

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA
FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA
DIPARTIMENTO DI SCIENZE CLINICHE VETERINARIE
CORSO DI LAUREA IN MEDICINA VETERINARIA



TESI DI LAUREA

APPROCCIO ALL'INFERTILITÀ CANINA

Relatore: Dott. Antonio Mollo
Correlatori: Dott.ssa Maria Luisa Menandro
Dott.ssa. Michela Corrò

Laureanda: Giada Faccioli

ANNO ACCADEMICO 2007-2008

INDICE

<u>1.1 GENERALITA' SUL CICLO ESTRALE DELLA CAGNA</u>	5
1.1.1 <i>La pubertà</i>	5
1.1.2 <i>Il ciclo estrale</i>	6
1.1.3 <i>Il periodo fertile</i>	9
<u>1.2 METODI DI VALUTAZIONE DEL CICLO ESTRALE</u>	10
1.2.1 <i>La colpocitologia</i>	10
<u>1.2.1.1 Cellule visibili</u>	11
<u>1.2.1.2 Interpretazione</u>	12
1.2.2. <i>Valutazione degli ormoni riproduttivi</i>	15
1.2.2.1. <i>La progesteronemia</i>	15
<u>1.2.2.2 Interpretazione</u>	16
1.2.2.3 <i>L' estradiolo</i>	17
1.2.2.4 <i>LH e FSH</i>	18
1.2.2.5 <i>Il GnRh</i>	19
<u>1.2.3. Tecnica di ecografia dell'apparato genitale femminile</u>	20
1.2.3.1 <i>Preparazione del paziente</i>	20
1.2.3.2 <i>Scelta della sonda e della modalità</i>	20
1.2.3.3 <i>Posizione dell'animale</i>	21
1.2.3.4 <i>Posizione della sonda</i>	21
1.2.3.5 <i>Aspetto normale dell'utero</i>	22
1.2.3.6 <i>Utero e gravidanza</i>	22
1.2.3.7 <i>Aspetto normale delle ovaie</i>	24
1.2.3.8 <i>Conclusioni</i>	26
<u>1.3 DEFINIZIONE DI INFERTILITA'</u>	27
<u>1.4 VALUTAZIONE DELLA FERTILITA' DEL MASCHIO</u>	36
1.4.1 <i>Il prelievo del seme</i>	37
1.4.2 <i>Analisi sul seme</i>	38
1.4.3 <i>Management dello stallone con seme anomalo</i>	40
<u>1.5 VALUTAZIONE DELLA FEMMINA</u>	45
1.5.1 <i>Incapacità di presentare il ciclo</i>	47
1.5.2 <i>Intervallo interestrale abbreviato</i>	49
1.5.3 <i>Intervallo interestrale protratto</i>	49
1.5.4 <i>Estro persistente</i>	51
1.5.5 <i>Rifiuto dell' accoppiamento</i>	52

1.5.6	<i>Infertilità con attività ciclica normale</i>	52
1.5.7	<i>Agenti infettivi e infertilità</i>	53
1.6	<u>CARATTERIZZAZIONE DEI BATTERI</u>	57
1.6.1	<i>Genere PSEUDOMONAS</i>	57
1.6.2	<i>Famiglia delle ENTEROBACTERIACEAE</i>	58
1.6.2.1	<i>Genere ESCHERICHIA</i>	58
1.6.2.2	<i>Genere SALMONELLA</i>	59
1.6.3	<i>Genere ENTEROBACTER</i>	60
1.6.4	<i>Genere PROTEUS</i>	60
1.6.5	<i>Famiglia delle PASTEURELLACEAE</i>	62
1.6.5.1	<i>Genere ACTINOBACILLUS</i>	62
1.6.5.2	<i>Genere PASTEURELLA</i>	63
1.6.6	<i>Genere BACTERIOIDES</i>	63
1.6.7	<i>Genere STREPTOCOCCUS</i>	64
1.6.8	<i>Genere ENTEROCOCCUS</i>	64
1.6.9	<i>Genere STAPHYLOCOCCUS</i>	65
1.6.10	<i>Genere BACILLUS</i>	67
1.6.11	<i>Genere CAMPYLOBACTER</i>	67
1.6.12	<i>Genere MYCOPLASMA</i>	68
2.	<u>OBIETTIVI</u>	73
3.	<u>MATERIALI E METODI</u>	74
3.1	<i>Rilevazione dei dati</i>	74
3.1.1	<i><u>Schede di valutazione</u></i>	74
3.1.1.1	<i><u>Informazioni generali</u></i>	75
3.1.1.3	<i><u>Stato di salute</u></i>	75
3.1.1.4	<i><u>Vita riproduttiva</u></i>	75
3.1.1.5	<i><u>Management dell' allevamento</u></i>	75
3.1.2	<i>L' intervallo di tempo</i>	75
3.2	<i>Il prelievo dei campioni vaginali per il batteriologico</i>	78
3.3	<i>Prelievo dei campioni per la ricerca di Mycoplasma</i>	79
3.4	<i>Prelievo dei campioni di latte pre e post parto</i>	80
3.5	<i>Preparazione del terreno selettivo per Mycoplasma</i>	80
3.6	<i>Semina dei tamponi</i>	81
3.7	<i>Tecnica di autopsia di un cucciolo</i>	82
3.8	<i>Lettura delle piastre</i>	83
3.9	<i>L' antibiogramma</i>	88

3.10 L'analisi statistica.....	89
4.RISULTATI E DISCUSSIONE.....	91
4.1 Descrizione degli allevamenti.....	92
4.2 Descrizione dei soggetti.....	98
4.3 Conclusioni.....	123
BIBLIOGRAFIA.....	125

1.1 GENERALITA' SUL CICLO ESTRALE DELLA CAGNA

1.1.1 La pubertà

E' definita come momento in cui il soggetto raggiunge la capacità di riprodursi; nella cagna essa coincide con il primo proestro; tale momento è influenzato dalla razza e dalla taglia dell'animale: generalmente razze di grossa taglia hanno una pubertà più tardiva rispetto a razze di piccola taglia (*Davidson, 2006*). Il raggiungimento dell'età fertile è stimato mediamente a circa 9-10 mesi d'età, con limiti compresi tra 6 e 24mesi (*Nelson RW, Couto CG, 2006*).

Tab 1 : Raggiungimento della pubertà in alcune razze canine (*Evans JM et al, 1988.*)

Razza	Raggiungimento della pubertà(mesi)
Airedale Terrier	15
Alano	>18
Australian Sheperd	6-18
Border Collie	6-8
Boxer	8-24
Bullmastiff	6-16
Bull Terrier	7-11
English Setter	7-20
Golden Retriever	9-11
Greyhound	11-30
Pastore dei pirenei	12
Rottweiler	8
Samoiedo	>12
Yorkshire Terrier	8-16

Nei primi due-tre cicli estrali le varie fasi si susseguono piuttosto irregolarmente, e la loro manifestazione è variabile da soggetto a soggetto: la durata estro-proestro può esser ridotta, vi è maggior incidenza di *falsi calori*, caratterizzati da manifestazioni fisiche tipiche dell'estro

non accompagnate da ovulazione, oppure sono presenti *calori silenti*, in cui esiste ovulazione in assenza di manifestazioni estrali (Johnston C et al, 2001).

L'intervallo tra due cicli successivi, o intervallo interestrato, varia da 4 a 12 mesi, con una media di 7 mesi (Nelson RW, Couto CG, 2006).

Il periodo di maggior 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 C et al, 2001).

1.1.2 Il ciclo estrale

Il ciclo riproduttivo normale della specie canina può essere suddiviso in quattro fasi, ciascuna identificata da caratteristici quadri fisici, endocrinologici e comportamentali, benché esistano considerevoli variazioni individuali; le cagne con cicli estrali normali ma con quadri comportamentali diversi dalla norma devono essere differenziate da quelle che presentano autentiche anomalie del ciclo: l'identificazione delle variazioni individuali nell'ambito della normale gamma di eventi che caratterizzano il ciclo estrale delle cagne fertili può essere di importanza cruciale per la gestione dell'attività riproduttiva (Blendinger K, 2007).

La cagna manifesta il ciclo estrale mediamente ogni sette mesi. L'intervallo interestrato (calcolato dal termine della fase estrale propriamente detta all'inizio del proestro successivo) ha durata variabile tra i 5 e i 10 mesi; dunque l'animale tenderà, nell'arco della sua vita, a manifestare i calori in diversi mesi dell'anno. Sembra che l'età costituisca un fattore che determina la variazione dell'intervallo interestrato: col progredire degli anni, di media superati gli otto, assistiamo in alcuni casi ad un allungamento della durata dell'anaestro; anche patologie sistemiche, cachessia, squilibri endocrini comportano un allungamento della fase anovulatoria (Blendinger K, 2007).

Il ciclo estrale può essere suddiviso sulla base del comportamento della cagna in:

Proestro: ha durata in media di nove giorni, ma può variare in un range che va dai 3 ai 17 giorni.

All'inizio di tale fase la mucosa vulvare, sotto l'effetto della secrezione degli estrogeni diviene edematosa, e la diapedesi degli eritrociti dai vasi al lume uterino determinano il tipico scolo vulvare sieroematico (Davidson, 2006): la cagna desta l'attrazione del maschio, ma lo rifiuta mostrando aggressività nei suoi confronti e sedendosi quando questo tenta

l'intromissione. La colpocitologia del proestro mostra che le cellule cheratinizzate prive di nucleo vanno progressivamente aumentando di circa il 10% al giorno, fino ad arrivare al 100% alle soglie dell'estro (*Davidson, 2006*). La fine del proestro è determinata da un picco di estrogeni, e il loro brusco abbassamento determina nella femmina i segni clinici dell'estro.

Estro: la femmina attrae il maschio ed è recettiva all'accoppiamento; ha durata media di 9 giorni, ma può variare dai 3 ai 21 giorni. La vulva è comunque edematosa ma diviene soffice, lo scolo vulvare sieroematico diminuisce divenendo sieroso, tendente al giallo paglierino. La colpocitologia mostra uno striscio per più del 90% formato da cellule corneificate, riflesso dell'effetto degli estrogeni secreti in proestro sulla parete vaginale, e non sono presenti né neutrofilo, né eritrociti. La vaginoscopia mostra una mucosa cosiddetta "incartapecorita", e ciò è dovuto alla sua disidratazione provocata dal brusco calo degli estrogeni all'inizio dell'estro (*Blendinger K, 2007*).

Diestro: la femmina entra in questa fase quando, dopo la fase estrale, non accetta più il maschio. Il primo giorno di diestro, chiamato "giorno uno", è caratterizzato da un passaggio improvviso della citologia vaginale da un tappeto di cellule cheratinizzate prive di nucleo ad un misto di cellule parabasali nucleate, neutrofilo e qualche eritrocita. Dura circa 70 giorni, ma si può dire concluso quando il livello sierico di progesterone decade al di sotto dei 3ng/ml (*Schaefers-Okkens, 1990*).

Il ciclo estrale può anche esser suddiviso sulla base della funzionalità ovarica in:

Fase follicolare: i follicoli terziari sviluppano e man a mano iniziano a produrre estradiolo, che determina, oltre al comportamento estrale, anche una serie di modificazioni anatomiche come l'allungamento e l'iperemia delle corna uterine, l'allargamento della cervice, l'assottigliamento della parete vaginale, la cheratinizzazione delle cellule della mucosa vaginale e l'edema; a volte tale edema può determinare una stenosi dell'orificio uretrale.

Durante questa fase sia l'ormone luteinizzante (LH) che l'ormone follicolo-stimolante (FSH) nel plasma sono relativamente bassi.

Luteinizzazione pre-ovulatoria e ovulazione: la secrezione pre-ovulatoria di LH dura dalle 24 alle 72 ore, segue di solito il picco di estradiolo, e induce la luteinizzazione nel follicolo pre-ovulatorio; in questa fase aumenta progressivamente la secrezione di progesterone,

derivante dalle cellule luteiniche presenti sulla parete dell'ovulo in via di sviluppo; molti dei follicoli che ovulano nel cane rilasciano oociti primari che portano a termine il loro processo maturativo nei due-tre giorni successivi.

Fase luteinica: in tale periodo aumenta la concentrazione di progesterone ematico, rilasciato dal corpo luteo che velocemente si è formato dopo l'ovulazione; il massimo livello di progesterone viene raggiunto a 30 giorni dal picco di LH. Nelle cagne non gravide il progesterone ematico decade a 75 giorni dall'inizio della fase luteinica. In questa fase la mucosa vaginale appare come un "patchwork" di aree rosse e aree pallide, e il suo edema diminuisce fino a sparire. Nella prima metà di questa fase il corpo luteo funziona indipendentemente dal supporto dell'ipofisi; successivamente sarà necessario il rilascio di prolattina come fattore luteotropo.

Anaestro: il passaggio dalla fase luteinica all'anaestro è graduale, inizia quando la quantità di progesterone è inferiore alle 3 nmol/L (*Schaefer-Okkens, 1990*). La concentrazione plasmatica di FSH è più alta che in proestro; la durata di tale fase è di circa 200 giorni, ma dipende dalla razza (pare che le razze Basenji e Tibetan mastiff siano influenzate dal fotoperiodo), e dall'ambiente (cagne in anaestro in vicinanza di cagne in estro anticipano il calore); questo è un periodo di riparazione endometriale (*Nelson RW, Couto CG, 2006*); la citologia vaginale è ipocellulare, priva di cellule corneificate, e la parete vaginale è sottile e pallida (*Davidson, 2006*). La secrezione di prolattina da parte dell'ipofisi mantiene lo stato di anaestro: l'uso di antiprolattinici in questa fase ne induce la fine (*Davidson et al. 2006*).

Intervallo interestrale: è determinato in base alla durata del diestro, che varia dai 45 ai 60 giorni e dalla durata dell'anaestro, anch'esso variabile, dai 90 ai 150 giorni. La durata media dell'interestro si aggira attorno ai 7 mesi (*Davidson, 2006*). L'interestro tende ad allungarsi dopo gli 8 anni di età.

1.1.3 Il periodo fertile

Per identificare il momento del calore va valutata la presenza delle manifestazioni fisiche della fase iniziale del proestro come le perdite siero-ematiche vulvari, l'irrequietezza, le reazioni violente nei confronti del maschio che dimostra interesse; in questo periodo la cagna va attentamente monitorata, al fine di individuare il momento migliore per l'accoppiamento: ad un attento esame clinico potrà esser associato un primo controllo colpocitologico o il dosaggio della concentrazione ematica del progesterone per valutare con precisione la fase del ciclo in cui si trovala femmina; l'esame colpocitologico dovrebbe esser ripetuto ogni 2-4 giorni, fino ad evidenziare un aumento significativo (>70%) delle cellule cheratinizzate; quando questo avviene sarebbe opportuno ripetere il dosaggio ormonale (*Goodman, 2001*).

La valutazione del progesterone ematico va ripetuta a giorni alterni, fino al superamento dei 2ng/ml; il tempo di recettività e il periodo fertile variano notevolmente all'interno dell'estro: spesso gli allevatori lo identificano dopo 10-14 giorni dall'inizio delle perdite vulvari sanguinolente, in realtà per identificarlo con precisione ci si deve basare sulla valutazione dello striscio vaginale, sulla misurazione del progesterone o di LH sierici, sull'aspetto della mucosa vaginale alla vaginoscopia, o meglio sull'associazione di due o più di questi metodi (*Davidson, 2006*).

Generalmente si effettua la citologia ogni due giorni dopo la comparsa dei primi segni clinici di proestro, e quando si nota una progressiva cheratinizzazione che supera il 70% delle cellule presenti si passa alla valutazione ormonale, sempre ogni due giorni. Il momento in cui il progesterone supera il livello di 2ng/ml viene identificato come "giorno zero": l'accoppiamento è utile che avvenga nei giorni due, quattro e sei dopo il superamento di questo valore per aver la maggior probabilità di concepimento (*Davidson, 2006*).

Il momento ideale per effettuare l'accoppiamento nel caso in cui non sia possibile ripeterlo è il 2° giorno dopo il raggiungimento dei 4ng/ml. L'endoscopia vaginale può esser un buon ausilio, se affiancata alla colpocitologia e al dosaggio ormonale, soprattutto in caso di femmine con cicli anomali.

1.2 METODI DI VALUTAZIONE DEL CICLO ESTRALE

1.2.1 La colpocitologia

L'esame colpocitologico è una valutazione della cellule presenti sulla volta prossimale della vagina, le quali manifestano *patterns* diversi a seconda della quantità di estrogeni presenti in circolo, e quindi a seconda del momento del ciclo estrale in cui si trova l'animale.

Il prelievo viene effettuato con un comune tampone di cotone lungo 10-15 cm, pulito, meglio se inumidito con fisiologica che permette un miglior scivolamento sui tessuti: con una mano viene afferrato tra pollice e indice un labbro della rima vulvare, e con il dito medio si effettua una leggera pressione al di sotto della vulva, per determinare la dilatazione delle labbra vulvari; il tampone va inserito all'interno dell'apertura con un'inclinazione di circa 70°, cioè quasi verticalmente, per seguire l'inclinazione del vestibolo della vagina, avendo cura di farlo scivolare dorsalmente in modo da evitare il fondo cieco vaginale presente nella parte ventrale della stessa: l'inserimento deve avvenire delicatamente, senza incontrare particolari resistenze. Una volta inserita una parte del tampone (dipendente dalla taglia della femmina), esso va portato quasi parallelo al terreno e sospinto cranialmente fino a quando non si noterà una resistenza (*Malandain E., Fontbonne A, 2006*): questo sarà il segno che la testa cotonata del tampone è arrivata sulla volta della vagina; a questo punto va ruotato su se stesso, va estratto, rotolato su un vetrino molato e pulito e lasciato asciugare qualche minuto. Dopo ciò il campione sarà pronto per la colorazione.

Si possono utilizzare colorazioni semplici come Diff-Quick, May Grøndwal, o Giemsa che permettono di valutare sia cellule epiteliali che globuli rossi o bianchi; con queste colorazioni le cellule cheratinizzate assumono una colorazione rosata mentre le cellule nucleate diventano blu; oppure si possono usare colorazioni differenziali come Papanicolau, o Harris- Schorr: con quest'ultima le cellule cheratinizzate si colorano di rosso, mentre le nucleate di blu, e in base alla distribuzione del colorante è possibile identificare il cosiddetto indice di eosinofilia dato dal rapporto tra il numero di cellule eosinofile (rosse) e il numero di cellule totali; nella fase estrale questo rapporto è pari al 70-80% (*Malandain E, Fontbonne A, 2006*).

1.2.1.1 Cellule visibili

Le cellule valutate fanno parte dell'epitelio superficiale della vagina: quest'ultimo, in risposta all'aumento degli estrogeni ematici passa da uno spessore di 2-3 strati ad un epitelio pluristratificato di oltre 20-30 strati.

Cellule basali

Sono piccole, rotondeggianti, fanno parte dello strato basale dell'epitelio, quindi raramente sono visibili nello striscio.

Cellule parabasali

Sono le cellule epiteliali più piccole riscontrabili nello striscio vaginale, il loro diametro varia tra i 10 e i 20 micron (*Concannon, Digregorio, 1986*); la loro forma varia dall'ovalare alla circolare.

Cellule intermedie

Sono di varia grandezza, con diametro compreso tra i 20 e i 30 micron, a margini irregolari o angolati (*Olson, 1989*).

Cellule superficiali o cheratinizzate

Grandi cellule epiteliali con diametro compreso tra i 30 e i 75 micron (*Concannon, 1986; Olson, 1989*). La loro denominazione è dovuta alla posizione superficiale che vanno ad occupare a livello della mucosa vaginale al momento della massima stimolazione da parte degli estrogeni. Il loro nucleo è picnotico, se non addirittura indistinguibile dal citoplasma, la loro forma è poligonale (*Post, 1985*).

