Ann Rev Nutr*, vol.12, pag.103-117, 1992
- Reading M.J., Field H.J.: A serological study of *Canine Herpesvirus-1* infection in the English dog population, *Arch Virol*, vol.143, pag.1477-1488, 1998), pp. 1477–1488, 1998
- Redwood D.W., Bell D.A.: *Salmonella panama*: isolation from aborted and newborn canine fetuses, *Vet Rec*, vol.112, pag.362, 1983
- Reimers T.J.: Endocrine testing for infertility in the bitch, in Kirk R.W. (ed): Current Veterinary Therapy VIII, WB Saunders, Philadelphia, pag.922-925, 1983 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Reynaud K., Fontbonne A., Marseloo N., Thoumire S., Chebrou M., de Lesegno C.V., Chastant-Maillard S.: In vivo meiotic resumption, fertilization and early embryonic development in the bitch, *Reproduction*, vol.130, pag.193-201, 2005

- Rezac P.: Potential application of electrical impedance techniques in female mammalian reproduction, *Theriogenology*, vol.70, pag.1-14, 2008
- Rijsewijk F.A.M., Luiten E.J., Daus F.J., Van der Heijden R.W., Van Oirschot J.T.: Prevalence of antibodies against Canine Herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997–1998, *Vet Microbiol*, vol.65, pag.1-7, 1999
- Rivier C, Rivest S.: Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanisms, *Biol Reprod*, vol.45, pag.523-532, 1991
- Roberts S.J.: *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*, 3<sup>rd</sup> ed, Woodstock, VT, pag.285, 1986 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Rocha A.A., Bastos R., Cunha I.C.N., Adona P.R., Santos J.A.: Quantity and quality of oocytes recovered from donor bitches of different ages, *Theriogenology*, vol.66 (6-7), pag.1465-1467, 2006
- Romsos D.R., Palmer H.J., Muiruri K.L.: Influence of a low carbohydrate diet on performance of pregnant and lactating dogs, *J Nutr*, vol.111, pag.678-689, 1981 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Farnir F., Poulet H.: Risk factors and reproductive disorders associated with *Canine Herpesvirus-1* (CHV-1), *Theriogenology*, vol.61, pag.619-636, 2004
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Guiot A.L., Aeberlé C., Nauwynck H.J.: Seroprevalence of *Canine Herpesvirus-1* in the Belgian dog population in 1997–1998, *Reprod Dom Anim*, vol.37, pag.299-304, 2002
- Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H.: *Canine herpesvirus-1* (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies, *Theriogenology*, vol.64 (1), pag.61-74, 2005
- Rooney N.J., Gaines S.A., Bradshaw J., W., S.: Behavioural and glucocorticoid responses of dogs (*Canis familiaris*) to kennelling: investigating mitigation of stress by prior habituation, *Phys Behav*, vol.92 (5), pag.847-854, 2007
- Rosenthal R.C.: Detection of antisperm antibodies by indirect immunofluorescence and gelatine agglutination, *Am J Vet Res*, vol. 45, pag.370, 1984 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Rosychuk R.: Management of hypothyroidism, in Kirk R.W. (eds): *Current Veterinary Therapy VIII*, Philadelphia, WB Saunders, pag.869-875, 1983
- Rota A., Mollo A., Marinelli L., Gabai G., Vincenti L. :Evaluation of cabergoline and buserelin efficacy for oestrous induction in the bitch, *Reprod Domest Anim*, vol.38, pag.440-443, 2003
- Rota A., Martino P.A., Grieco V., Veronesi M.C.: Cause batteriche di mortalità neonatale nel cane, in *Atti del 7° Congresso Nazionale della Società Italiana di Riproduzione Animale*, Messina, Italia, pag.116-118, 2009