Cellule delle linee ematiche

Possono esser presenti globuli rossi durante il proestro, l'estro o l'inizio del diestro, che giungono nell'utero per diapodesi, quando la concentrazione ematica di estradiolo aumenta (*Davidson, 2006*). Si possono riscontrare anche cellule della linea bianca, soprattutto neutrofili; tale presenza è fisiologica nella fase diestrale, è indice di patologia se presente in proestro o estro. Nello striscio è possibile ritrovare anche batteri, molto piccoli rispetto alle altre cellule.

1.2.1.2 Interpretazione (Malandain E., Fontbonne A., 2006):

Fasi iniziali del Proestro:

sono osservabili numerosi globuli rossi e un misto tra cellule parabasali e superficiali che progressivamente aumentano il loro volume, diventando sempre più angolari;

Proestro:

il numero delle cellule superficiali aumenta e così pure l'indice di eosinofilia; lo sfondo ha un aspetto mucoso con detriti cellulari.

Termine del proestro:

aumenta il numero di cellule eosinofile cheratinizzate e lo sfondo si schiarisce per la diminuzione dei detriti cellulari.

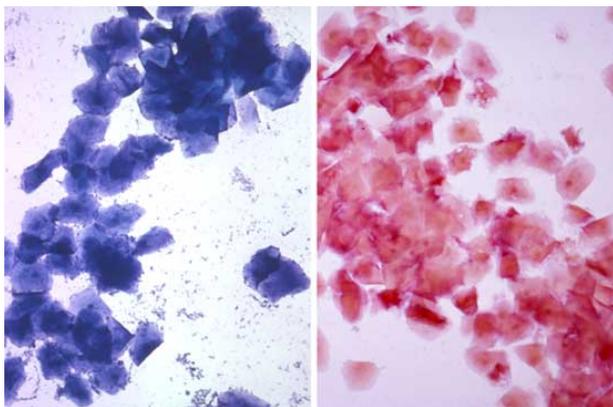


Fig 1: foto al microscopio ottico di prelievo colpocitologico ottenuta in tardo proestro, colorato dopo rotolamento su vetrino, con colorazione Wrights Giemsa (a sinistra) e Diff Quick (a destra): la colorazione rossastra è tipica delle cellule cheratinizzate.

Estro:

vi è totale assenza di leucociti, sono presenti batteri, rare le emazie, prevalgono per più dell'80% le cellule superficiali prive nucleo (Feldman e Nelson, 1998); lo sfondo è privo di detriti cellulari.

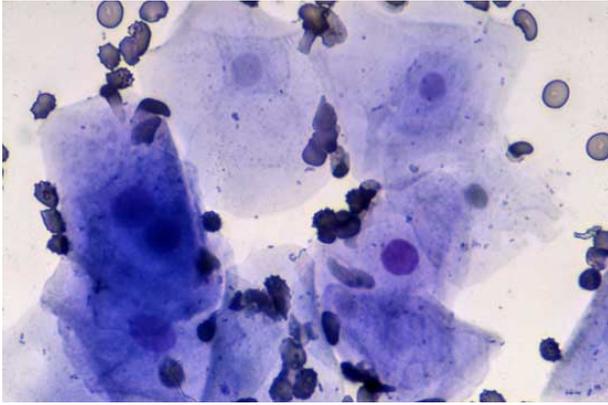


Fig 2: colpocitologia ottenuta durante la prima fase dell'estro, contenente un numero crescente di cellule epiteliali cheratinizzate, prive di nucleo o con nucleo picnotico. Vi sono numerosi eritrociti derivanti dalla diapedesi intrauterina estrogeno-dipendente avvenuta in corso di proestro. La colorazione è Diff-Quick.

Fase finale dell'estro:

sono presenti solamente cellule epiteliali cheratinizzate degenerate e qualche batterio.

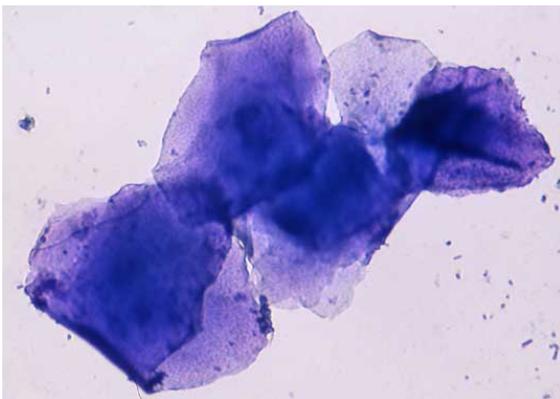


Fig3 : colpocitologia vaginale ottenuta durante il tardo estro, contenente solamente cellule superficiali corneificate e pochi batteri. Alcuni batteri sono considerati normale riscontro della flora vaginale se osservati in modica quantità.

Diestro:

questa fase presenta numerose cellule epiteliali parabasali nucleate basofile, numerosi polimorfonucleati, ed emazie in minima quantità.

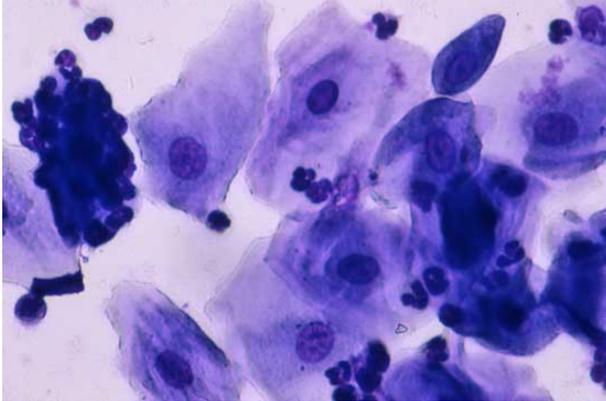


Fig 4: colpocitologia vaginale dell'inizio del diestro: si nota una diminuzione delle cellule cheratinizzate e un aumento delle cellule parabasali e intermedie. Caratteristica di questa fase è la presenza di leucociti.

Anaestro:

sono presenti cellule parabasali in minima quantità, basofile, con nucleo chiaramente evidente. La colpocitologia di tale fase è abbastanza sovrapponibile con quella del diestro.

1.2.2 Valutazione degli ormoni riproduttivi

Nella cagna il cui organismo si sta preparando al ciclo estrale è possibile valutare la concentrazione sierica di alcuni ormoni come il progesterone, l'estradiolo, l'ormone luteinizzante (LH), l'ormone follicolostimolante (FSH) e l'ormone che permette il rilascio ipofisario delle gonadotropine (GnRh) al fine di valutare se è avvenuta o meno l'ovulazione o se siano presenti situazioni patologiche del ciclo stesso o degli organi genitali. Ciò che discrimina quale esame scegliere è dettato dal grado di precisione e dal costo di ogni test.

1.2.2.1 La progesteronemia

La misurazione dei livelli sierici di progesterone viene valutata per approfondire gli aspetti rilevati con la colpocitologia vaginale: conoscendo la progesteronemia si può stabilire se sia avvenuto o meno il picco preovulatorio di LH che si riflette determinando nel follicolo preovulatorio il rilascio ormonale; il riconoscimento dell'estro può essere effettuato dosando la progesteronemia a giorni alterni, dopo aver riconosciuto il proestro con la colpocitologia vaginale, o dopo aver osservato le tipiche perdite vulvari sieroematiche.

Anche nelle cagne gravide con pregresse distocie trova applicazione la valutazione del progesterone: il parto avviene entro 48 ore dal momento in cui la progesteronemia scende al di sotto di 1-2 ng/ml (*Nelson RW, CoutoCG, 2006*), di conseguenza è possibile pianificare eventuali tagli cesarei.

L'esame viene effettuato su un campione di siero, ottenibile con un prelievo di sangue in provetta senza anticoagulante, con la successiva centrifugazione del campione.

Vi sono diverse indagini di laboratorio descritte, ognuna con accuratezza, precisione e costi diversi.

Il metodo più valido e accurato per dosare il progesterone è quello radioimmunoenzimatico o RIA (*Lucchetti E. et al., 2005*). Ma la crescente richiesta di metodiche immunologiche sensibili, senza utilizzare radioisotopi, ha condotto allo sviluppo di saggi immunologici con traccianti enzimatici, fluorescenti e luminescenti che li hanno ormai sostituiti.

Il principio di queste tecniche è per tutte simile: l'antigene oppure l'anticorpo è immobilizzato nei pozzetti di una piastra microtitolo, su una membrana o su un vetrino per microscopio. La proteina di interesse (in tal caso il progesterone) viene quindi rilevata, in modo diretto o indiretto, usando un anticorpo coniugato marcato con un enzima. Il substrato è quindi aggiunto e, dopo la reazione con l'enzima, è convertito in un prodotto colorato o

luminescente. Tra questi un metodo economico e comunque affidabile è quello di chemioimmunoluminescenza (CLIA); in essa l'anticorpo che andrà ad evidenziare la presenza del progesterone è dotato di luminescenza propria (*Lucchetti E. et al., 2005*).

Più semplicemente possiamo usare i classici test immunoenzimatici ELISA su piastra di lettura spettrofotometrica. Oggi sono in commercio anche test ELISA semi-quantitativi di uso ambulatoriale (Canine Ovulation Timing Test-ICG-status-Pro Synbiotics Corp.) la cui interpretazione può essere rapidamente effettuata con l'osservazione diretta dell'intensità di colore che si sviluppa al termine della reazione (*Nelson RW, Couto CG, 2006*). I metodi immunologici si basano sulla specificità di anticorpi monoclonali o policlonali verso il progesterone. In un saggio ELISA correttamente eseguito l'intensità di colore o di luce generata è direttamente proporzionale alla quantità di progesterone presente.

In confronto alla determinazione delle concentrazioni di progesterone con il metodo RIA, il kit ELISA è risultato accurato, in media, all'86% (*Nelson RW, Couto CG, 2006*). I risultati della valutazione semiquantitativa sono distinti in bassi, intermedi ed elevati. La gamma indicata come bassa è di solito inferiore ai 2ng/ml, quella intermedia è approssimativamente compresa tra 2ng/ml e 5-7ng/ml, e quella alta è superiore a 7ng/ml, a seconda del produttore del kit; il limite di questi test è dato dal fatto che il risultato "intermedio" rientra in un valore di progesteronemia troppo ampio per dare una precisa indicazione nel caso si possa effettuare un'unica monta, e per questo gli allevatori preferiscono affidarsi a laboratori che possano esprimere con precisione il livello di progesterone ematico raggiunto dalla femmina.

Per l'esecuzione di immunodosaggi eterogenei esistono in commercio sistemi completamente automatici basati sull'integrazione di diversi moduli che possono anche operare in modo indipendente, rappresentati da: un preparatore per la dispensazione di campioni e reagenti; un sistema di incubazione termostatica automatizzata (fino a 45°C); un washer; un lettore per tubi, strips e micropiastre che può essere un fotometro, un fluorimetro, oppure un luminometro.

Con tali strumenti basta inserire il campione nella macchina e attendere il risultato che verrà espresso nel software.

1.2.2.2 Interpretazione

Livelli inferiori a 2ng/ml testimoniano che il picco di LH non è ancora stato raggiunto; livelli superiori a 2-5ng/ml sono contemporanei al picco di luteinico: l'ovulazione avverrà entro 2gg;

livelli compresi tra 6-10ng/ml indicano che l'ovulazione è già avvenuta e che il periodo fertile è quasi finito;

livelli superiori a 15ng/ml sono raggiunti dopo il periodo fertile;

livelli superiori a 10ng/ml sono raggiunti anche in gravidanza: la misura della progesteronemia non è un test di gravidanza ma il suo crollo a livelli inferiori a 10ng/ml è indice di parto imminente(circa 24 ore); per riconoscere questo fenomeno bisogna testare il progesterone sierico giornalmente, iniziando dalla settimana precedente a quella in cui si dovrebbe avere il parto (*Sodikoff C.H., 1997*).

Anche in caso di falsa gravidanza o piometra il livello di progesterone supera i 10 ng/ml.

1.2.2.3 L'estradiolo

È l'ormone che determina la fine del periodo dell'anaestro: il suo aumento sierico coincide con l'inizio del proestro caratterizzato da tumefazione vulvare, edema e corneificazione vaginale e sanguinamento uterino, che si manifesta all'esterno come scolo vulvare sieroematico (*Nelson RW, Couto CG, 2006*).

La sua concentrazione sierica è circa 1000 volte inferiore al valore del progesterone: è 5-10 pg/ml in anaestro; nella fase iniziale del proestro viene prodotto dai follicoli in via di sviluppo e passa da un livello basale di 10-20pg/ml a 100pg/ml nei 2-3 giorni precedenti l'estro, seguito poi da un rapido declino conseguente al picco preovulatorio di LH; molto spesso tali valori sono di gran lunga inferiori ai limiti misurabili dai laboratori (*Goodman M., 2001*). Generalmente vi è un cospicuo aumento di tale ormone in caso di cisti follicolari o tumori ovarici o testicolari estrogeno-secernenti, ma rilevare tale incremento è sempre una variabile dipendente dalla sensibilità degli strumenti laboratoristici (*Nelson RW et al., 2006*).

Un metodo più semplice ed accurato per valutare l'attività estrogenica nella femmina consiste nel valutare le cellule dell'epitelio vaginale alla ricerca dei segni della corneificazione. Va ricordato che anche l'epitelio prepuziale risponde alla concentrazione ematica degli estrogeni con la corneificazione delle cellule superficiali e ciò può esser d'aiuto per la diagnosi di tumori testicolari ormone-secernenti.

1.2.2.4 LH e FSH

Il campione di sangue viene prelevato dalla giugulare: questi ormoni vengono isolati dal siero con metodiche radioimmunoenzimatiche (RIA), ed esistono notevoli differenze tra i vari laboratori (*Nelson RW, Couto CG, 2006*).

LH ha una secrezione di tipo pulsatile, ogni 1-8 ore; verso la fine dell'anaestro la frequenza e l'ampiezza degli impulsi aumentano per determinare lo sviluppo del follicolo in proestro.

Durante il proestro LH e FSH hanno basse concentrazioni sieriche che presentano un'impennata circa 1 o 2 giorni dopo il picco preovulatorio di estrogeni; subito dopo si verifica l'aumento di circa 10-40 volte il valore di LH e di 2-20 volte quello di FSH: poi i valori scendono (*Goodman M., 2001*). LH può occasionalmente accrescersi in fase di diestro, FSH è elevato in fase di anaestro.

La valutazione di tali ormoni non è molto pratica per l'identificazione della fase del ciclo in cui si trova l'animale, perchè a causa della loro secrezione pulsatile sono necessari numerosissimi prelievi; la loro determinazione aiuta piuttosto a capire se nell'animale siano presenti alterazioni della secrezione di gonadotropine: il ricorso a determinazioni ripetute del LH, per esempio mediante il prelievo di tre campioni di sangue a distanza di venti minuti l'uno dall'altro, ha maggiori probabilità di distinguere animali normali da quelli con alterazioni rispetto ad una singola misurazione (*Nelson RW et al., 2006*). A tale scopo LH ed FSH possono venire misurati anche dopo somministrazione di GnRh; nella cagna ovariectomizzata vi è un aumento cronico dei due ormoni dovuto al mancato meccanismo di feedback dato dalle ovaie; anche displasia o insufficienza ovarica causano aumento di LH.

L'identificazione del picco preovulatorio di LH sarebbe un mezzo utile per la gestione dell'accoppiamento nel cane: tale rialzo è seguito dopo circa 48 ore dall'ovulazione la quale a sua volta è seguita dopo altre 48 ore dalla maturazione completa degli oociti; il periodo in cui può avvenire la fecondazione inizia quindi circa 4 giorni dopo il picco di LH. Tale picco dura dalle 24 alle 72 ore, e i prelievi di sangue per identificarlo vanno eseguiti ravvicinati e frequenti: per tale motivo e per i costi inferiori, si preferisce utilizzare la valutazione del progesterone, il cui aumento è riflesso dell'azione del LH sul follicolo pre e postovulatorio (*Nelson RW et al., 2006*).

La valutazione del valore ematico di FSH nei piccoli animali non viene di solito effettuata per la mancanza di tests realmente affidabili.

1.2.2.5 Il GnRh

Viene rilasciato dall'ipotalamo per controllare la secrezione delle gonadotropine da parte dell'ipofisi sia nel maschio che nella femmina: è un indice del funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi piuttosto che un riscontro della salute dell'apparato genitale.

La sua somministrazione esogena ci dà informazioni sul funzionamento dell'asse ipotalamo-ipofisi: somministrare 50 µg/30kg di GnRh per via intramuscolare, e ripetere a distanza di sei ore nella prima fase dell'estro determina l'ovulazione a distanza di circa 2-3gg e il conseguente aumento del livello del progesterone se la cagna è in estro e i follicoli ovarici sono maturi, mentre se non è rilevabile un aumento di LH dopo la sua somministrazione è probabile che vi siano problemi ipofisari (*Nelson RW et al., 2006*).

Tuttavia la mancata risposta al GnRh può esser di comune riscontro in cagne normali ma in fase non follicolare (*Nelson RW et al., 2006*).

1.2.3 Tecnica di ecografia dell'apparato genitale femminile

1.2.3.1 Preparazione del paziente

Per effettuare l'ecografia dell'apparato genitale è consigliabile che il paziente sia a digiuno da almeno 12 ore per evitare che il contenuto solido-gassoso del colon ostacoli la visualizzazione delle strutture circostanti. E' consigliato permettere all'animale di defecare prima dell'esame sia per garantirgli miglior confort durante la valutazione, sia per svuotare il retto .

Una vescica urinaria repleta funge invece da finestra ecografica per la valutazione dell'utero: se quest'ultima dovesse presentarsi difficoltosa si potrà sempre ricorrere in un secondo tempo all'introduzione in vescica tramite catetere di soluzione fisiologica, oppure ad un'iniezione intramuscolare di furosemide.

L'area in cui verrà poggiata la sonda deve esser glabra: generalmente nella maggior parte delle cagne la parte ventrale dell'addome non necessita di tricotomia, è bene però depilare le logge lombari, dove il rene farà da punto di riferimento per la ricerca delle ovaie; per aver delle buone immagini è essenziale il contatto tra sonda e cute (*Mannion P, 2006*).

Meglio garantire all'animale una posizione confortevole per effettuare l'esame: se l'ambiente è privo di rumori molesti e il soggetto è di temperamento tranquillo generalmente non sarà necessario il contenimento farmacologico (*England CGW et al., 2003*). Un animale agitato o spaventato porrà resistenza alle nostre manipolazioni: in tali casi è da considerare la possibilità di sedare l'animale con Acepromazina (0,02-0,1 mg/Kg) o Midazolam (0,1-0,2 mg/Kg).

1.2.3.2 Scelta della sonda e della modalità

Le sonde settoriali, più maneggevoli delle lineari, non garantiscono una sufficiente visualizzazione dei tessuti vicini alla sonda: sono preferibili sonde di tipo convex, soprattutto dei piccoli animali, che mostrano con buona risoluzione tessuti vicini e lontani dal trasduttore (*Mannion P, 2006*).

Sonde ad alta frequenza garantiscono una buona risoluzione ma hanno poco potere di penetrazione: la frequenza della sonda va scelta in base alle dimensioni dell'animale. Si consideri che generalmente sonde da 5 MHz danno buone immagini fino ad una profondità di 15cm, sonde da 7,5 MHz fino a 7cm, e infine sonde da 10 MHz fino a 4-5cm; viene

consigliata una sonda da 5MHz nei cani di grossa mole e 7,5MHz nei soggetti di piccola e media taglia (*Kealy-McAllister, 1991*).