- Samsioe G.: Urogenital aging. A hidden problem, *Am J Obstet Gynecol*, vol.178, pag.S245-S249, 1998
- Saeager S.W.J., Schubert C.L.: Semen collection and evaluation for the clinical assessment of fertility parameters in the male Rottweiler, *Can Pract*, vol. 21 (6), pag. 30-34, 1996
- Sandusky G.E., Cho D.Y.: Congestive cardiomyopathy in a dog associated with pregnancy, *Cornell Vet*, vol.74, pag.60-64, 1984 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Scanlan C.M.: Bacterial diseases of domestic animals, *Boeh Ing Vetmed*, pag.185-188, 2003
- Scantlebury M., Butterwick R., Speakman J.R.: Energetics of lactation in domestic dog (*Canis familiaris*) breeds of two sizes, *Comp Bioch Phys*, part A, pag.197-210, 2000
- Schaeffert R.M., Strauch D.: Naturally infected dog droppings from public parks and playgrounds as a possible source of infections with *Salmonellae* and helminths, *Ann 1<sup>st</sup> Seper Sanita*, vol.14, pag.295-300, 1978 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Schäfer-Somi S., Spergser J., Breintenfellner J., Aurich J.E.: Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies:a retrospective study, *J Vet Med Series B*, vol.50, pag.343-346, 2003
- Schneider F., Brüssow K.P., Kanitz E., Otten W., Tuchscherer A.: Maternal reproductive hormone levels after repeated ACTH application to pregnant gilts, *Anim Reprod Sci*, vol.81, pag.313-327, 2004
- Schroeder G.E., Smith G.A.: Food intake and growth of German shepherd puppies, *J Small Anim Pract*, vol.35, pag.587-591, 1994
- Schweizer C.M., Meyers-Wallen V.N.: Medical management of dystocia and indications for caesarean section in the bitch and queen, in Bonagura J. (ed): *Current Veterinary Therapy XIII*, WB Saunders, Philadelphia, pag.947, 2000 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Scott-Moncrieff J.C., Nelson R.W., Bill R.L., Matlock C.L., Bottoms G.D.: Serum disposition of exogenous progesterone after intramuscular administration in bitches, *Am J Vet Res*, vol.51, pag.893, 1990
- Sheffy B.E.: Nutrition and nutritional disorders, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol.8, pag.7-29, 1978 *IN: in Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Shille V.M., Thatcher M.J., Lloyd M.L., Miller D.D., Seyfert D.F., Sherrod J.D.: Gonadrotrophic control of follicular development and the use of exogenous gonadotrophins for induction of oestrus and ovulation in the bitch, *J Reprod Fertil*, vol.39, pag.103, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Shille V.M., Thatcher M.J., Simmons K.J.: Efforts to induce estrus in the bitch using pituitary gonadotrophins, *J Am Vet Med Assoc*, vol.184, pag.1469, 1984 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Silva L.D.M., Onclin K., Lejeune B.: Comparisons of intravaginal and intra-uterine insemination of bitches with fresh or frozen semen, *Vet Rec*, vol.17, pag. 154–157, 1996

Smeak D.D., Olmstead M.L., Hohn R.B. : *Brucella canis* osteomyelitis in two dogs with total hip replacements, *J Am Vet Med Ass*, vol.191, pag.986, 1987 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*

Smith F.O.: Postpartum diseases, *Vet Clin North Am Small Anim Pract*, vol.16, pag.521-524, 1986 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*

Smith C.A.: New hope for overcoming canine inherited disease, *J Am Vet Med Assoc*, vol.204, pag.41-46, 1994

Smith F.W.J., Buoen L.C., Weber A.F., Johnston S.D., Randolph J.F., Waters D.J.: X-chromosomal monosomy (77,X0) in a Doberman Pinscher with gonadal dysgenesis, *J Vet Intern Med*, vol.3, pag.90-95, 1989

Smith R.F., Ghuman S.P., Evans N.P., Karsch F.J., Dobson H.: Stress and the control of LH secretion in the ewe, *Reprod Suppl*, vol.61, pag.267-282, 2003

Sokolowski J.H., Stover D.G., Van Ravenswaay F.: Seasonal incidence of estrus and interestrous interval for bitches of seven breeds, *J Am Vet Med Ass*, vol.171, pag.271-273, 1977 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*

Staley T.E., Corley L.D., Jones E.W.: Permeability of the intestinal epithelium of neonatal puppies to *Escherichia coli*, *Gaines Vet Symp*, pag.3-8, 1969

Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Harvey H.J., Lust G.: Serum relaxin and progesterone concentrations in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxine as a marker of pregnancy, *Am J Vet Res*, vol.50, pag.68, 1989 *IN: Görlinger S., Galac S., Kooistra H.S., Okkens A.C.: Hypoluteoidism in a bitch, Theriogenology, vol.64 (1), pag.213-219, 2005*

Sturgess CP.: Listerial abortion in the bitch, editorial comment, *Vet Rec*, vol.177, 1989 *IN: Pretzer S.D.: Bacterial and protozoal causes of pregnancy loss in the bitch and queen, Theriogenology, vol.70, pag.320-326, 2008*

Suter D., Schwartz N.: Effects of glucorticoids on secretion of LH and FSH by female rat pituitary cells in vitro, *Endocrinology*, vol.117, pag.849-854, 1985

Thatcher W.W.: Effects of season, climate and temperature on reproduction and lactation, *J Dairy Sci*, vol.57, pag.360, 1974