Per effettuare una diagnosi di gravidanza è possibile scegliere tra tre modalità differenti: la A-mode, permette di visualizzare la presenza di liquido nell'utero ma non la sua origine; è sconsigliata perché non dà informazioni né sul numero né sulla vitalità dei feti; il Doppler dà informazioni sulla presenza del battito fetale;

la modalità B-mode è solitamente la preferita perché fornisce informazioni sia sulla vitalità che sul numero approssimativo di feti, oltre a permettere di indagare anche sullo stato dell'utero e delle ovaie (*Kustritz MV, 2005*).

1.2.3.3 Posizione dell'animale

Porre l'animale in decubito laterale o dorsale sta a discrezione dell'esaminatore; se l'animale è di grosse dimensioni o a fine gravidanza si può effettuare l'ecografia col soggetto in stazione: in tal caso il decubito dorsale fa allontanare troppo le ovaie dalla sonda ostacolandone la visualizzazione con sonde ad alta frequenza. Per i piccoli animali è preferibile il decubito laterale o dorsale.

1.2.3.4 Posizione della sonda

Va identificata la sinfisi pubica: la sonda viene posta cranialmente ad essa, lungo la linea alba se l'animale è di normale peso, lateralmente alle linee mammarie se l'animale è obeso o queste sono particolarmente sviluppate. Prima di appoggiare la sonda sulla parete addominale essa va cosparsa di una buona quantità di gel, il quale favorirà l'aderenza tra cute e sonda, permettendo miglior visualizzazione delle strutture sottostanti; la sonda va fatta scorrere lungo l'addome in direzione cranio-caudale e caudo-craniale, lentamente.

La pressione da effettuare sulla sonda è proporzionale alla profondità dell'organo da indagare.

1.2.3.5 Aspetto normale dell'utero

La vescica repleta di liquido funge da finestra acustica per una perfetta visualizzazione dell'utero:

esso è posto dorsalmente alla vescica ma sullo schermo dell'ecografo appare al di sotto della stessa se l'animale è in decubito dorsale; in fase di anaestro raggiunge le sue dimensioni minori, attorno ai 5-8mm, che si riducono ulteriormente se si tratta di un animale prepubere (*England G et al., 2003*); la sua immagine è rotondeggiante se il piano di sezione è trasversale, mentre è rettangolare in sezione longitudinale; la cervice è una struttura rotondeggiante ed ipoecogena posizionata tra la vescica anaecogena e un semicerchio iperecogeno che rappresenta il colon (*Mannion P, 2006*). Muovendo la sonda cranialmente l'utero verrà tagliato trasversalmente: il corpo ha un diametro inferiore alla cervice, appare omogeneo e non mostra un lume; spostando la sonda cranialmente, si noterà la biforcazione nelle due corna, le quali hanno lo stesso aspetto ecografico dell'utero ma hanno dimensioni minori; in alcuni casi non è possibile distinguerle dal piccolo intestino presente cranialmente alla vescica (*England G et al., 2003*).

Ruotando la sonda di 90° gradi, l'utero apparirà come una struttura tubulare.

L'utero è suddiviso in due strati distinti: endometrio e miometrio formano la parte centrale ipoecogena, mentre la sierosa è lo strato esterno iperecogeno;

l'aspetto ecografico dell'utero cambia a seconda dello stadio del ciclo in cui si trova:

in diestro e anaestro il suo diametro è inferiore al centimetro e quindi difficile da visualizzare: la parte interna ipoecogena rappresenta l'endometrio, mentre la parte esterna iperecogena rappresenta il miometrio e la sierosa; durante l'estro o il proestro aumenta le sue dimensioni e l'edema della mucosa lo rende omogeneo e di più facile visualizzazione; in tale situazione inoltre la cervice appare come una serie di cerchi concentrici, e le corna uterine sono distinguibili dalle anse intestinali per l'assenza di peristalsi e per la mancanza dei 5 strati di parete che invece caratterizzano l'intestino; seguirne il decorso permette all'operatore di arrivare alle ovaie.

1.2.3.6 Utero e gravidanza

L'ecografia transaddominale è comunemente utilizzata nella cagna per effettuare diagnosi di gravidanza: usando una modalità B-mode si stima che l'accuratezza della diagnosi si aggiri intorno al 94-95% quando usata dopo il venticinquesimo giorno di gravidanza (*Kustritz MV,*

2005) e intorno al 99% se usata dopo il trentesimo giorno (Bondestam S et al., 1984); a volte, con tale valutazione, è spesso possibile stimare la data del parto (Beccaglia M, Luvoni GC, 2006).

Gli embrioni sono evidenziabili come elementi rotondeggianti ripieni di liquido anaecogeno al diciassettesimo giorno di gravidanza, lungo il decorso delle corna uterine; per non confondere il conceptus con eventuali cisti uterine la diagnosi di gravidanza nella cagna è attendibile al ventottesimo giorno dall'ultima monta, quando è visibile l'embrione iperecogeno (England G et al., 2003) e il sacco embrionale ha dimensioni pari a 7x5mm (England C et al., 1998).

Le diverse età gestazionali del feto possono venir riconosciute con la misurazione degli organi fetali e delle strutture extrafetali, in primis della vescicola corionica, la quale può venir misurata dai 45 ai 25 giorni prima del parto: durante tale periodo essa si presenta anaecogena, rotondeggiante e a margini definiti; durante la seconda metà della gravidanza viene misurato invece il diametro della testa del feto (England et al., 1990).

Tab 2: Dimensioni del conceptus in accrescimento rilevate con l'ecografia. (England G, Yeager A and Concannon PW, 2003)

Parametri osservabili all'ECO con sonda da 5.0 o 7.5 MHz

<i>Vescicola uterina di 1-2mm</i>	<i>17-18</i>
<i>Embrione</i>	<i>21-22</i>
<i>Battito cardiaco</i>	<i>22-23</i>
<i>Differenziazione della testa</i>	<i>25-28</i>
<i>Colonna vertebrale</i>	<i>28-34</i>
<i>Scheletro assiale</i>	<i>31-32</i>
<i>Camere cardiache</i>	<i>40</i>

Subito dopo il parto l'utero può incorrere in emorragie, ritenzioni placentari o fetali, endometriti; in tali casi nel lume uterino saranno presenti fluidi anecogeni o iperecogeni ma con la sola ecografia non sarà possibile differenziare i diversi stati morbosi dalla normale

lochiazione (*Mannion P, 2006*); l'utero offre un'immagine ecografica normale solo dopo 15 settimane dal parto: prima di tale momento si presenta di volume aumentato, le corna sono facilmente identificabili cranialmente alla vescica, contiene fluido iper-ipoecogeno in quantità proporzionale ai resti di liquido fetale e delle placente; sono visibili i siti placentari come delle sottili linee iperecogene, rotondeggianti se sezionate dal fascio ultrasonoro lungo l'asse maggiore (*Mannion P, 2006*).

Soprattutto nel primo terzo di gravidanza è probabile che accada l'aborto dell'intera cucciolata, in tal caso l'utero apparirà come nella fase di post-partum.

La piometra, accumulo di pus all'interno dell'utero, è uno stato morboso identificabile con l'ecografia associata ad un'anamnesi di malessere, perdite vaginali e spesso, polidipsia: nel caso sia chiusa verranno visualizzate le numerose anse uterine ripiene di liquido anecogeno o iperecogeno, a seconda della sua composizione (cellulare o essudatizia), che occuperanno buona parte dell'addome; nel caso sia aperta, la diagnosi si baserà su esami di laboratorio, perché il continuo drenaggio del liquido non determinerà la distensione dell'utero. Tale stato morboso può però venir confuso con la mucometra, un accumulo di liquido, molto meno grave rispetto al precedente: ciò che discrimina le due patologie è la conta dei globuli bianchi, decisamente aumentata in caso di piometra (*Nelson RW, Couto CG, 2006*).

L'iperplasia endometriale cistica è un altro stato morboso che incorre nella fase luteinica: la parete uterina apparirà costellata di strutture rotondeggianti anaecogene, le cisti appunto, con parete iperecogena che possono anche superare i 5mm (*England GCW, 1995*), e nel lume sarà presente una piccola quantità di liquido anaecogeno.

1.2.3.7 Aspetto normale delle ovaie

Le ovaie della cagna sono difficili da identificare a causa della loro modesta dimensione e a causa della loro posizione abbastanza superficiale; inoltre, soprattutto nelle cagne più anziane, la borsa ovarica infarcita di grasso può rappresentare un ulteriore ostacolo alla loro visualizzazione con l'ecografia (*England G et al., 2003*).

Per aver una buona risoluzione è necessaria una sonda da 7,5 MHz; le ovaie sono tipicamente localizzate nella loggia lombare, caudali al polo renale, a livello della quinta vertebra lombare;

con l'animale in stazione l'ovaio giace su un piano più basso rispetto al rene per effetto della forza di gravità; anche in fase di estro la posizione dell'ovaio può variare.

In fase di anaestro tali organi sono strutture ipoecogene, omogenee, difficili da identificare soprattutto se nella cavità addominale è presente un'elevata quantità di tessuto adiposo (*England C, 1998*); verso la fine di questa fase possono divenir apprezzabili i follicoli, come strutture rotondeggianti di 1-2mm di diametro, ripiene di liquido anaecogeno (*England G, 2003*).

La presenza di follicoli o corpi lutei rende più facile l'identificazione delle ovaie: i primi appaiono come strutture rotondeggianti anaecogene, i secondi sono strutture rotondeggianti, omogenee, con un bordo spesso ed un centro ipo-anaecogeno; follicoli e corpi lutei sono normalmente di pochi millimetri di diametro, sono identificabili ma troppo piccoli per venir indagati con la normale ecografia (*Schmidt et al.1986,Pyczak 1990*); essi raggiungono il massimo diametro il primo giorno dopo il picco di LH, che si aggira attorno ai 9mm.

Non è possibile distinguere un follicolo pre-ovulatorio da un corpo luteo in via di sviluppo, se non associando all'ecografia delle valutazioni ormonali (*Mannion P, 2006*); anatomicamente il follicolo preovulatorio non sporge dal contorno dell'ovaio, cosa che invece fa il corpo luteo, ma determinare con certezza tale differenza richiede valutazioni seriali ravvicinate;

E' possibile invece distinguere un ovaio prima dell'ovulazione da uno in cui l'ovulazione è avvenuta, basandosi sul rilevamento o la scomparsa dei follicoli ovulatori (*England G, 2003*).

Il ritrovamento di strutture rotondeggianti, anecogene, con parete sottile, può far sospettare la presenza di cisti ovariche: la maggior parte delle cisti identificate con l'ecografia sono cisti della borsa ovarica, che non secernono ormoni e sono clinicamente irrilevanti (*England G, 2003*); le cisti vere originano invece dal parenchima ovarico o follicolare e possono essere singole o raggruppate in clusters: sono distinguibili dai follicoli perché si presentano in momenti inusuali del ciclo estrale; sono generalmente settate, secernono diversi tipi di ormoni, e raramente colpiscono entrambe le ovaie; possono esser distinte in due tipi: follicolinico, con parete sottile, associate spesso a calori persistenti o prolungati e a scolo vulvare emorragico; luteinico, con parete spessa, identificate in molte femmine con piometra.

La letteratura veterinaria presenta scarsi dettagli relativi a questa patologia; cisti follicolari singole sono state rinvenute in 41 delle 400 cagne esaminate in età compresa tra i 2 e 15 anni; la maggior parte delle formazioni cistiche si aggirava attorno a 1-1,5 cm di diametro, superando solo raramente i 5 cm; in ben 31 casi sulla stessa ovaia o su quella controlaterale sono stati al contempo rilevati corpi lutei a vario stadio evolutivo, mentre 11 cagne sono risultate affette anche da iperplasia endometriale cistica (*Dow, 1960*).

All'interno dell'ovaio si possono raramente identificare anche masse riferibili a neoplasie: il loro aspetto ecografico è estremamente variabile: da aree ipoecogene omogenee ad aree cistiche anaecogene; le neoplasie di più frequente rilevamento sono il tumore delle cellule della granulosa e l'adenocarcinoma ovarico, frequentemente correlati con anomalie del ciclo come estri persistenti o iperplasia endometriale cistica. Purtroppo la diagnosi avviene quando la neoplasia è in fase avanzata sulla base di valutazioni ecografiche e biopsia (England G, 2003).



Fig 5: ecografia transaddominale di una cagna che mostra un ovaio con 3 follicoli anaecogeni il giorno prima dell'ovulazione: il follicolo di sinistra misura 6mm di diametro.

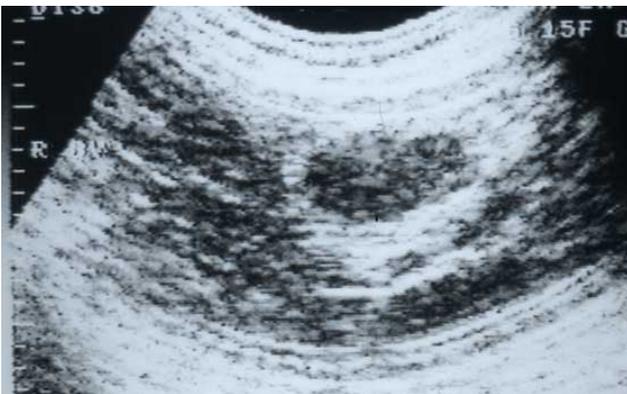


Fig 6: Ecografia transaddominale di una cagna che mostra l'ovario il giorno dopo l'ovulazione: non sono presenti i follicoli rotondeggianti e anaecogeni che apparivano nella foto precedente.

1.2.3.8 Conclusioni

L'ecografia può essere una rapida e precisa tecnica di diagnosi per il Veterinario specializzato in riproduzione canina: può offrire utili informazioni sia sugli eventi fisiologici del ciclo, sia sui vari stadi della gravidanza; inoltre può segnalare stati patologici del tratto riproduttivo sulla base delle variazioni di dimensione, struttura e trama dei vari organi (England G, 2003).

1.3 DEFINIZIONE DI INFERTILITA'

Che cosa rappresenti l'infertilità nel cane non è stato ancora chiaramente definito. E' logico pensare che le aspettative per la riproduzione e le performances riproduttive siano decisamente diverse nel proprietario dell'animale domestico rispetto all'allevatore o ancora, rispetto al responsabile di un canile.

Solitamente i maschi sono portati in visita per la valutazione di infertilità a causa dell'incapacità o del mancato interesse all'accoppiamento, mentre le femmine perché dopo l'accoppiamento non hanno dato cuccioli (*Johnson C, 2006*). Non è noto se il venir meno della gravidanza sia il risultato del fallimento del concepimento o del riassorbimento embrionale perché la diagnosi di gravidanza precoce non è una prassi di routine nel cane.

Nella valutazione di una cagna con problemi di infertilità andrebbero valutati sia il periodo dell'ovulazione, sia il primo periodo di gestazione (*Fontbonne A, 2006*).

In un programma di riproduzione, parliamo di maschio infertile o con ridotta fertilità se la percentuale di gravidanza/parto cala al di sotto del 75%, o se più di 3 cagne non partoriscono dopo l'inseminazione con monta naturale o artificiale con il seme del maschio in esame; questa definizione non è applicabile ad un maschio usato come stallone occasionalmente (*Johnson C, 2006*).

Per quanto riguarda quest'ultimo, parliamo di infertilità se dopo la monta non vi è concepimento; se la prole è in parte o del tutto disvitale è necessario distinguere se il problema riguarda effettivamente il maschio o piuttosto la femmina.

La fertilità maschile ottimale necessita di una libido normale, buona attitudine e capacità alla monta, e di un seme di buona qualità. Per quanto riguarda la femmina, essa deve esser recettiva (e quindi in estro) e non affetta da patologie debilitanti o specifiche dell'apparato riproduttore: uno studio condotto in Francia conclude che il tasso di fertilità in cagne di razza pura sottoposte a monta naturale o a inseminazione artificiale in condizioni controllate (valutando la citologia vaginale e il progesterone sierico) è del 75,4%, con un numero medio di 5,6 cuccioli per cucciolata; per questa ragione una cagna va considerata infertile se non partorisce alcun cucciolo o comunque un numero inferiore alla media (*Fontbonne A, 2006*).

Per conoscere il livello di fertilità vanno indagati lo stato generale degli animali e lo stato delle vaccinazioni; vanno inoltre valutate le caratteristiche dell'atto sessuale, che se non eseguito correttamente può impedire il concepimento (*Davidson , 2006*).

Tab 3: Cause di scarsa libido (*Johnston C, 2006*)

Immaturità sessuale

Vecchiaia

Psicologiche:

- *l'animale non è nel suo territorio*
- *la femmina è dominante*
- *lo stallone è subordinato ad un altro maschio presente*

La cagna non è in estro

Dolore

Disordini metabolici o disendocrine

Tab 4: Problemi che possono ostacolare la monta (*Johnston C, 2006*)

Patologie ortopediche

Patologie neurologiche

Dolore prostatico

Anomalie peniene

Anomalie prepuziali

Anomalie vaginali che ostacolano

l'intromissione

Se gli animali sono sani e l'accoppiamento avviene in modo corretto, la fertilità può venire influenzata dal momento in cui la femmina viene portata al maschio o dal numero di inseminazioni che il maschio può eseguire: più monte durante il periodo fertile aumentano la percentuale del concepimento (*Johnson C, 2006*).

Nella femmina, suddividiamo l'infertilità in due categorie: infertilità **apparente**, legata a problemi di management o all'infertilità del maschio; infertilità **vera e propria** legata a

problematiche che interessano la femmina, le quali possono aver base morfologica, funzionale e comportamentale;

L'infertilità vera e propria di una femmina va definita tale se avendo superato i 24 mesi di età essa non riesca a concepire, o presenti un comportamento sessuale anomalo, irregolarità dei cicli estrali o anestro persistente (*Feldman EC, Nelson RW, 2003*); prima dei 24 mesi una femmina presenta cicli irregolari o addirittura nessun ciclo, quindi questa definizione va adattata all'animale che ci troviamo di fronte considerando del segnalamento soprattutto razza ed età.

Nella cagna e nella gatta un numero di figli inferiore alla norma o la morte dell'intera cucciolata possono essere il risultato finale di infertilità.

Nella femmina l'infertilità può esser dovuta a mancanza di cicli o aberrazione del ciclo e del periodo estrale (basate su disfunzioni ovariche o dell'asse ipotalamo-ipofisi-ovaio) o a mancato concepimento o a morte prenatale e perinatale.

I principali problemi di infertilità del maschio sono disturbi della produzione, del trasporto o dell'immagazzinamento di spermatozoi, aberrazione della libido e parziale o totale incapacità all'accoppiamento (*Malmo J., 2003*).

Per quanto riguarda l'infertilità apparente, generalmente ci troviamo di fronte ad un proprietario che porta l'animale in visita per svariate problematiche: l'accoppiamento è avvenuto ma non vi è stato concepimento; la femmina non accetta il maschio; la femmina accetta il maschio ma si sottrae al coito; la gravidanza non viene portata a termine;

In tali casi va discriminato se il problema riguardi la femmina, il maschio, o se piuttosto non riguardi la scelta di tempi sbagliati per l'accoppiamento, o l'esposizione a eventi stressanti dei due partner che minano l'esplicitarsi di un comportamento sessuale normale.