- Thacker E.L.: Etiology of adult-onset canine autoimmune hypothyroidism, *Can Pract*, vol.22, pag. 12-13, 1997 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Thomassen R., Sanson G., Krogenaes A., Fougner J.A., Berg K.A., Farstad W.: Artificial insemination with frozen semen in dogs: a retrospective study of 10 years using a non-surgical approach, *Theriogenology*, vol.66, pag. 1645–1650, 2006
- Tizard I.R.: Immunity in the fetus and newborn, in Tizard I.R. (ed): *Veterinary Immunology*, 5<sup>th</sup> edition, Philadelphia, WB Saunders, pag.237-250, 1996
- Torre E., Tello M.: Factors influencing fecal shedding of *Campylobacter jejuni* in dogs without diarrhea, *Am J Vet Res*, vol.54, pag.260-262, 1993 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Troger C.P.: Vaginal prolapse in the bitch, *Mod Vet Pract*, vol.51, pag.38-41, 1970 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Tsai H.J., Huang H.C., Lin C.M., Lien Y.Y., Chou C.H.: Salmonellae and Campylobacters in household and stray dogs in northern Taiwan, *Vet Res Commun*, vol.31, pag.931-935, 2007
- Tuber D.S, Miller D.D., Caris K.A., Halter R., Linden F., Hennessy M.B.: Dogs in animal shelters: problems, suggestions and needed expertise, *Psychol Sci*, vol.10, pag.379, 1999
- Turner A.I., Hemsworth P.H., Canny B.J., Tilbrook A.J.: Sustained but not repeated acute elevations of cortisol impaired the luteinizing hormone surge, estrus, and ovulation in gilts, *Biol Reprod*, vol.61, pag.614-620, 1999
- Van Der Weyden G.C., Taverne M.A., Dieleman S.J., Wurth Y., Bevers M.M., Van Oord H.A.: Physiological aspects of pregnancy and parturition in dogs, *J Reprod Fertil Suppl*, vol.39, pag.211-224, 1989
- Van Gucht S., Nauwynck H., Pensaert M.: Prevalence of Canine Herpesvirus in kennels and the possible association with fertility problems and neonatal death, *Vlaams Dier Tijd*, vol.70, pag.204-211, 2001
- Van Haaften B., Dieleman S.J., Okkens A.C.: Induction of oestrus and ovulation in dogs by treatment with PMSG and/or bromocriptine, *J Reprod Fertil Suppl*, (abstract) vol.39, pag.330-331, 1989 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Vanderlip S.L., Lasley, B., Concannon, P.W.: Ovulation induction in anestrus bitches by pulsatile administration of GnRH, *Lab Anim Sci*, vol.27, pag.459, 1987 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Verstegen J.: Hormonal treatment and reproductive failure in the bitch and queen, *Rev Bras Reprod Anim*, vol.25, pag.79-83, 2001

- Verstegen J., Dhaliwal G., Verstegen- Onclin K.: Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: a review, *Theriogenology*, vol.70, pag.304-319, 2008
- Von Borell E., Dobson H., Prunier A.: Stress, behaviour and reproductive performance in female cattle and pigs, *Horm Behav*, vol.52, pag.130-138, 2007
- Von Root Kustritz M.: Use of supplemental progesterone in the management of canine pregnancy, in Concannon P.W., England G., Verstegen J. (eds): *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2002
- Von Root Kustritz M.: Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog, *Theriogenology*, vol.64 (3), pag.755-765, 2005
- Von Root Kustritz M., Johnston S.D., Johnston G.R.: Vaginal septa in dogs: 15 cases, *J Am Vet Med Assoc*, vol.205, pag.56-58, 1995
- Walker S.L., Smith R.F., Jones D.N., Routly J.E., Dobson H.: Chronic stress, hormone profiles and estrus intensity in dairy cattle, *Horm Behav*, vol.53, pag.493-501, 2008
- Wallace S.S., Mahaffey M.B., Miller D.M., Thompson F.N., Chakraborty P.K.: Ultrasonographic appearance of the ovaries of dogs during the follicular and luteal phases of the estrous cycle, *Am J Vet Res*, vol.53, pag.209-15, 1992
- Wanke M.M.: Canine Brucellosis, *Anim Reprod Sci*, vol.82-83, pag.195-207, 2004
- Wanke M.M., Delpino M.V., Baldi P.C.: Use of enrofloxacin in the treatment of canine brucellosis in a dog kennel (clinical trial), *Theriogenology*, vol.66, pag.1573-1578, 2006
- Watts J.R., Wright P.J.: Investigating uterine disease in the bitch: uterine cannulation for cytology, microbiology, and hysteroscopy, *J Small Anim Pract*, vol. 36, pag. 201, 1995
- Weber A., Schliesser T.: Serologischer und kultureller Nachweis von *Brucella canis* bei Beagle-Hunden einer Versuchstierhaltung, *Zentralbl Veterinarmed*, vol.22B, pag.403-410, 1975 *IN: Wanke M.M.: Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci, vol.82-83, pag.195-207, 2004*
- West J.W.: Effects of heat-stress on production in dairy cattle, *J Dairy Sci*, vol.86, pag.2131-2144, 2003
- Wettemann R.P., Bazer F.W.: Influence of environmental temperature on prolificacy of pigs, *J Reprod Fert*, vol.33, pag.199-208, 1985
- Wildt D.E., Baas E.J., Chakraborty P.K.: Influence of inbreeding on reproductive performance, ejaculate quality and testicular volume in the dog, *Theriogenology*, vol.17, pag.445-452, 1982 *IN: Gobello C., Corrada Y.: Noninfectious spontaneous pregnancy loss in bitches, Compendium, vol.24, pag.778-783, 2002*
- Wilson M.S.: Non-surgical intrauterine artificial insemination in bitches using frozen semen, *J Repr and Fert*, vol.47, pag. 307-311, 1993
- Wingfield J.C., Sapolsky R.M.: Reproduction and resistance to stress: when and how, *J Neuroend*, vol.15, pag.711-724, 2003

- Winters W.D.: Time dependent decreases of maternal canine virus antibodies in newborn pups, *Vet Rec*, vol.108, pag.295-299, 1981
- Wolfenson D., Tatcher W.W., Badinga L., Savio J.D., Meidan R., Lew B.J., Braw-Tal R., Berman A.: Effect of heat stress on follicular development during the estrous cycle in lactating dairy cattle, *Biol Reprod*, vol.52, pag.1106-1113, 1995
- Wright P.J.: The induction of oestrus in the bitch using daily injections of pregnant mare serum gonadotrophin, *Aust Vet J*, vol.59, pag.123-124, 1982 *IN: Johnston S.D., Von Root Kustritz M.V., Olson P.N.S.: Canine and feline theriogenology, Saunders Company, Philadelphia, 2001*
- Wright P.J., Watts J.R.: The infertile female, in Simpson G.M., England G.W.C., Harvey M (eds): *Manual of Small Animal Reproduction and Neonatology*, BSAVA , Cheltenham, 1998
- Wykes P.M., Soderberg S.F.: Congenital abnormalities of the canine vagina and vulva, *J Am Anim Hosp Assoc*, vol.19, pag.995-1000, 1983 *IN: Feldman E.C., Nelson R.W.: Canine and feline endocrinology and reproduction, 3<sup>rd</sup> ed, ed. Elsevier Science, 2004*
- Yeager A.E., Concannon P.W.: Ovaries, in Greene R.W. (ed): *Small Animal Ultrasound*, Philadelphia, Lippincott-Raven, pag.293-303, 1996 *IN: Concannon P.W., England E., Verstegen J. (eds): Recent Advances in Small Animal Reproduction, Ithaca, NY, International Veterinary Information Service, 2002*
- Ying W., Nguyen M.Q., Jahre J.A.: *Brucella canis* endocarditis: case report, *Clin Infect Dis*, vol.29, pag.1593-1594, 1999
- Young R.K., Yagel S.K., Towfighi J.: Systemic and neuropathologic effect of *E. coli* endotoxin in neonatal dogs, *Pediatr Res*, vol.17, pag.349-353, 1983
- Zentek J., Meyer H.: Energieaufnahme adulter Deutscher Doggen, Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift, vol.105, pag.325-327, 1992 *IN: Hand N.S., Thatcher C.D., Remillard R.L., Roudebush P., Novotnt B. J. (eds): Small Animal Clinical Nutrition, 5<sup>th</sup> ed, Mark Morris Institute, 2010*
- Zoha S.J., Carmichael L.E.: Properties of cell wall antigens of virulent *Brucella canis* and a less mucoid variant of reduced pathogenicity, *Am J Vet Res*, vol.43, pag.171-174, 1982 *IN: Wanke M.M.: Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci, vol.82-83, pag.195-207, 2004*
- Zoha S.J., Walsh R.: Effect of a two-stage antibiotic treatment regimen on dogs naturally infected with *Brucella canis*, *J Am Vet Med Assoc*, vol.180, pag.1474-1475, 1982 *IN: Wanke M.M.: Canine Brucellosis, Anim Reprod Sci, vol.82-83, pag.195-207, 2004*