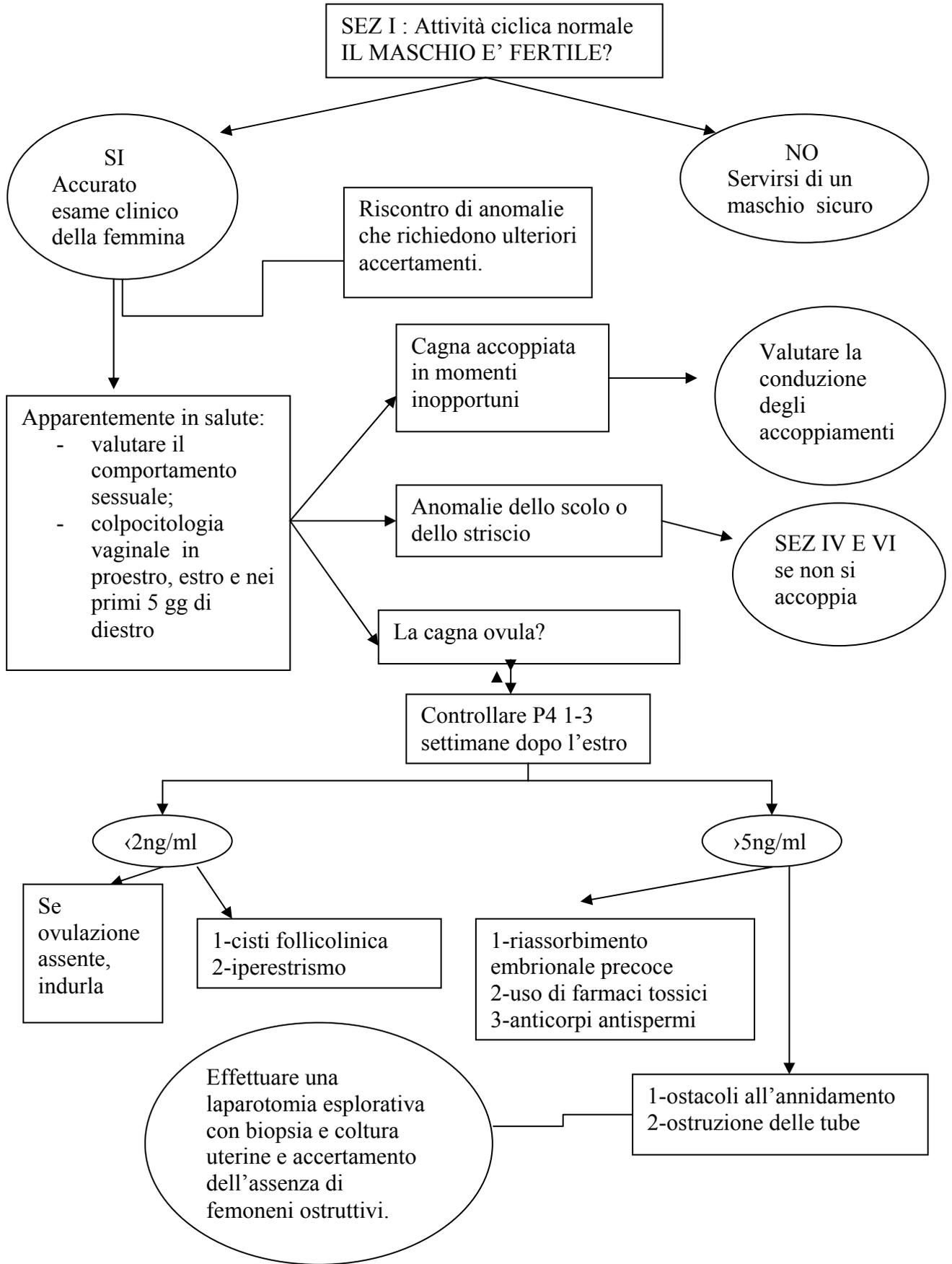
Problemi fisici o comportamentali possono influire nell'accettazione del maschio da parte della femmina: femmine dominanti presentate a stalloni inesperti non permettono che avvenga l'intromissione nei momenti più appropriati. Anomalie, stenosi o iperplasia vaginali rendono la copula dolorosa, ed ecco che la femmina si sottrarrà ad essa anche se in piena fase estrale (*Davidson AP, 2006*).

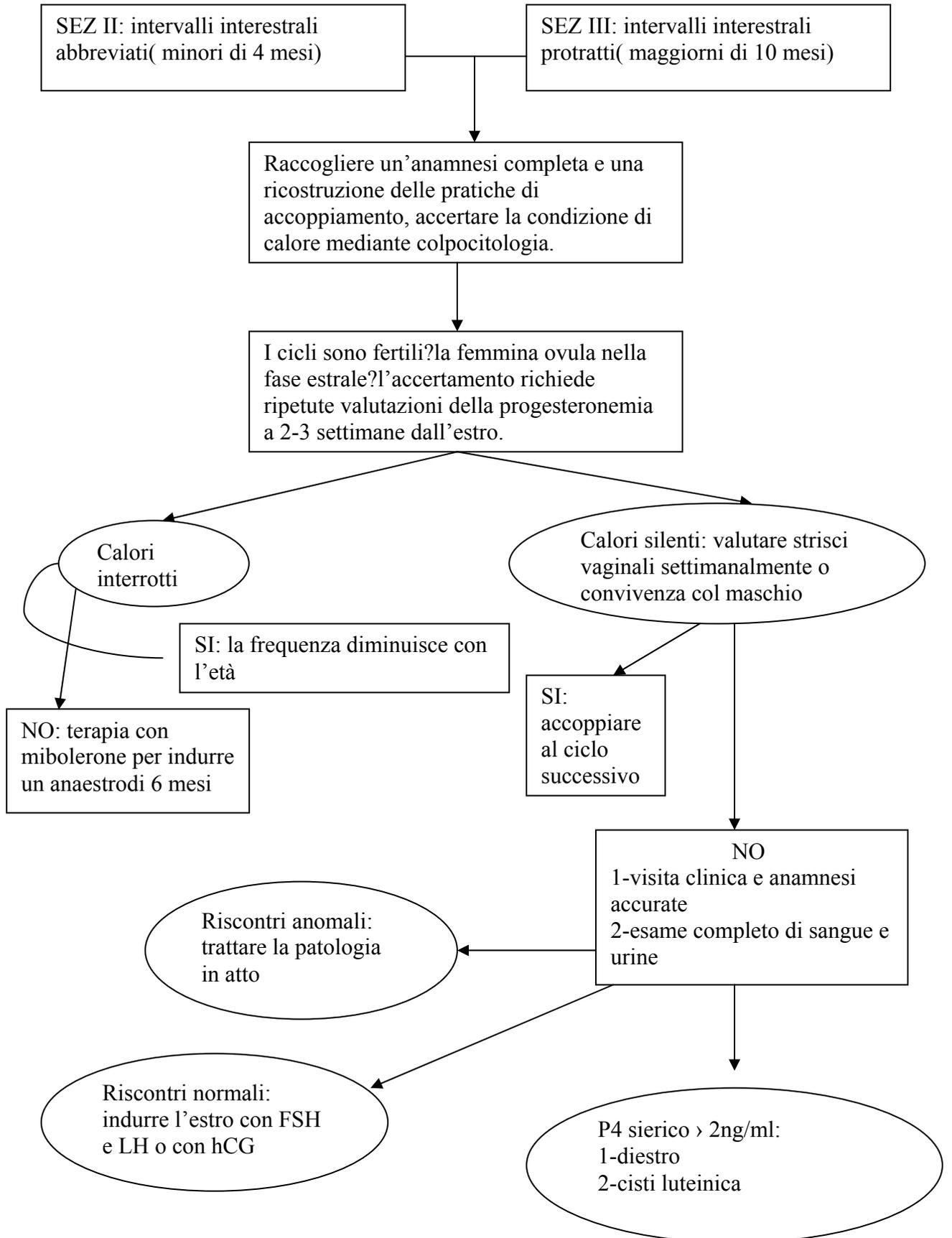
Molte femmine non possono essere classificate come fertili o come infertili: spesso si tratta di situazioni di ipofertilità. Della cagna in esame è sempre utile conoscere l'anamnesi

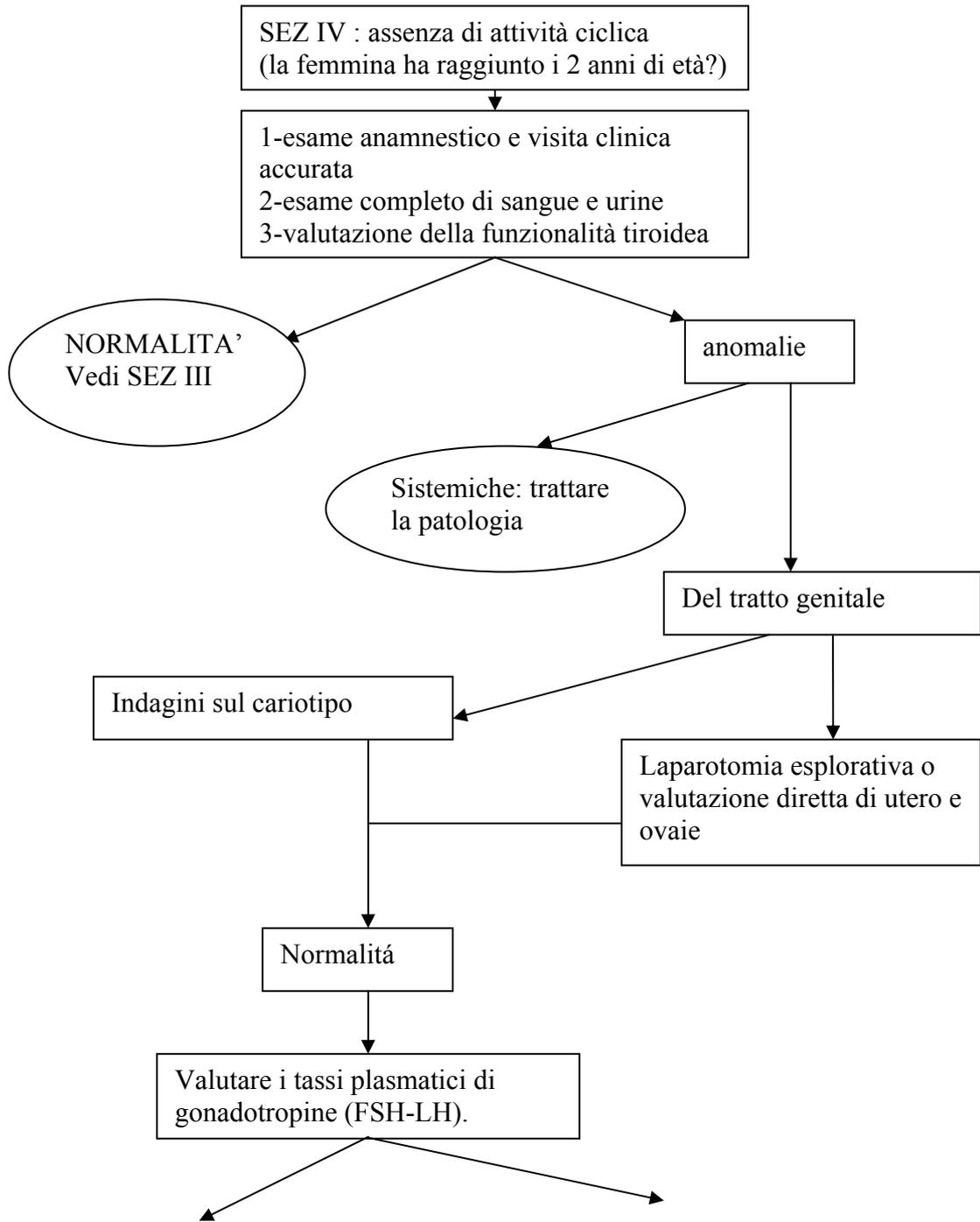
riproduttiva, e sapere se sono stati somministrati farmaci, alcuni dei quali spesso possono influenzare la fertilità (Fontbonne A., 2006).

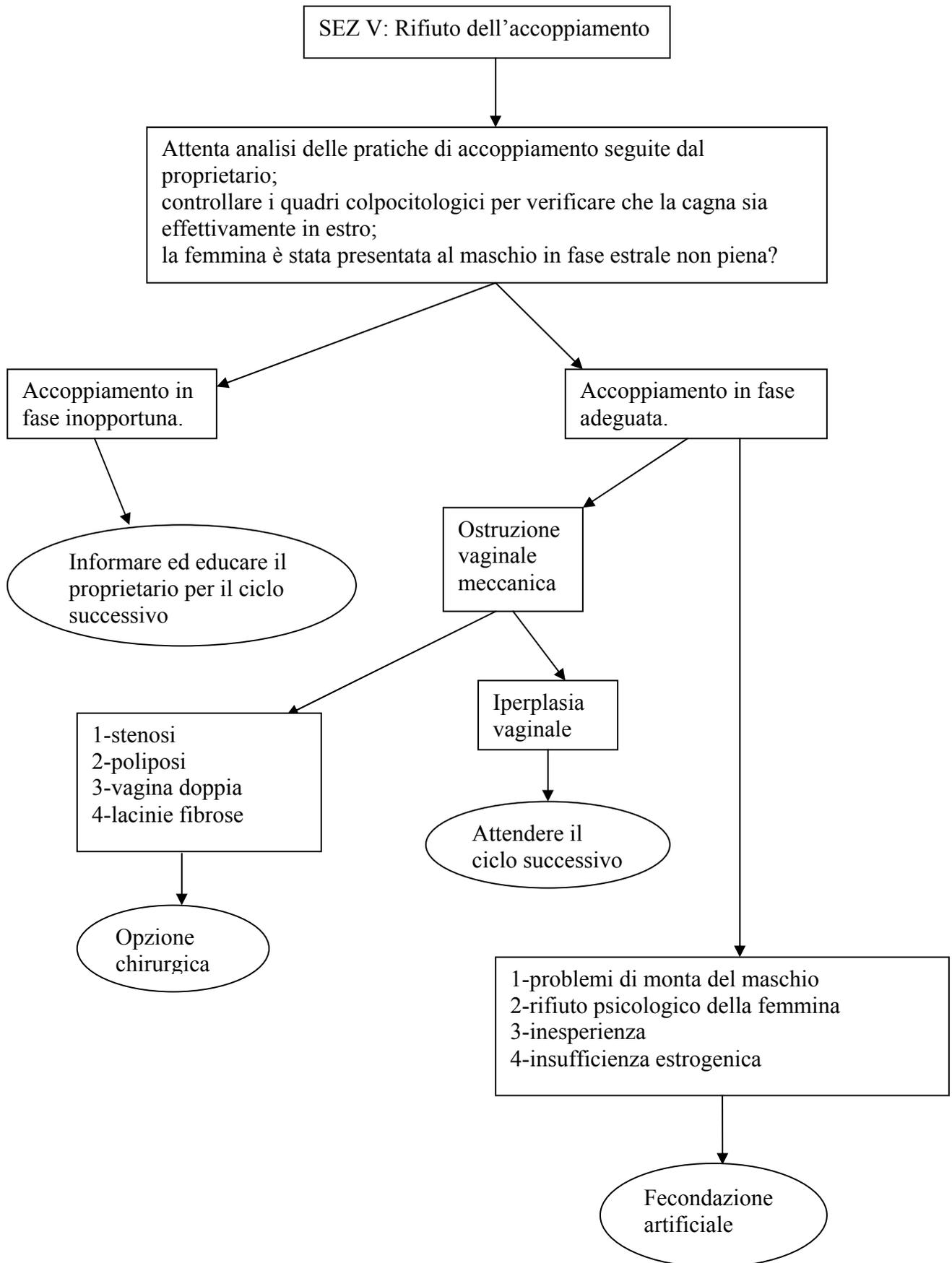
Tab 5: Farmaci somministrabili in gravidanza, privi di effetti teratogeni.

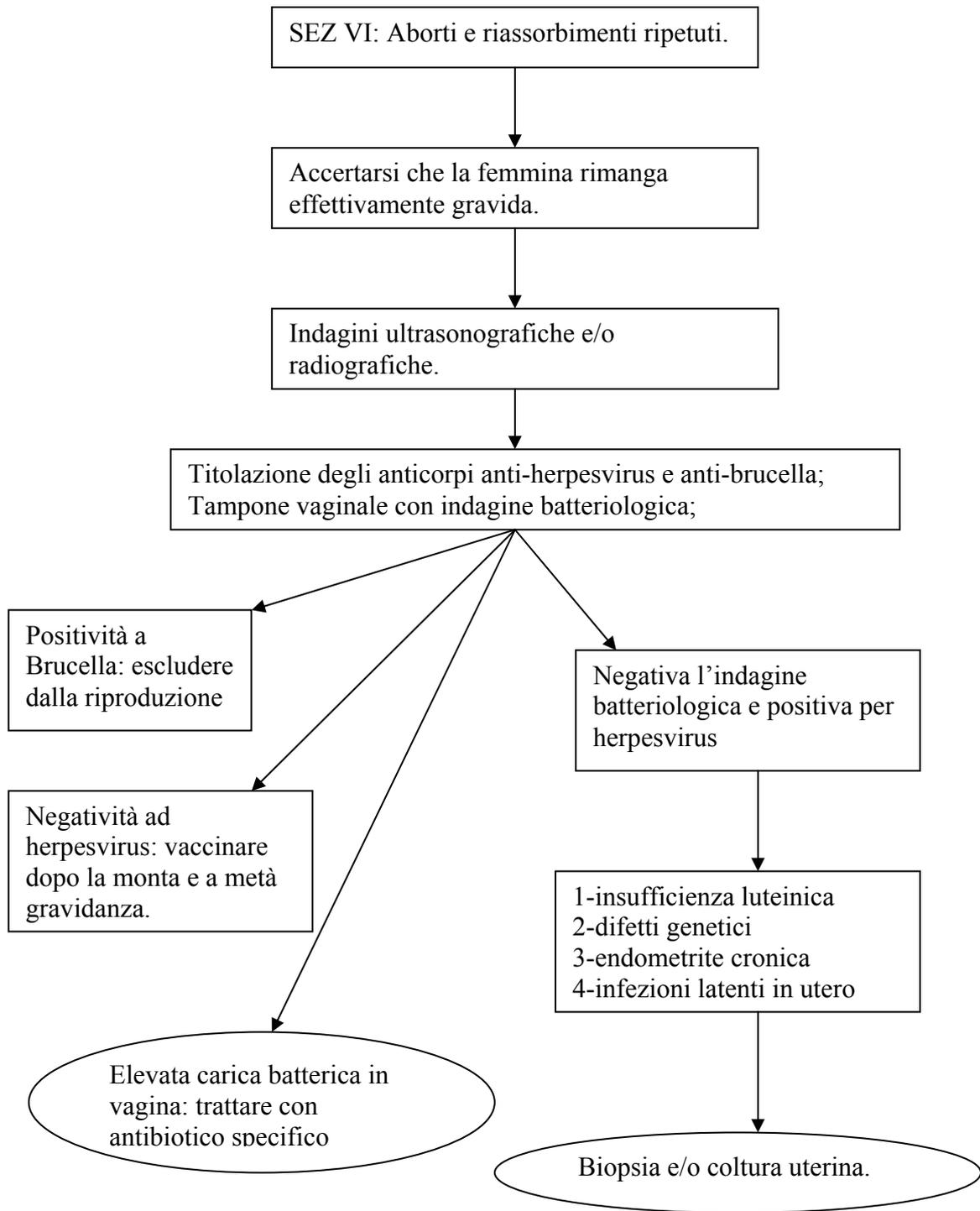
<i>Ampicillina</i>	Supera la barriera emato-placentare ma non crea danni al feto
<i>Amoxicillina</i>	"
<i>Cefalosporine</i>	"
<i>Acido clavulanico</i>	"
<i>Cloxacillina</i>	"
<i>Lincomicina</i>	"
<i>Penicillina</i>	"
<i>Sulfamidici</i>	Causa ittero neonatale se somministrato nell'ultimo periodo di gravidanza, meglio preferire quelli ad azione breve
<i>Miconazolo</i>	Sicuro se applicato per via topica
<i>Ivermectina</i>	Nessun problema riscontrato
<i>Piperazina</i>	"
<i>Praziquantel</i>	"
<i>Pirantel</i>	"
<i>Acepromazina</i>	Va evitata in prossimità del parto
<i>Ketamina</i>	Depressione dei cuccioli se usata per il cesareo
<i>Lidocaina</i>	Tutti gli anestetici usati per blocchi nervosi locali non danno problemi
<i>Antiacidi</i>	Non sono assorbiti per via sistemica











1.4 VALUTAZIONE DELLA FERTILITA' DEL MASCHIO

Nel percorso di valutazione della fertilità di una femmina, va attentamente considerata anche la fertilità del maschio: spesso anomalie del seme o patologie che alterano l'anatomia o la fisiologia dell'apparato genitale sfociano in situazioni di infertilità.

Per valutare la presenza di malattie sistemiche o anomalie ereditarie del maschio è necessario effettuare un esame fisico completo che comprende, oltre ad un esame obiettivo generale, la palpazione dei testicoli, della prostata per via transrettale, e la valutazione dello scroto per problemi dermatologici (*Cain, 2001(b)*): se lo stallone è portato in visita per scarsa attitudine alla monta o scarsa libido è bene controllarne l'apparato muscolo-scheletrico e neurologico, che possono essere affetti da malattie tipiche della razza o dell'età.

Successivamente lo spermogramma consentirà di verificare le caratteristiche del liquido seminale e la sua fertilità: i caratteri del seme variano da soggetto a soggetto, in base alla taglia e all'età, in rapporto alla quantità di tessuto testicolare funzionante (*Saeger e Schubert, 1996*), in rapporto a fattori ambientali e patologici (problemi alimentari o endocrini), e in base alla frequenza dei prelievi.

Tab 6 : Caratteristiche macro e microscopiche di un seme normale di cane

(*Johnston SD, 2001*)

<i>Parametri</i>	<i>I frazione</i>	<i>II frazione</i>	<i>III frazione</i>	<i>Totale</i>
<i>Volume(ml)</i>	<i>0,5-5,0</i>	<i>1,0-4,0</i>	<i>1,0-80,0</i>	<i>2,5-80,0</i>
<i>Colore</i>	<i>chiaro</i>	<i>opalescente</i>	<i>Chiaro</i>	<i>Opalescente</i>
<i>pH</i>	-	<i>6,3</i>	<i>6,3-6,8</i>	<i>6,3-6,8</i>
<i>Motilità progressiva(%)</i>	-	<i>>70%</i>	-	<i>>70%</i>
<i>Concentrazione</i>	-	<i>100-1000</i>	-	<i>4-400</i>
<i>N°totale spermatozoi</i>	-	<i>300-2000</i>	-	<i>300-2000</i>
<i>Morfologia normale</i>	-	<i>>80%</i>	-	<i>>80%</i>

Tali valori sono rapportabili a tutte le taglie.

Tab 7 : Differenza di volume di eiaculato prodotto nelle diverse taglie

(Freshman JL, 2001)

<i>Taglia</i>	<i>Nana</i>	<i>Media</i>	<i>Grande</i>	<i>Gigante</i>
<i>Volume dell'eiaculato</i>	<i>Circa 3ml</i>	<i>Circa 4ml</i>	<i>Circa 6ml</i>	<i>>6ml</i>
<i>Spermatozoi prodotti (milioni)</i>	<i>Circa 300</i>	<i>Circa 500</i>	<i>Circa 800</i>	<i>Circa 1,5 miliardi</i>

1.4.1 Il prelievo del seme

Il volume del materiale prelevato non è indicativo della qualità del seme, dipende dalla frazione prostatica raccolta dall'operatore.

Per effettuare un prelievo di seme ci si può avvalere di due tecniche: mediante l'utilizzo di una vagina artificiale o attraverso un massaggio manuale in corrispondenza del bulbo del pene;

Indipendentemente dal metodo usato, è importante effettuare la raccolta in un ambiente pulito, tranquillo, munito di pavimento non scivoloso, ed è importante la presenza del proprietario del cane, che spesse volte tranquillizza il soggetto, soprattutto se non abituato a tale manualità.

Il prelievo non deve essere né brusco, né precipitoso; se il cane si dimostra restio si possono utilizzare degli espedienti per facilitarne l'eiaculazione come la presenza di una femmina in estro, oppure l'utilizzo di una garza imbevuta del fluido vaginale di una cagna in calore precedentemente preparata e conservata in freezer;

l'eiaculazione del cane avviene in tre frazioni (*Linde-Fosberg, 1995*):

la prespermatia è la prima frazione, di colore trasparente e traslucido, di volume che varia da 0,1 a 3ml che viene emessa in circa 3 s-1'; è priva di spermatozoi, è composta di liquido prostatico, e in animali particolarmente eccitati può essere assente;

la spermatia è la seconda frazione, di colore lattiginoso, di volume che varia da 0,5 a 3ml, emessa in 1-2'; si tratta della parte ricca di spermatozoi che le conferiscono l'opacità caratteristica;

infine la postspermatia è la terza frazione, di colore trasparente, di volume molto variabile (da 2 a 40ml), di origine prostatica, viene emessa finché il pene non perde l'erezione (*Linde-Fosberg, 1995*).

1.4.2 Analisi sul seme

La valutazione iniziale del seme si effettua macroscopicamente registrando colore e volume di ogni frazione emessa; il colore dell'eiaculato dipende dalla concentrazione di spermatozoi e dalla presenza di diverse sostanze: un colore tendente al giallo può essere indice di contaminazione urinaria, un colore rosa-rossastro invece può essere sintomo di patologie prostatiche in atto (*Freshman JL, 2001*); un colore verdastro può indicare la presenza di un essudato infiammatorio purulento; un aspetto trasparente fa sospettare che il soggetto sia oligo o azoospermico; con un misuratore si può facilmente valutare anche il pH, compreso tra 6,3 e 6,8 (*Freshman JL, 2001*) che tende ad aumentare in caso di infezioni del tratto urogenitale (*Johnston C, 1991*).

Successivamente si passa a valutare la motilità degli spermatozoi disponendo una goccia di seme (possibilmente della frazione spermatica, priva di contaminazioni dalla frazione prostatica) su un vetrino riscaldato a 37°C, e coprendola con il coprioggetto: l'osservazione a 20X e 40X è sufficiente; se si tratta di un seme molto concentrato, per visualizzarne la motilità sarà utile una diluizione 1:1 con una soluzione salina tamponata, sempre a 37 °C: un seme normale mostra una motilità progressiva (spermatozoi che attraversano il campo visivo) del 70%; tale parametro rappresenta l'indicatore più sensibile della qualità dell'eiaculato (*Johnston C, 1991*).

Una riduzione della motilità progressiva è riferita in caso di infezioni o danni a livello testicolare.

Il rapporto tra la concentrazione e il numero totale degli spermatozoi può essere indice della qualità del seme solo in caso di azoospermia; nell'eiaculato la concentrazione degli spermatozoi dipende dalla quantità di liquido prostatico presente, dall'età, dal diametro dei testicoli, dalla frequenza delle eiaculazioni, e può variare dai 4 ai 400 milioni/ml; viene stimata usando una camera contaglobuli o uno spettrofotometro: nel primo caso il seme viene diluito (1:40) e trattato con sostanze che immobilizzano gli spermatozoi (sol NaCl al 3% o Formalina tamponata al 10%): moltiplicando la concentrazione degli spermatozoi in milioni per il volume del liquido seminale in millilitri otteniamo il numero di spermatozoi, che in un normale eiaculato oscilla tra i 300 milioni e i 2 miliardi (*Johnston, 1991*).

Un numero basso di spermatozoi non sempre è indice di alterata funzione testicolare: maschi di taglia toy, con diametro testicolare inferiore a 3,6mm possono avere un eiaculato normale anche con un numero di spermatozoi inferiore ai 200 milioni (*Freshman JL, 2001*).

Altro parametro da valutare sul seme è l'integrità della membrana plasmatica, strettamente correlato con la vitalità degli spermatozoi: può essere valutato con il Test di rigonfiamento iposmotico (HOS-test) o con l'utilizzo di coloranti vitali quali l'eosina/nigrosina.

L'HOS-test prevede la diluizione di parte del seme in dieci parti di soluzione iposmotica, un'incubazione a 37°C per 45'-60' e l'osservazione al microscopio a contrasto di fase a 400-1000X; gli spermatozoi vivi presenteranno coda arricciata o ripiegata, quelli morti invece coda diritta; questo perché la membrana plasmatica non integra non permetterà alla cellula di regolare la sua osmolarità trattenendo sali ed acqua.

L'eosina penetra negli spermatozoi morti, la cui membrana citoplasmatica non è integra, conferendo loro una colorazione rosa, mentre la nigrosina, rendendo lo sfondo grigio-bluastro farà risaltare gli spermatozoi bianchi, i quali, essendo ancora vivi, hanno membrana citoplasmatica integra (*Freshman JL, 2001*).

Per quanto riguarda la morfologia del seme, essa viene valutata disponendo su un vetrino una goccia di colorante eosina-nigrosina o Wright-Giemsa e una goccia di liquido seminale: il tutto verrà valutato a 100X con immersione in olio (*Freshman JL, 2001*): vanno considerati circa un centinaio di spermatozoi per determinare la frequenza di difetti primari (anomalie della testa, della coda...) o difetti secondari (distacco della coda, gocce citoplasmatiche,...); la presenza di difetti primari è grave e riguarda problematiche della genesi degli spermatozoi, mentre i difetti secondari sono spesso il risultato del transito lungo le vie spermatiche, della raccolta del seme o della somministrazione di glucocorticoidi (*Freshman JL, 2001*).

La percentuale di spermatozoi normali in un eiaculato dovrebbe superare il 70%; le anomalie morfologiche più frequentemente associate ad infertilità nel cane sono a carico del tratto intermedio dello spermatozoo o del punto di attacco tra la coda e la testa (*Johnston, 1991*).

Infine viene valutata la citologia di ogni frazione del seme colorandone una goccia con Wright-Giemsa; di normale riscontro sono gli spermatozoi maturi; occasionalmente si possono trovare batteri facenti parte della normale flora presente sulla mucosa prepuziale, oltre a cellule epiteliali ed eritrociti; è possibile ritrovare anche altre tipologie di cellule, ma per effettuare diagnosi di anomalia citologica del seme è necessario effettuare una serie di valutazioni su diversi prelievi effettuati in diversi giorni, evitando di basarsi su un unico campione.

1.4.3 Management dello stallone con seme anomalo

In dipendenza della causa dell'anomalia, molti maschi sono usati per l'accoppiamento con successo anche se presentano anomalie del seme; per capire quale possa essere la causa dell'anomalia sarebbe necessario aver un profilo completo della salute dell'animale effettuando un emocromocitometrico, un biochimico, un'analisi dell'urina prima e dopo l'ejaculazione, un'ecografia prostatica, una coltura del seme per batteri e mycoplasmi e una valutazione del profilo ormonale (*Freshman, 2001*).

Molti medicinali possono causare problemi della produzione degli spermatozoi o della funzione riproduttiva, come il prednisone, il besametassone, il metiltestosterone, la cimetidina, il ketoconazolo (*Freshman JL, 1989; Myers LJ et al., 1988*): se il seme ne viene danneggiato, tornerà alla condizione normale in media dopo 3 mesi dalla sospensione della somministrazione.

La presenza di metalli pesanti o tossine nell'ambiente o nell'organismo possono determinare una secondaria degenerazione testicolare (*Barsanti J, Finco D, 1986*): se è presente tale sospetto è necessario interrogare accuratamente il proprietario riguardo la stabulazione del cane, il tipo di acqua che beve, il cibo che assume, e l'eventuale presenza di piante o materiali tossici nei luoghi in cui l'animale vive (*Freshman, 2001*).

Anche l'età può influenzare negativamente la fertilità: ad esempio la razza Beagle raggiunge la pubertà intorno ai 6 mesi d'età ma il seme raggiunge la massima fertilità dopo i 15 mesi (*Beach FA, 1970*); razze più grandi o giganti raggiungono tale livello ad un'età ancora più avanzata: per un animale giovane, con scarsa fertilità, il miglior trattamento è il tempo (*Freshman, 2001*).

Dall'altro lato, con la senilità incorre fisiologicamente una degenerazione atrofica testicolare, e in tali casi non esiste alcun tipo di trattamento: con stalloni anziani sarà utile l'inseminazione artificiale con il deposito del seme direttamente in utero per via transcervicale o laparoscopica.

Altre patologie che possono influenzare negativamente la fertilità riguardano le anomalie prostatiche: circa l'80% dei maschi interi oltre i 5 anni presenta ipertrofia o iperplasia prostatiche benigne; tali situazioni favoriscono l'insorgenza di infezioni: molti animali con prostatite non presentano segni clinici, in altri invece, l'infezione si estende a testicoli ed

epididimo (*Freshman 2001*); un liquido prostatico normale favorisce la motilità degli spermatozoi mentre un liquido anomalo, derivante da un prostata infiammata, la inibisce (*Freshman J, 1989*), inoltre, con l'infiammazione della prostata, saranno presenti batteri e proteine infiammatorie nel seme, tutti elementi che ne danneggiano la qualità.

La diagnosi di prostatite cronica viene effettuata in base all'analisi del seme, delle urine, in base a tamponi prostatici, ed ecografia; in tali frangenti è spesso concomitante anche una cistite batterica (*Freshman J, 2001*).

L'ideale per aver un campione di liquido prostatico è cateterizzare l'uretra e massaggiare per via rettale la prostata: il liquido ottenuto va posto in adeguato terreno di trasporto, e su di esso va effettuato un batteriologico e una ricerca di *Mycoplasma*: il batteriologico va confrontato con un'analisi del seme raccolto in uretra postprostatica: se la flora batterica del liquido prostatico è maggiore rispetto alla flora del seme raccolto in uretra ciò sarà fortemente indicativo di infezione; per quanto riguarda *Mycoplasma*, esso è un saprofito dell'uretra maschile come del tratto genitale femminile: rilevarne una quantità superiore a 10^5 unità formanti colonia/ml oppure una grossa frazione di crescita in coltura con contemporanea presenza di infiltrazione neutrofila dei tessuti può esser indicativo di infezione (*Purswell BJ, Wincke JR, 1992*).

Il pH del sangue o dell' interstizio è generalmente neutro, il pH della prostata è acido sia fisiologicamente sia negli animali con prostatite cronica: per trattare tale patologia sono utili antibiotici adatti a tale pH come l'eritromicina, la combinazione trimethoprim-sulfamidici o i fluorochinoloni (*Eilts BE, 1997*); l'antibiotico va somministrato per circa 6-9 settimane e il liquido prostatico va posto nuovamente in coltura dopo la cessazione della somministrazione per verificare l'efficacia della cura antibiotica (*Freshman et al., 1990*);

una volta giunti al controllo dell'infezione andrebbe somministrata per circa 6-12 mesi una dose di antibiotico pari ad un terzo di quella efficace: tale stratagemma permette di ripristinare la sterilità del liquido prostatico e la fertilità del seme (*Freshman et al., 1990*).

L'accoppiamento naturale con un maschio di provata fertilità rimane la miglior scelta (*Cain, 2001*): in alcuni casi esso non è però possibile;

se dopo 3 giorni dal picco di LH (il picco avviene quando il progesterone sierico supera il livello di 2-5ng/ml) l'accoppiamento naturale non avviene è necessario ricorrere all'inseminazione artificiale per non perdere il calore della femmina: è possibile scegliere tra seme fresco, refrigerato o congelato con diversi risultati che caratterizzano ogni tipologia; l'inseminazione con seme fresco permette un risultato pari alla monta naturale, con il

vantaggio di poter effettuare la valutazione della fertilità poco prima di effettuare l'inseminazione, scongiurando eventuali dubbi sulla fertilità del maschio (*Root-Kustritz MV, Johnston SD, 2000*); se il seme dovesse presentare scarsa qualità, l'aggiunta di un diluitore apposito (Fresh Express semen extender; Synbiontic Corporation) ne può aumentare la motilità (*Cain, 2001*).

L'inseminazione con seme refrigerato o congelato è sconsigliata in caso di problemi di fertilità: meglio usarla in situazioni come il mancato concepimento per stress da trasporto; l'IA con seme refrigerato viene effettuata nei giorni 4 e 6 dopo il picco di LH, mentre quella con seme congelato viene effettuata nei giorni 5 e 6, preferibilmente intrauterina (*Cain, 2001*); per quanto riguarda quest'ultima è ideale, ma non sempre possibile, effettuare una prova di congelamento sul seme prima di programmare l'IA, per valutarlo dopo 24, 48 e 72h dallo scongelamento, dopo averlo posto in un apposito mestruo e considerarne la fertilità.

SCHEDA PER LA VALUTAZIONE DELLO STALLONE

Caso..... Data.....
Cliente..... Indirizzo.....
Nome del cane..... Razza.....
Età..... tatuaggio n°.....

ANAMNESI

Condizione fisica..... peso..... data dell'ultima monta.....
Data dell'ultima cucciolata..... Test eseguiti.....
Pedigree.....

PRELIEVO DI SEME

Data dell'ultimo prelievo..... Andamento del prelievo.....
Problemi di salute pertinenti.....
Pene/prepuzio..... Funicolo spermatico.....
Scroto..... Testicoli.....
Prostata..... Epididimo.....
Osservazioni.....

VALUTAZIONE DEL SEME

Colore	Volume	pH	spermi/ml	numero tot spermi
1° frazione.....	X	X	X
2° frazione.....	X
3° frazione.....	X	X	X

X: valori non necessari o non calcolabili

MOTILITA'

Motilità totale:.....% Motilità progressiva.....%
Diluyente (se usato):..... velocità: Bassa Moderata Elevata

MORFOLOGIA

Metodo di valutazione.....contrasto di fase.....

%normali..... normali totali (%normali x n° spermi).....

Anomalie della testa.....

Anomalie della coda.....

Altro.....

Citologia: (da 0 a 4+) (presenza di GB, GR, Cells, ...)

.....

CONCLUSIONI:.....

.....

1.5 VALUTAZIONE DELLA FEMMINA

Per la valutazione di una femmina con sospetta infertilità risulta di importanza critica la raccolta di un'anamnesi accurata; è necessario prender in esame il maggior numero possibile di dettagli relativi ai cicli precedenti, comprese le date dei calori, il comportamento della femmina durante l'estro, le date e i metodi delle precedenti inseminazioni, la fertilità degli stalloni utilizzati e gli eventi successivi all'accoppiamento; gli elementi più importanti da focalizzare nell'anamnesi riproduttiva sono: il comportamento durante il ciclo e gli intervalli interestrili della femmina, l'identificazione dei criteri utilizzati per determinare il momento in cui farla riprodurre e il suo comportamento durante l'accoppiamento (*Nelson RW, Couto CG, 2006*).

E' necessario effettuare un esame clinico completo per identificare le possibili cause di infertilità esterne all'apparato riproduttore, l'esistenza di anomalie potenzialmente in grado di influire negativamente sulla salute della femmina o sulla gravidanza, la presenza di difetti congeniti ed ereditari che dovrebbero portare all'esclusione della femmina in esame dai programmi riproduttivi.

I riscontri dell'anamnesi e dell'esame clinico permettono di determinare la natura di ogni test aggiuntivo da eseguire: l'esame emocromocitometrico completo, il profilo biochimico e l'analisi dell'urina forniscono eccellenti informazioni riguardo alla salute metabolica complessiva dell'animale e possono esser ragionevolmente inclusi nell'ambito della valutazione di routine dell'infertilità (*Johnson C, 2006*).

Successivamente si analizza l'apparato riproduttore: va fatta un'accurata palpazione delle ghiandole mammarie per valutarne dimensioni e consistenza ed apprezzare le caratteristiche di ogni eventuale secrezione; si ispeziona la vulva per stabilire se siano presenti anomalie strutturali o scoli di varia natura: si separano le labbra della rima vulvare in modo da visualizzare mucosa vestibolare e clitoride;

nelle cagne di dimensioni adeguate, il vestibolo e la parte posteriore della vagina vanno ispezionati con un dito guantato e lubrificato con gel idrosolubile; l'utero viene palpato per via transaddominale prendendo come punto di riferimento il margine craniale del pube: esso si presenta come un cordoncino, di diverse consistenze a seconda dello stato fisio-patologico in cui si trova; è possibile che dopo tale manualità si evidenzino uno scolo vulvare.

Il quadro riscontrato in una femmina portata in visita per la valutazione di infertilità può venir tipicamente classificato in una delle seguenti descrizioni: incapacità di presentare il ciclo,

intervallo interestrade anomalo, alterazioni del proestro-estro, cicli normali ma mancato concepimento o scarso numero di cuccioli.

Tab 8: Informazioni anamnestiche relative all'infertilità femminile.(Nelson RW, Couto CG, 2006)

Qual è lo stadio attuale del ciclo?

Descrizione dei cicli precedenti

Età in cui è comparsa la pubertà

Date di insorgenza dei cicli precedenti

Durate dei cicli precedenti

Comportamento durante proestro-estro:

-attrae i maschi?

-accetta la monta?

-si verifica l' intromissione?

-si verifica l' inseminazione?

Date di inseminazione: come sono state scelte?

-giorno del calore

-modificazioni comportamentali

-citologia vaginale

-sincronizzazione con l' OV

Metodo di inseminazione:

-naturale

-IA: con seme fresco, refrigerato o congelato

Eventi dopo l' accoppiamento o dopo i cicli senza accoppiamento

Diagnosi precoce di gravidanza:

-quando?

-con quale metodo?

Sviluppo mammario

Scolo vulvare

Aborto

Parto:

-durata della gestazione

-distocia

-numero di nati

-salute e sopravvivenza dei cuccioli

Studi diagnostici ed eventuali terapie legate alla sfera riproduttiva

Tests eseguiti e relativi risultati:

-profilo tiroideo

-brucella canis

Farmaci usati:

-dosaggio

-via di somministrazione

-frequenza

Problemi non riproduttivi

Nell' animale

Nell' ambiente in cui vive

1.5.1 Incapacità di presentare il ciclo

La mancata presenza di segni estrali può essere indice di diverse situazioni patologiche solo se la femmina ha già superato i 24 mesi di età: mediamente l'insorgenza della pubertà è stimata all'interno di un range tra i 6 e i 23 mesi, variabile da individuo a individuo (*Johnston S D, 1991*).

Prima di valutare una femmina per anaestro persistente è utile farla vivere qualche settimana con altre femmine in estro, cosa che generalmente fa entrare in proestro le femmine puberili normali (*Johnston S D, 1991*).

Nell'anamnesi è importante conoscere il tipo di alimentazione dell'animale, se vengono somministrati farmaci (glucocorticoidi, progestinici, androgeni inducono anaestro), se vi sono

episodi di ipotiroidismo nell'anamnesi familiare; va valutata la citologia vaginale e va effettuata una misurazione del progesterone sierico;

l'emogramma, il profilo biochimico e l'analisi delle urine potranno evidenziare se presenti patologie sistemiche debilitanti che sono associate all'anaestro primario.

Vi sono diverse diagnosi differenziali di fronte all'anaestro:

si parla di *calore silente* quando la femmina non manifesta chiari segni di estro: spesse volte tale problema riguarda situazioni in cui la cagna vive sola ed è osservata con poca attenzione; in tale situazione, se la misurazione del progesterone supera i 2ng/ml significa che l'animale ha ovulato negli ultimi due mesi ma il proprietario non se n'è accorto.

L'anaestro persistente è uno dei sintomi che si possono presentare in caso di cisti follicolari; l'assenza di manifestazioni estrali si ritiene indotta più che dal tipo di attività endocrina, da un'azione non meglio definita, connessa alle dimensioni delle cisti; la diagnosi può avvalersi di metodiche ultrasonografiche o celiotomiche e appare possibile il recupero della normale attività ciclica ovarica a seguito della rottura o della rimozione chirurgica delle cisti (*Feldman EC, Nelson RW, 2003*).

Anche la presenza di cisti luteiniche si associa a volte ad anaestro protratto, e anche in questo caso l'intervento laparotomico per la valutazione e la rimozione delle strutture cistiche sarà risolutivo.

L'insufficienza tiroidea dovuta a cause autoimmuni o ereditarie può determinare anaestro persistente: a sei mesi dall'inizio della terapia con ormoni tiroidei l'attività ciclica di solito riprende, ma non è consigliabile far riprodurre animali affetti da ipotiroidismo a causa dell'ereditabilità della patologia (*Jonhston S D, 1991*).

Raramente l'anaestro può esser una conseguenza di aplasia o neoplasia ovarica, diagnosticabili con laparoscopia, oppure di ooforite immunomediata, diagnosticabile con biopsia del tessuto ovarico (*Jonhston S D, 1991*).

Se la situazione dell'animale non dovesse corrispondere a nessuna delle anomalie trattate in questo capitolo, può venir sospettata un'insufficienza ovarica: per diagnosticare tale patologia vanno misurati i livelli sierici di LH e FSH, che se elevati dimostrano che l'ovaio non è recettivo ai loro stimoli; in una femmina apparentemente sana ma con anaestro persistente si

può indurre farmacologicamente l'estro somministrando hCG o preparazioni a base di LH e FSH.

1.5.2 Intervallo interestrile abbreviato

L'utero canino necessita dai 130 ai 150 giorni per l'involutione e la riparazione endometriale: un intervallo interestrile minore di 4 mesi spesso determina infertilità (*Johnston SD, 1980*).

Vi sono alcune razze come Rottweiler e Pastori Tedeschi in cui è stata descritta la "sindrome dell'interestro abbreviato" : tali femmine ciclano ogni 4 mesi, ma la frequente stimolazione dell'endometrio predispone queste razze all'iperplasia endometriale cistica, e frequentemente, alla piometra: è possibile utilizzare il mibolerone per trattare questi casi, somministrandolo per 6 mesi; dopo tale trattamento la femmina può essere accoppiata al ciclo successivo, ma se l'estro inizia prima di 60 giorni dalla fine della somministrazione, l'accoppiamento va ulteriormente posticipato per evitare la mascolinizzazione dei feti indotta dagli androgeni (*Feldman EC, Nelson RW, 1987*).

Anche i calori interrotti possono determinare l'accorciamento dell'intervallo interestrile: tali situazioni si presentano spesso nelle cagne giovani, dove ai segni di proestro non fa seguito l'accettazione del maschio: tale problematica viene identificata con valutazioni seriali della citologia vaginale ai primi segni di proestro.

La mancata ovulazione accorcia l'intervallo interestrile di circa due mesi, perché fa saltare la fase luteinica: la diagnosi viene effettuata monitorando il progesterone sierico, e il trattamento somministrando hCG (500 UI/Kg) nel ciclo successivo a partire dal giorno precedente fino al giorno successivo alla prima monta (*Jones DE, Joshua JO, 1988*).

1.5.3 Intervallo interestrile protratto

La lunghezza dell'intervallo interestrile è determinato dalla razza, ed ha un'ereditabilità del 35% (*Johnston S.D., Root-Kustritz M.V. and Olson P.N.S, 2001*). Vi sono razze che presentano interestri maggiori di 8-10 mesi, come il Labrador, il Collie, il Greyhound, o addirittura che manifestano un unico calore annuale, come il Basenji (*Fontbonne A., 2006*) ma il loro prolungato intervallo interestrile non ha ripercussioni sulla fertilità (*Feldman EC, Nelson RW, 1987*).

Spesso il prolungarsi dell'interestro è il risultato della mancata manifestazione comportamentale del calore in un ciclo, detta "calore silente".

Per quanto riguarda soggetti in cui le manifestazioni estrali non sono particolarmente evidenti o in cui si verificano calori silenti spesso, l'estro non viene rilevato dal proprietario, e ciò viene erroneamente interpretato come prolungamento dell'intervallo interestrale: in tali situazioni la cagna va monitorata con la colpocitologia ogni 2 settimane per circa un anno per identificare il momento del calore e il tempo intercorso prima che si verifichi il successivo (*Freshman JL, 1991*).

Nelle cagne oltre i 5 anni si verifica fisiologicamente un aumento dell'intervallo interestrale (*Johnson CA, 1987*), e così pure negli animali affetti da patologie endocrine come l'ipotiroidismo, l'ipoadrenocorticismo o il Cushing, o affetti da patologie sistemiche molto debilitanti (*Olson PN, Thomas TN, Husted PW et al., 1988*).

Anche la presenza di cisti luteiniche funzionali, determinando un'elevata concentrazione sierica di progesterone, aumenta la durata dell'anaestro: la diagnosi è effettuabile dimostrando una prolungata secrezione di progesterone durante le 9-10 settimane successive all'estro (il valore sierico supera i 2ng/ml); i campioni vanno prelevati a 4 e 6 settimane per distinguere una normale secrezione dovuta alla presenza del corpo luteo dalla secrezione dovuta alla cisti. La risoluzione di tale problema è data dalla rimozione della cisti (*Fontbonne A., 2006*); nello stesso modo, cisti follicoliniche non secernenti determinano allungamento dell'anaestro, e queste vanno rimosse o trattate con hCG intramuscolare per 3 giorni (*Feldman EC, Nelson RW, 1987*).

Quando l'animale in anaestro non mostra problemi endocrini e siamo sicuri che non siano presenti calori silenti, va considerata la possibilità di indurre il calore con trattamento ormonale. I farmaci d'elezione sono gli antiprolattinici: si effettua la somministrazione di carbegolina oralmente per 2-3 settimane (*Verstegen J, Onclin K et al., 1994*). E' possibile usare anche la bromocriptina o la metergolina, facendo attenzione a non indurre il calore troppo precocemente (in diestro, ad esempio) perché ciò influisce negativamente sulla fertilità (*Zoldag L, Fekete S et al., 2001*).

Neoplasie ovariche possono risultare in un interestro allungato, la diagnosi viene effettuata con una laparoscopia o con l'ecografia (*Burke TJ, 1986*).

Infine, è documentato che il ciclo successivo al parto si presenta in ritardo di circa 1 o 2 mesi: ciò non accade però in tutte le femmine, e la spiegazione rimane incerta (*Rogers AL et al., 1960*).

1.5.4 Estro persistente

La durata normale del proestro può arrivare ai 17 giorni, mentre quella dell' estro può raggiungere i 21: un comportamento estrale che si prolunga oltre le 6 settimane va considerato anomalo (*Freshman JL, 1991*).

Il periodo del ciclo in cui l'animale si trova va identificato con la citologia vaginale per escludere patologie come la vaginite che destano comunque attrazione del maschio anche se la femmina non è in calore: valutazioni citologiche seriali che evidenziano elevata presenza di neutrofili degenerati e non, indipendentemente dallo stato cellulare del vetrino, sono indicativi di vaginite o piometra; mentre la cheratinizzazione delle cellule epiteliali che perdura per più di tre settimane è diagnostica di estro persistente, e le cause di tale stato sono molteplici.

Le cisti follicolari, strutture a parete sottile secernenti estrogeni, determinano ninfomania e, a lungo andare, depressione midollare. Si stima che vi sia il 35% di possibilità che cisti siano presenti su entrambe le ovaie, e che la loro manifestazione sia ereditaria, come è riscontrato nella bovina (*Johnston S.D., Root-Kustritz M.V. and Olson P.N.S., 2001*): in valutazioni seriali, i livelli sierici di estrogeni sono elevati (*Feldman EC, Nelson RW, 1987*); il trattamento delle cisti ovariche è solitamente chirurgico, con l'ovariectomia monolaterale, se è interessato un unico ovaio, o con l'ovarioisterectomia se gli estrogeni secreti hanno già portato l'utero ad iperplasia endometriale cistica. L'uso di farmaci come il GnRh o LH per indurre l'ovulazione del follicolo cistico (1000 UI di hCG per via intramuscolare) sono consigliati solo se si provvederà subito dopo alla sterilizzazione dell'animale; in altro caso, il brusco calo di estrogeni determinato dai farmaci potrà predisporre l'animale ad insorgenza di piometra (*Johnston SD., 1988*).

Anche tumori delle cellule della granulosa possono indurre estro persistente: rappresentano dal 23 al 52% dei tumori ovarici; insorgono dopo i sette anni, sono spesso monolaterali e danno metastasi nel 20% dei casi (*Johnston S.D., Root-Kustritz M.V. and Olson P.N.S 2001*). Tali tumori possono secernere estrogeni, determinando situazioni di calore prolungato, o, in alcuni casi secernere progesterone, determinando situazioni di anaestro persistente. La diagnosi può venir effettuata con la palpazione e l'ecografia ovariche, il trattamento è senza dubbio la rimozione chirurgica della neoplasia (*Feldman EC, Nelson RW, 1987*).

Infine, cagne con estro persistente ma con apparentemente nessuna delle anomalie trattate in questo capitolo, vanno indagate per shunts portosistemici o anomalie epatiche, i quali determinano un alterato metabolismo ormonale (*Olson PN et al., 1988*).

1.5.5 Rifiuto dell'accoppiamento

Se una femmina si sottrae alla monta va considerato che l'anomalia comportamentale è spesso legata ad un problema anatomico, che può essere di origine congenita o acquisita.

L'anomalia più frequentemente riscontrata è la presenza di un setto all'interno della vagina, derivante dall'incompleta fusione in fase embrionale dei dotti Mülleriani (*Johnston SD et al., 2001*); può accadere la persistenza dell'imene tra il vestibolo vaginale e la vagina, e questo porta ad uno scarso se non nullo scolo vaginale in fase proestrile e quindi alla mancata identificazione del calore da parte dell'allevatore; le anomalie congenite tendono a predisporre il soggetto a vaginiti croniche o a infezioni del tratto uro-genitale (*Fontbonne A, 2006*).

Anche lo pseudoermafroditismo o ermafroditismo vero inducono infertilità (*Okkens et al., 1992*).

Per quanto riguarda le anomalie acquisite, spesso si verifica un'iperplasia vaginale in fase estrile, dovuta all'elevata concentrazione sierica che raggiungono gli estrogeni; ne sono frequentemente colpite le razze brachicefale (Bullmastiff, Boxer,..); tale condizione ostacola l'intromissione del pene e rende il coito doloroso, oltre a determinare condizioni favorevoli all'insorgenza di vaginiti che di conseguenza riducono la fertilità della femmina (*Fontbonne, 2006*).

Anche cicatrici del canale vaginale o di episiotomie pregresse necessarie per il parto possono portare a situazioni in cui la femmina si sottrae alla monta per il dolore causato dall'intromissione nell'apertura vaginale ristretta.

1.5.6 Infertilità con attività ciclica normale

L'infertilità in una femmina che risulta normale sotto tutti gli aspetti del ciclo riproduttivo può esser dovuta a una gestione impropria degli accoppiamenti, all'infertilità del maschio, a lesioni della vagina, dell'utero o delle tube uterine, a infezioni del tratto riproduttivo, a morte embrionale precoce o all'avanzare dell'età: i tassi di concepimento e il numero di nati per

cucciolata è massimo e la natimortalità è minima in cagne (Beagle) di età compresa tra i 2 e i 3,5 anni (Nelson RW, Couto CG, 2006).

Per quanto riguarda l'infertilità del maschio, è d'obbligo eseguire su esso la valutazione completa dello stato di salute e della fertilità del seme; mentre per quanto riguarda le anomalie anatomiche, esse vanno verificate nella valutazione iniziale della femmina, ed eventualmente approfondite con vaginoscopia con mezzi di contrasto e/o ecografia: lacinie fibrose determinano dolore durante l'intromissione e per questo la femmina si sottrarrà alla monta, e ostruzioni del tratto genitale causano l'impossibilità per il seme di giungere in utero o nell'ovidutto determinando infertilità (Freshman JL, 1991).

I problemi ormonali come l'ipotiroidismo, l'ipoluteinismo, le cisti follicolari, non sempre alterano le varie fasi del ciclo estrale: problematiche di tipo ormonale vanno sospettate anche in femmine normalmente cicliche ma infertili (Fontbonne A., 2003).

Succede che a volte il problema dell'animale sia di tipo comportamentale: cagne dominanti rifiutano di accoppiarsi con un maschio loro subordinato (Wright P and Watts JR, 1998- Johnston SD et al., 2001); in tali casi è sconsigliato in qualunque modo forzare l'accoppiamento, meglio ricorrere all'inseminazione artificiale (Fontbonne A., 2003). Nella cagna sono documentate preferenze sessuali, ed è possibile che la psicologia possa influenzare fattori come l'ovulazione o determinare riassorbimento embrionale precoce (Bertrand M, 1989).

Infine, anche le infezioni possono essere causa di scarsa fertilità nella femmina normalmente ciclica (Freshman JL, 1991).

1.5.7 Agenti infettivi e infertilità

Molti agenti infettivi sono sospettati di indurre infertilità nella cagna, e tali problematiche spesso interessano più frequentemente gli animali di allevamento rispetto agli animali domestici. Le infezioni determinano infertilità con diverse vie patogenetiche: attività spermicida in vagina, inibizione della motilità degli spermatozoi, ciliostasi (Linde-Forsberg C and Bolse G, 1995) o favorendo la penetrazione di ulteriori agenti infettivi all'interno dell'utero durante il proestro o l'estro (Van Duijkeren E, 1992).

Le infezioni uterine determinano infiltrazione linfocitaria dell'endometrio creando una situazione poco favorevole all'impianto e allo sviluppo dell'embrione (Linde-Forsberg C and Bolse G 1995); inoltre durante la gravidanza l'instaurarsi di un'endometrite o di una placentite può portare a riassorbimento embrionale o ad aborto (Van Duijkeren E, 1992).

E' dimostrato che alcuni virus hanno un ruolo nell'infertilità: l'herpesvirus canino (CHV), virus ubiquitario che nell'ambiente è facilmente distrutto dai comuni disinfettanti, ha un effetto mortale sui cuccioli nella fase perinatale: l'infezione avviene per via orale o inalatoria; è possibile anche l'infezione transplacentare a partire dalla seconda metà della gravidanza (*Anvik JO, 1991*); i segni clinici sono a volte visibili durante le tre settimane precedenti e le tre settimane successive al parto; dopo la fase acuta dell'infezione il virus diventa latente nei gangli lombosacrali o nelle ghiandole salivari e può andare incontro a fasi di recrudescenza in situazioni di stress o immunodepressione (*Okuda J et al, 1993*); i segni clinici comprendono lesioni vescicolo-papulari sulle mucose genitali e sintomi respiratori negli adulti, mentre nei cuccioli generalmente comprendono morte perinatale acuta, con il rilievo alla necropsia di emorragie petecchiali delle sierose e congestione degli organi interni; si possono presentare situazioni di viremia fino a tre settimane dopo il parto: in tali casi i cuccioli vanno isolati, mantenuti ad una temperatura esterna maggiore di 38 gradi e sostenuti con fleboclisi e aciclovir (*Kustritz MV, 2005*);

un recente studio ha mostrato un miglioramento della fertilità utilizzando un apposito vaccino spento contro il CHV al momento dell'accoppiamento e dopo la prima metà della gestazione (*Poulet H, Guigail PM, Soulier M et al, 2001*).

Regolari studi epidemiologici dimostrano che negli ultimi dieci anni la prevalenza sierologica di tale virus sta aumentando nei paesi europei: in Francia, su 84 fattrici la prevalenza è del 30% circa (*Guigal PM, Fontbonne A, Grandjean D et al., 2002*), mentre in Belgio si è evidenziata una prevalenza di circa l'80%. E' comunque difficile stabilire se il ruolo dell'herpesvirus nell'infertilità sia diretto oppure esso, determinando la soppressione delle difese delle mucose vaginali non favorisca piuttosto l'azione patogena di altri microrganismi come i micoplasmi (*Guigail PM et al, 2002; Poulet H et al., 2001*).

Altri virus che comportano infertilità sono il morbillivirus del Cimurro, che agisce anch'esso inibendo le difese mucosali, e il Parvovirus (CPV1) che spesso causa riassorbimento embrionale durante la prima metà della gravidanza: l'inoculazione oro-nasale sperimentale del virus causa riassorbimento in 3 cagne su 8 (*Fontbonne A, 2006*).

Per quanto riguarda le infezioni di tipo batterico, il primo agente infettivo largamente documentato è l'agente eziologico della Brucellosi: il genere *Brucella* comprende bacilli e coccobacilli di dimensione 0,5-0,7x 0,6-1,5µm, aerobi obbligati, asporigeni, immobili,

catalasi-positivi; sono parassiti obbligati endocellulari e ciascuna specie ha un ospite naturale che funge da serbatoio per l' infezione. Le secrezioni genitali e il latte sono la via di diffusione di tali microrganismi; le brucelle sviluppano lentamente e stentatamente nei comuni terreni di coltura: necessitano di terreni addizionati di sangue e molti ceppi necessitano anche di un'atmosfera microaerofila.

Le brucelle sono sensibili generalmente alle tetracicline, che da sole, o in associazione a streptomycin, rappresentano i farmaci d' elezione per la terapia della brucellosi. La maggior parte delle specie patogene sono localizzate a livello degli organi genitali ma tutte trasmissibili all' uomo. La principale specie patogena nel cane è *Brucella canis*, che causa aborti nelle femmine e orchite, epididimiti, prostatiti con conseguente infertilità permanente nel maschio.

Fortunatamente la prevalenza di questa malattia in Europa è piuttosto bassa: si va dal 4 all'8% (Mateu de Antonio EM, Delgado S, 1998).

Altri batteri sono sospettati come causa di infertilità: *Campylobacter Jejuni* (Bulgin MS, Ward ACS et al., 1984), *Salmonella* spp., *Listeria Monocytogenes* (Sturgess CP, 1989), *Leptospira Interrogans* (Bolin CA, 1996), *Coxiella burnettii*, *Rickettsia rickettsii* e *Chlamidia* spp.(Greene CE, 1998); purtroppo la letteratura veterinaria a riguardo è scarsa e poco aggiornata.

Probabilmente un ruolo maggiore nella patologia dell'apparato genitale lo svolgono quei batteri fisiologicamente presenti, come *Mycoplasma* e *Ureaplasma* (Poulet et al., 2001), isolati sia da femmine fertili che infertili; come nella donna, pare che i problemi insorgano quando questi batteri superano un certo numero, e cioè oltre 10^4 unità formanti colonia (CFU)/ml, prevalendo sui batteri saprofiti e stimolando la risposta immunitaria locale, ma non essendo, nella maggior parte delle volte, richiesto uno specifico isolamento di tali patogeni, non si ha certezza del loro coinvolgimento nei problemi di infertilità (Mimouni P, 1999).

Molti batteri sono normalmente isolati dalla vagina di femmine sane e fertili (Watts et al. 1996), e alcuni vengono isolati anche in utero (Johston et al, 2001): parte di questi sono aerobi (*Streptococcus* spp., *E.Coli*, *Pasteurella*, *Staphilococcus* spp., *Proteus* spp., *Corynebacterium* spp...), parte sono invece anaerobi (*Lactobacillus* spp., *Bifidusbacterium* spp.,*Chlostridium* spp...): nelle cagne normalmente fertili si isola spesso una flora batterica mista da tamponi vaginali (Hirsch DC et al, 1977-Bjurstorm L, 1993). Anche nelle cagne infertili si isolano tali batteri, ma se vi sono problemi pregressi di infertilità, l'allevatore sceglie di trattarle con antibiotici: questo andrebbe fatto se dall'esame colturale del tampone

vaginale vengono isolati uno o al massimo due batteri, presenti in quantità elevata in coltura e non a prescindere, per evitare fenomeni di antibioticoresistenza (Fontbonne A.,2003).

Tab 9: Batteri isolati da coltura vaginale (Kustritz, MVR, 2006).

<i>Batteri isolati da cagna normale</i>	<i>Batteri isolati in corso di vaginite</i>
<i>E. Coli</i>	<i>E. Coli</i>
<i>Streptococcus Canis</i>	<i>Streptococcus Canis</i>
<i>Pasteurella Multocida</i>	<i>Staphilococcus Intermedius</i>
<i>Staphilococcus Aureus</i>	<i>Streptococcus beta-emolitico</i>
<i>Streptococcus sp.</i>	<i>Staphilococcus Aureus</i>
<i>Streptococcus beta-emolitico</i>	<i>Pasteurella Multocida</i>
<i>Streptococcus alfa-emolitico</i>	<i>Proteus Mirabilis</i>
<i>Bacillus sp.</i>	
<i>Proteus Mirabilis</i>	
<i>Staphilococcus Intermedius</i>	
<i>Staphilococcus sp.</i>	

Organismi elencati in ordine di frequenza.

Le infezioni dell'apparato riproduttore sono causate da una sovracrescita di questi batteri, i quali sono comunque presenti nell'animale sano e senza problemi di fertilità; per osservarne la presenza si effettuerà la coltura di tamponi vaginali, e i risultati del laboratorio dovranno essere espressi sia in termini qualitativi che quantitativi (Kustritz MVR, 2006).

I batteri elencati in tabella sono di tipo aerobio: è poco frequente isolare da tamponi vaginali batteri anaerobi (Olson, 1976).

Anche *Mycoplasma*, batterio privo di parete, fa parte della flora autoctona del tratto genito-urinario: l'isolamento e la coltura richiedono materiali e metodi particolari, quindi molto spesso non ne viene richiesto l'isolamento; in uno studio in cui vengono confrontati risultati di colture vaginali con isolamento di mycoplasma tra cagne sane ma senza anamnesi riproduttiva (n=10), cagne con anamnesi riproduttiva di buona fertilità (n=16), cagne con

problemi di fertilità (n=27) e infine cagne con vaginite (n=24), non è risultata differenza nella frequenza di isolamento di mycoplasma tra i diversi gruppi (Doig PA et al., 1981).

1.6 CLASSIFICAZIONE DELLE SPECIE BATTERICHE ISOLATE DA TAMPONI VAGINALI (Poli G, Cocilovo A, 2001).

1.6.1 Genere *PSEUDOMONAS*

Il genere *Pseudomonas* è costituito da bacilli dritti o leggermente incurvati di 0,5-1x1,5-5µm; sono gram-negativi, crescono in agar-Mac Conkey, sono aerobi obbligati, tranne alcuni ceppi, catalasi-positivi, mobili per la presenza di uno o più flagelli polari. *Pseudomonas* spp. sono sia saprofiti sia patogeni, sono ubiquitariamente diffusi in natura e si ritrovano nel suolo e nell'acqua, oltre che come commensali dell'apparato enterico e della cute. Sono facilmente coltivabili nei comuni terreni di laboratorio; molte specie producono pigmenti di vario genere, solubili in acqua, come la piocianina di colore blu, che diffonde nel terreno, oppure insolubili, come la piorubina, di colore rosso, che conferisce colorazione solo alla colonia, senza diffondere nel terreno. Il loro ritrovamento può essere interpretato in diversi modi: spesso si tratta di contaminanti del tampone, ma se in coltura presentano alta carica o se l'animale da cui vengono isolati è debilitato o è stato sottoposto a cure antibiotiche prolungate, *Pseudomonas* spp. assumono il ruolo di patogeni.

Il genere *Pseudomonas* presenta resistenza alla maggior parte degli antibiotici e quindi, per il trattamento delle infezioni da esso sostenute è sempre consigliabile effettuare un antibiogramma per la definizione di un esatto spettro di antibiotico-sensibilità. *Pseudomonas aeruginosa* è abbastanza sensibile ad alcune penicilline semi-sintetiche (carbencillina, ticarcillina), ai carbapenemici (imipenem), e a molti aminoglicosidi. Solo 3 delle numerose specie sono infettive per gli animali e l'uomo: *P. aeruginosa* determina raramente infezione, e soprattutto in animali debilitati o con lesioni mucosali, comportando processi infiammatori, a carattere prevalentemente purulento, circoscritti ai vari organi o apparati (otiti, dermatiti, cistiti, ascessi, enteriti..) o setticemie; *Pseudomonas mallei*, agente infettivo della morva, può occasionalmente determinare infezione anche nel cane, ma non è presente nel territorio italiano; *Pseudomonas pseudomallei*, agente eziologico della melioidosi, ha determinato casi sporadici anche in cani, nonostante la malattia sia tipica dei ruminanti.

1.6.2 Famiglia delle ENTEROBACTERIACEAE

La famiglia delle enterobacteriaceae è costituita da bacilli gram-negativi, di dimensioni 0,4-0,6x2-3µm, anaerobi facoltativi, quasi sempre mobili (per la presenza di flagelli peritrichi); fermentano il glucosio, sono catalasi-positivi; sono in grado di crescere su terreni comuni quali l'agar nutritivo.

I batteri appartenenti a tale famiglia sono ubiquitari: si ritrovano nelle acque, nel suolo, e nell'intestino dell'uomo e di numerosissimi animali;

sono numerosi i terreni selettivi per il loro isolamento, i più usati sono: il terreno MacConkey, l' Endo-agar, il terreno EMB (eosina-blu di metilene), e DCA (desossicolato-citrato-agar). Tali terreni contengono sostanze che inibiscono la crescita di altri batteri, soprattutto gram-positivi.

A seconda della costituzione chimica della capsula batterica esterna, la crescita in coltura può avvenire in due modi: una forma S e una forma R; nella forma S le colonie hanno aspetto mucoso e lucente sui terreni solidi; nelle forme R le colonie hanno un aspetto secco e rugoso sui terreni solidi, mentre nei terreni liquidi la crescita ha aspetto granuloso, causato da agglutinazione delle cellule.

Le enterobacteriaceae sono suddivise in 28 generi e più di 80 specie, di cui solo alcune patogene per gli animali e per l'uomo.

1.6.2.1 Genere *ESCHERICHIA*

Il genere *Escherichia* appartiene alla famiglia delle Enterobacteriaceae ed è costituito da bacilli, di dimensioni 1,1-1,5x2,0-6,0µm, spesso dotati di una capsula, quasi sempre mobili per la presenza di flagelli peritrichi e lattosio-fermentanti. La specie più importante è rappresentata da *Escherichia coli*, comune commensale dell'intestino dei mammiferi: questo microrganismo può sopravvivere nel materiale fecale, nella polvere o nell'acqua anche per mesi. Di solito causa infezioni di tipo diarroico con diversi meccanismi di azione: enterotossicità, enteroinvasione, enteropatogenicità, enteroadesività, ed enteroemorragia. Ma oltre ad enteriti, gli *Escherichia coli* possono determinare nel cane anche infezioni del tratto genito-urinario. Il ritrovamento di *E. coli* in vagina è un riscontro piuttosto comune in tutti i mammiferi, e qui assume un ruolo di contaminante per vicinanza con l'apparato gastroenterico; per stabilire se *E. coli* possa essere patogeno ci si basa sul suo comportamento in coltura: una piastra con diverse colonie in purezza indica che *E. coli* ha preso il

sopravvento sul resto della flora saprofita, e ciò denota una sua particolare virulenza; inoltre, in agar sangue, aloni di emolisi attorno alle colonie sono caratteristici di un batterio emolitico, che nella maggior parte dei casi determina dei danni alle cellule dell'ospite.

E. coli cresce in coltura sia su agar-sangue, dove assume un colore grigiastro, sia su agar-Mac Conkey, dove assume colore rosa intenso perché, utilizzando gli zuccheri presenti determina l'acidificazione del terreno facendone precipitare il colorante fucsia che lo caratterizza.

E.coli è sensibile a tutte le betalattamine betalattamasi-resistenti (cefalosporine di I e II generazione) e ai principali aminoglicosidi e altamente sensibile a tutti i nuovi fluorochinoloni.



Fig7: Colonie di *E.coli* su agar-Mac Conkey

1.6.2.2 Genere *SALMONELLA*

Il genere *Salmonella*, anch'esso appartenente alla famiglia delle Enterobacteriaceae, comprende batteri di dimensioni $0,7-1,5 \times 2,0-5,0 \mu\text{m}$, talora mobili per la presenza di flagelli peritrichi, che non fermentano il lattosio ma fermentano il mannitolo, e spesso producono composti solforati.

Il loro serbatoio è generalmente l'intestino ma possono sopravvivere all'esterno fino a nove mesi soprattutto in terreni umidi, acqua, materiale fecale e alimenti; la maggior parte dei ceppi è cosmopolita.

Il genere *Salmonella* comprende quasi 2000 sierotipi diversi, i quali causano le varie forme di salmonellosi, malattie caratterizzate da processi infiammatori dell'intestino, che possono causare anche aborti, forme setticemiche, broncopolmoniti, meningoencefaliti, mastiti. Tipicamente sono zoonosi; per un cucciolo nato da poco, la salmonellosi può diventare una

malattia che determina una batteriemia fatale. Fortunatamente non è stata isolata in nessuno dei nostri tamponi.

Le salmonelle sono sensibili alla maggior parte degli antibiotici, i più usati sono le betalattamine (ampicillina e amoxicillina), gli aminoglicosidi (kanamicina, gentamicina, amikacina), le tetraciline, i chinoloni, e l'associazione sulfametazolo-trimethoprim.



Fig 8: Salmonella in terreno TL4: la colorazione nera delle colonie deriva dalla produzione di H₂S

1.6.3 Genere *ENTEROBACTER*

Il genere *Enterobacter* comprende batteri mobili per la presenza di pochi flagelli peritrichi: alcuni sono lattosio-fermentanti altri no. Tali batteri si ritrovano abbastanza frequentemente nell'ambiente (acque, suolo, fanghi, vegetazione) e si isolano dalle feci dell'uomo e di diversi animali. Soltanto la specie *Enterobacter aerogenes* è patogena anche per gli animali, nei quali determina metriti, agalassia e mastiti.

Il ritrovamento di *Enterobacter* in tamponi vaginali o tamponi di latte va interpretato come una contaminazione;

La maggior parte degli *Enterobacter* è sensibile alla carbencillina, alle nuove betalattamine e agli aminoglicosidi.

1.6.4 Genere *PROTEUS*

Il genere *Proteus* comprende batteri di dimensioni variabili (0,5x1-3µm), mobili per la presenza di numerosi flagelli peritrichi. Sui terreni agarizzati emanano un odore particolare e mostrano il caratteristico fenomeno dello "sciamaggio": le colonie appaiono circondate da una

sottile pellicola di crescita batterica disposta a cerchi concentrici e dovuta alla moltiplicazione ciclica di batteri che sono estremamente mobili; i batteri sciamanti sono da venti a trenta volte più lunghi dei normali; durante i periodi di stasi, tra una migrazione e l'altra, i batteri si dividono formando cellule di dimensioni normali che successivamente si accrescono per dare luogo ad un nuovo ciclo di sciamaggio; questa loro attività permette comunque la crescita di altri tipi di batteri in coltura, ma lo sciamaggio fa sì che le colonie di *Proteus* crescano al di sopra delle altre, rendendo impossibile l'isolamento in purezza dei batteri coesistenti e quindi la loro identificazione. Alcuni terreni sono formulati in modo da impedire lo sciamaggio di *Proteus*, ma questi sono solitamente terreni selettivi che inibiscono la crescita di molte altre specie batteriche. Queste ultime, non possono quindi essere isolate in agar sangue, proprio per il movimento di *Proteus* spp., e non possono essere isolate nei terreni selettivi e vengono così irrimediabilmente perse.

I batteri di questo genere idrolizzano l'urea, con conseguente produzione di ammoniaca: tale attività è direttamente proporzionale alla loro virulenza, data la nota azione tossica di tale sostanza sui tessuti.

Proteus è largamente distribuito in natura: si ritrova nell'ambiente esterno, come commensale dell'intestino dell'uomo, di numerosi mammiferi, di rettili e uccelli; proprio per questa sua diffusione sviluppa frequentemente resistenza agli antibiotici; il ritrovamento di numerose colonie di *Proteus* spp. dovrebbe sempre essere seguito da un antibiogramma per valutarne attentamente la sensibilità ai vari antibiotici.

Se vengono isolate sporadiche colonie invece, la presenza di tale batterio va interpretata come contaminazione del tampone.

Proteus mirabilis e *Proteus vulgaris* sono spesso presenti nelle feci del cane, sono possibile causa di diarrea, soprattutto dei cuccioli, ma anche di infezioni del tratto urinario o del canale uditivo.

Proteus è sensibile ad antibiotici come la kanamicina, l'ampicillina, il cloramfenicolo e la streptomina.



Fig 9: *Proteus*: notare gli aloni di sciamaggio

1.6.5 Famiglia delle PASTEURELLACEAE

La famiglia delle Pasteurellaceae è costituita da bacilli o coccobacilli Gram-negativi e al suo interno si ritrovano due generi di interesse veterinario: *Actinobacillus* e *Pasteurella*.

1.6.5.1 Genere ACTINOBACILLUS

Il genere *Actinobacillus* comprende bacilli pleomorfi Gram-negativi, di dimensioni 0,3-0,5x0,6-1,6 μ m, asporigeni, microaerofili, immobili e fermentanti il lattosio. Il pleomorfismo è rappresentato essenzialmente da forme bacillari mescolate con elementi coccoidei; queste ultime si ritrovano spesso ad un polo del bacillo, costituendo un aspetto caratteristico detto " a codice Morse ".

Si ritrovano sulle mucose degli animali domestici sia come commensali (soprattutto nel tratto digerente, respiratorio e genitale), sia come patogeni opportunisti; sono diffusi in tutto il mondo.

Per la loro coltura necessitano di atmosfera microaerofila e terreni arricchiti con sangue o siero, su cui formano delle piccole colonie che, per prolungata incubazione, si allargano mediante espansioni filamentose, assumendo forma rizoide (aspetto dei raggi di una stella). Dai nostri campioni non abbiamo isolato *Actinobacillus*.

Le specie del genere *Actinobacillus* sono generalmente sensibili alle nuove cefalosporine, alla rifampicina, alle tetracicline, al cloramfenicolo, agli aminoglicosidi e ai fluorochinoloni.

1.6.5.2 Genere *PASTEURELLA*

Il genere *Pasteurella* comprende coccobacilli, o corti bacilli Gram-negativi, di dimensioni 0,3-1,0x1,0-2,0 μ m, asporigeni, aerobi facoltativi, immobili e per la maggior parte fermentanti. *Pasteurella* mostra spesso, soprattutto nei preparati microscopici ottenuti da tessuti infetti, una colorazione bipolare che conferisce ai singoli bacilli l'aspetto cosiddetto "a spilla di sicurezza"; le sue colonie hanno un odore caratteristico.

Si ritrova nel tratto respiratorio e digerente di molti mammiferi e degli uccelli; nell'uomo è stata normalmente isolata nel tratto respiratorio. Generalmente cresce nei comuni terreni di coltura addizionati con sangue, mentre non cresce in agar-Mac Conkey.



Fig10: Colonie di *Pasteurella* spp. in alto a sinistra

Pasteurella spp. sono generalmente sensibili agli antibiotici più comuni come le penicilline, le cefalosporine, rifampicina, colistina, sulfamidici, tetraciline e cloramfenicolo.

1.6.6 Genere *BACTERIOIDES*

Il genere *Bacterioides* è rappresentato da bacilli di dimensioni 0,5-1,7x0,9-8 μ m, asporigeni, anaerobi obbligati, generalmente immobili. Questi microrganismi si ritrovano nella cavità orale, nelle vie aeree superiori, nell'intestino e nell'apparato urogenitale di molti animali e dell'uomo, dove rappresentano la flora saprofitica; tutte le specie crescono sui normali terreni di coltura per anaerobi (es. Columbia agar), al quale vengono aggiunti estratto di lievito, emina e vitamina K, per questo non sono stati isolati dai nostri tamponi.

Bacterioides asaccharilyticus causa osteomieliti nei cani; *Bacterioides melanogenicus* causa infezioni suppurative; *Bacterioides fragilis* e *Bacterioides levii* causano invece mastiti.

I *Bacterioides* sono generalmente sensibili al metronidazolo, al cloramfenicolo e alla clindamicina.

1.6.7 Genere *STREPTOCOCCUS*

Il genere *Streptococcus* comprende cocci Gram-positivi del diametro di 0,5-1,5 μ m, asporigeni, aerobi facoltativi (ma in qualche caso anaerobi obbligati), catalasi-negativi e immobili. Questi batteri tendono a disporsi in sequenze ordinate che ricordano una collana o una catenella, ma possono anche ritrovarsi singolarmente o appaiati.

I batteri di questo genere sono diffusi ovunque: la maggior parte costituisce la flora microbica delle vie aeree superiori e del tratto genitale; alcune specie si ritrovano nell'intestino, altre sulla cute. Possono comportarsi da patogeni opportunisti; sono sensibili all'essiccamento.

In base agli antigeni presenti sulla loro superficie gli streptococchi possono venir classificati in diversi gruppi, ma fin'ora alcuni antigeni non sono stati tipizzati, mentre alcuni streptococchi non sono dotati di antigeni di superficie, per cui la loro tassonomia risulta ancora controversa.

Possono esplicare la loro patogenicità mediante fattori cellulari, come la capsula che ne impedisce la fagocitosi, oppure con fattori extracellulari, immunogeni, come la streptolisina, responsabile dell'attività emolitica su agar-sangue, o la ialuronidasi, che depolimerizzando l'acido ialuronico permette la diffusione dei batteri nei tessuti.

Per la loro crescita, gli streptococchi richiedono di terreni particolarmente arricchiti, soprattutto con sangue o siero; in agar sangue mostrano diversi tipi di attività nei confronti degli eritrociti: α -emolisi o emolisi parziale, dove attorno alle colonie si forma un alone verdastro e sfumato; β -emolisi o emolisi totale, dove l'alone attorno alle colonie è definito e trasparente; infine può anche non verificarsi alcun tipo di emolisi; i batteri β -emolitici hanno una maggior attività patogena nei confronti degli animali; le condizioni ambientali e la composizione del terreno possono modificare il grado di emolisi degli streptococchi; sui terreni solidi le colonie sono piccole (0,5-1mm di diametro), nei terreni liquidi si presentano come granuli che tendono a sedimentare, chiarificando il surnatante.

Le specie patogene per il cane sono: *Streptococcus agalactiae*, β -emolitico, causa metriti e setticemie neonatali; *Streptococcus canis*, anch'esso β -emolitico e presente sulle mucose, causa metriti e vaginiti nella cagna e infezioni setticemiche nei cuccioli; *Streptococcus uberis*, α -emolitico, molto diffuso nell'ambiente, tipico del bovino, ma anche nella cagna può determinare vaginiti, metriti, aborti e ascessi.

Molte specie patogene in grado di colonizzare i vari distretti dell'organismo, possono anche non determinare alcun sintomo, e in quel caso l'animale è definito come portatore sano.



Il trattamento per gli streptococchi è rappresentato dalle penicilline e dalle betalattamine, ma in caso di ipersensibilità gli antibiotici di seconda scelta sono in genere i macrolidi e i lincosanidi.

Fig 11: *Streptococcus* spp. Notare gli aloni di emolisi completa attorno alle colonie.

1.6.8 Genere *ENTEROCOCCUS*

In passato i microrganismi del genere *Enterococcus* erano classificati tra gli streptococchi e presentano le stesse caratteristiche morfologiche e di crescita di questi ultimi. Al contrario degli streptococchi però, si preferisce utilizzare per la loro coltivazione l'agar sangue con l'aggiunta di esculina che impartisce alle colonie di enterococchi una colorazione bruno-nerastra. Possono essere inoltre usati terreni come l'agar bile-esculina, dove la sodioazide impedisce la crescita dei Gram-negativi, la bile inibisce altri Gram-positivi e l'esculina dà la colorazione nera alle colonie.

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, sono α -emolitici, normalmente presenti nell'intestino, nel cane possono determinare infezioni delle vie urinarie. Nella donna sono descritti casi di cistite per infezione del tratto urinario per via linfatica dall'intestino, e questo tipo di contaminazione non è da escludere nella cagna.

1.6.9 Genere *STAPHYLOCOCCUS*

Gli stafilococchi sono batteri coccoidi Gram-positivi e catalasi-positivi che nei terreni di coltura si trovano tipicamente a grappoli, di colore bianco in agar-sangue. Sono capaci di colonizzare la cute e le mucose di una gran varietà di animali; hanno un diametro di 0,5-1,5 μ m, sono aerobi facoltativi e immobili. Tendono ad ammassarsi in grappoli disordinati, anche se possono ritrovarsi singoli, a paia o in gruppi di quattro (Wilkinson BJ, 1997).

Gli stafilococchi sono molto diffusi in natura; alcuni sono saprofiti della cute, dell'intestino, delle mucose, fanno parte insomma della flora normale di uomo e animali; molti soggetti sono portatori asintomatici di specie patogene e possono costituire fonte di infezione per sé e per gli altri.

Gli stafilococchi sono inseriti tra i batteri asporigeni più resistenti: il calore, l'essiccamento e i comuni disinfettanti molto spesso non li danneggiano neppure.

La patogenicità viene determinata in base alla quantità di enzimi e tossine che riescono a produrre: molti di questi elementi sono caratteristici di *Staphylococcus aureus*, l'unico considerato patogeno puro; gli altri stafilococchi sono considerati patogeni opportunisti; è da sottolineare che nessuna delle sostanze prodotte da *S. aureus* è fondamentale per l'esplicarsi della sua azione patogena, e che i danni da esse provocati dipendono molto anche dallo stato immunitario dell'ospite.

Gli stafilococchi crescono nei comuni terreni di coltura, ma data la loro resistenza, si utilizzano terreni selettivi quali il Mannitol Salt Agar, che contiene come sostanza selettiva NaCl al 7,5%, oppure il terreno di Baird-Parker, usato per l'isolamento e l'identificazione di *S. aureus*. Nei comuni terreni *S. aureus* assume una colorazione che va dal giallo oro all'arancione, mentre gli altri stafilococchi possono assumere svariate colorazioni che vanno dall'arancione al grigiastro.

Tra le caratteristiche identificative vi sono la capacità di determinare emolisi in agar sangue e la positività alla prova della catalasi.

Nel cane e nel gatto, la più comune specie patogena è *Staphylococcus intermedius*, frequentemente isolata dai nostri tamponi vaginali, ma risultata patogena solo per individui particolarmente stressati o immunodepressi; spesso è stato isolato anche *S. aureus*, patogeno tipico dell'uomo, che nel cane assume un grado importante di virulenza.

Secondo alcuni autori è di comune riscontro soprattutto la forma meticillina-resistente di quest'ultimo (Patel, A., Lloyd, D. H., Lamport, A, 2002 e Duquette RA, Nuttall TJ, 2004). *Staphylococcus hyicus*, riconosciuto nella maggior parte dei casi come agente patogeno del suino, si riscontra occasionalmente nei piccoli animali (Saijonmaa-Koulumies, L.E., Lloyd, D. H., 1996). Le specie normalmente non considerate patogene, ma che possono svolgere un ruolo in questo senso, comprendono *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus schleiferi* ed *Staphylococcus felis*. È possibile che il ruolo di questi microrganismi sia stato sottostimato nel passato (Patel A., Lloyd, D. H., Lamport, A. I, 2002).

S. aureus nel cane causa spesso infezioni cutanee, ma può determinare anche setticemie neonatali.

S. intermedius è il principale contaminante della cute del cane, e benché gli animali siano comunemente portatori di stafilococchi patogeni, l'infezione cutanea è poco frequente essendo la cute integra particolarmente resistente. La contaminazione della cute è raramente causa di malattia, a meno che la cute stessa non sia danneggiata; in seguito ad

autotraumatismi *S. intermedius* può dare origine a impetigine, follicoliti, foruncolosi. È anche responsabile di otiti esterne, piometre, mastiti e infezioni localizzate (Lloyd H.D., 2007).



Fig 12: *Staphylococcus spp.*

Sia *S. aureus* che *S. intermedius* sviluppano facilmente antibioticoresistenza e resistenze crociate: negli ultimi anni notevole è la loro sensibilità alla vancomicina, alla teicoplanina e alla netilmicina.

1.6.10 Genere *BACILLUS*

Il genere *Bacillus* comprende batteri Gram-positivi, di forma bastoncellare, di dimensioni pari a 0,5-2,5x1,2-10µm, sporigeni, aerobi obbligati o facoltativi, in alcuni casi mobili; formano spore ovali o rotonde in posizione centrale o terminale dello sporangio (corpo batterico). La maggior parte delle specie di *Bacillus* è ubiquitaria; alcune specie fanno parte della normale flora intestinale di uomo e animali; le spore formate sono altamente resistenti al calore, ai comuni disinfettanti, e all'essiccamento per lunghi periodi; crescono facilmente in comuni terreni di coltura come l'agar nutritivo.

Il ritrovamento di *Bacillus* nei tamponi vaginali è da interpretare come una contaminazione del campione, o come una infezione secondaria se le colonie sviluppatasi nella piastra sono in purezza; un ruolo patogeno lo svolge soprattutto nella bovina, dove *Bacillus cereus* determina mastite.

I Bacilli sono sensibili alle tetracicline, al cloramfenicolo, ai macrolidi e spesso ai sulfamidici.

1.6.11 Genere *CAMPYLOBACTER*

Le specie appartenenti al genere *Campylobacter* (dal greco *campulos* : bastone ricurvo e *bacterion*: bastoncino) sono rappresentate da bacilli ricurvi, di dimensioni 0,2-0,5 x 0,5-5µm, microaerofili (vivono con scarsa presenza di ossigeno), mobili grazie alla presenza di un

singolo flagello e che possono unirsi, formando alle volte lunghe spirali. La loro distribuzione è mondiale, molti sono saprofiti delle mucose orali e intestinali.

Sono microrganismi che crescono in terreni nutritivi di base, addizionati con sangue, sotto bassa tensione di ossigeno e in presenza del 3-10% di CO₂, incubati alla temperatura di 37° C per 4-6 giorni; l'aggiunta di ferro o piruvato di sodio al terreno aumenta la tolleranza di questi microrganismi all'ossigeno; il terreno può venir addizionato di antibiotici per eliminare la flora contaminante. Proprio per la particolare procedura, tali batteri non sono stati isolati dai nostri tamponi vaginali;

il loro ritrovamento generalmente può esser interpretato in diversi modi: in animali sani assumono il ruolo di contaminanti, in animali debilitati o sottoposti a lunghe terapie antibiotiche invece assumono il ruolo di patogeni, soprattutto se la loro carica è alta.



Di solito rispondono in vari modi al trattamento con Cefalotina o Acido Nalidixico, mentre sono resistenti a penicillina e ampicillina. La principale specie patogena nel cane è il *C. jejuni*, che però determina enterite e diarrea più che problemi all'apparato genitale.

Fig 13: *Campylobacter* in agar-sangue coltivato in anaerobiosi

1.6.12 Genere *MYCOPLASMA*

I micoplasmi sono i più piccoli microrganismi viventi capaci di vita indipendente non parassita.; hanno perso la capacità di formare la parete e ciò li rende estremamente plastici e pleomorfi, permettendo loro di assumere le più svariate forme: coccica, a spirale, ad anello, filamentosa. L'assenza della parete non permette a questi batteri di trattenere i coloranti, per cui non sono osservabili al microscopio ottico, ma solo a quello elettronico.

Sono comunque circondati da una membrana plasmatica composta da glicoproteine, glicolipidi e fosfolipidi; sono microrganismi a crescita extracellulare, producono diversi tipi di sostanze come emolisine, proteasi, nucleasi, e fattori tossici, che, soprattutto in caso di infezione cronica, determinano morte delle cellule a cui sono adesi (*Quinn PJ, 1994*).

I micoplasmi hanno diffusione mondiale come saprofiti; sia le specie patogene che non patogene si ritrovano come commensali delle mucose del tratto respiratorio superiore, intestinale e genitale; al di fuori dell'ospite le specie possono sopravvivere alcuni giorni in microambienti al riparo dalla luce solare. L'infezione avviene per via respiratoria, venerea e verticale.

Il primo isolamento di *Mycoplasma* spp. dal tratto genitale canino è riportato nel 1951. Studi successivi hanno dimostrato che esso è un comune saprofito del tratto genitale inferiore sia del cane che della cagna; l'inoculazione sperimentale di *Mycoplasma canis* nel dotto deferente o nell'utero causa rispettivamente orchite o epididimite, ed endometrite purulenta; sono state isolate circa 12 specie, ma nonostante i numerosi sforzi, il ruolo dei micoplasmi nella patologia dell'apparato riproduttore non è ancora stato ben chiarito (Doig PA et al., 1981).

I micoplasmi sono chiamati anche P.P.L.O. (pleuropneumonia like organisms), perché scoperti come agente infettivo della pleuropneumonia contagiosa nel bovino. La loro tassonomia è basata essenzialmente sulla richiesta di steroli per la crescita (le *Mycoplasmataceae* e *Spiroplasmataceae* richiedono colesterolo, mentre le *Acholeplasmataceae* no), e su altri caratteri morfologici e biomolecolari. La maggior parte di questi microrganismi è di tipo anaerobio facoltativo o microaerofilo, solo il genere *Anaeroplasma* è costituito da batteri anaerobi stretti; sono spesso isolati dalle mucose, dalla congiuntiva, dal tratto respiratorio, dal tratto genitale della femmina e dalla prostata o dall'epididimo del maschio; possono anche essere isolati dal tratto urinario o da ascessi (Brown RM, 2007); la loro crescita è piuttosto lenta e avviene su terreno PPLO agar, selettivo per i micoplasmi.

Le colonie di *Mycoplasma* hanno dimensioni di 0,1-0,6mm e all'osservazione allo stereomicroscopio, assumono il caratteristico aspetto a "uovo fritto".

Fig 14 : crescita in coltura di una colonia di *Mycoplasma* (gialla); il *Mycoplasma* cresce nell'agar PPLO (grigio) anche in profondità.



Il trattamento d'elezione per i micoplasmi è rappresentato dai Fluorochinoloni, che però non è possibile utilizzare nella femmina in gravidanza per gli effetti teratogeni sui feti.



Fig 15: micoplasmi visti allo stereomicroscopio.

Tab 10: Utilizzo di antibiotici sistemici contro i principali patogeni ritrovati nelle vie genitali (Watson, A.D.J., Maddison J.E. and Elliott J., 1998).

Gruppi di antibiotici	Antibiotici individuali	Aerobi e anaerobi facoltativi			anaerobi obbligati	Altri
		Staphylococchi che producono β lattamasi	Altri Gram-positivi	Gram-Negativi		
Penicilline	Amoxicillina, ampicillina	-----	X	X	X	
<i>Battericidi</i>	Amoxicillina ac. clavulanico	X	X	X	X	
	Carbenicillina	-----	-----	X	-----	
	Cloxacillina, flucloxacillina, oxacillina	X	-----	-----	X variabile	
	Penicillina G (benzylpenicillina)	-----	X	-----	X	
	Ticarcillina, Ticarcillina-clavulanato	-----	-----	X	X	
Cephalosporine						

Cephamycina battericida	Per os:cephalosporine Cefadroxil, cephalexina	X	X	X	X	imprevedibile
	Parenterali: I gen.: cefazolina	X	X	X	X	
	II gen.: ceftiofur	X	X	X	X	
	III gen.: cefoperazone	X	X	X	X	
	IV gen.: cefoxitina	X	X	X	X	
Aminoglicosidi battericidi	Gentamicina, (dihydro)streptomycina kanamycina, spectinomycina, tobramycina, amikacina	X (insorge resistenza durante il trattamento)	-----	X	-----	

Gruppi di antibiotici	Antibiotici individuali	Aerobi e anaerobi facoltativi	Anaerobi obbligati	Altri		
Fluorochinoloni battericidi	Ciprofloxacina, enrofloxacina, marbofloxacina, norfloxacina, etc	X	X	X	----- --	Micobatteri, <i>Brucella</i> , <i>Mycoplasma</i> , <i>Chlamydia</i> , <i>Rickettsia</i>
Macrolidi batteriostatici	Erythromycina, spiramycina, tylosina	X resistenza	X	----- -	X	<i>Mycoplasma</i>

		variabile				
Tetracycline <i>batteriostatiche</i>	Doxyciclina, ossitetraciclina etc.	X	X	X	X	<i>Mycoplasma,</i> <i>Rickettsia,</i> <i>Chlamydia,</i> <i>Borrelia,</i> <i>Haemabartonella</i>
Polymyxine <i>battericidi</i>	Colistina (polymyxina E), polymyxina B	-----	-----	X	----- --	

La differenziazione tra battericidi e batteriostatici è basata sull'attività in vitro; la distinzione non è assoluta e può variare a seconda della concentrazione dell'antibiotico e della specie batterica.

2.OBIETTIVI

L'infertilità delle femmine, gli aborti o la mortalità neonatale determinano per gli allevatori perdite sul piano economico e scarsa valorizzazione dei loro riproduttori: il buon nome e l'immagine dell'allevamento dipendono non solo dalle caratteristiche fisiche e caratteriali degli animali che da esso provengono ma anche dalla capacità dell'allevatore di ottenere dalle sue femmine cucciolate numerose e vitali.

Ridurre le perdite economiche derivanti da mancati concepimenti o dalla morte dei cuccioli permetterà all'allevatore accorto, di ottimizzare i ricavi ed eventualmente investire in altri settori dell'allevamento.

Scopo di questo studio è stata l'analisi delle possibili cause di infertilità o di risultati riproduttivi insoddisfacenti, attraverso un esame delle caratteristiche degli allevamenti e delle procedure messe in atto dagli allevatori. Inoltre, si è voluto valutare se la presenza di particolari batteri nella vagina e nel latte materno 10 giorni prima del parto fosse correlabile alle performances riproduttive.

3 MATERIALI E METODI

3.1 Rilevazione dei dati

Per la nostra valutazione abbiamo preso in esame 21 cagne a circa 10-15 giorni dal parto, messe a disposizione da 5 allevatori veneti: Per la raccolta dei dati ci siamo avvalsi della collaborazione dei proprietari, e abbiamo compilato per ogni femmina una scheda contenente informazioni generali sullo stato di salute e sulla vita riproduttiva.

3.1.1 Schede di valutazione

Informazioni generali	Proprietario:..... Indirizzo:..... Tel.:.....
-----------------------	--

Segnalamento	-nome: -razza:..... -età:
Stato di salute	-sono presenti patologie sistemiche? SI NO Se si, quali:..... -sono presenti patologie ormonali? SI NO Se si, quali:

	<p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>- data della monta o dell' IA:.....</p> <p>- parto previsto per:.....</p>
<p>Management dell'allevamento</p>	<p>- vaccinazioni:.....</p> <p>- trattamenti antelmintici:</p> <p>- esente da herpesvirus SI NO</p> <p>- tipo di alimentazione:.....</p> <p>viene variata prima o dopo il parto?.....</p> <p>.....</p> <p>-tipo di ricovero degli animali:.....</p> <p>-la zona dei parti è separata dal resto dell' allevamento?.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p> <p>.....</p>

3.1.1.1 Informazioni generali

In questa sezione è stato riportato il nominativo dell' allevatore o del proprietario dell' animale, il domicilio e un recapito telefonico per poter contattarlo per dare informazioni sugli esiti degli accertamenti o per aver informazioni sull' andamento dei parti.

3.1.1.2 Segnalamento

Nella seconda sezione sono stati riportati i dati della femmina.

3.1.1.3 Stato di salute

Nella terza sezione è stato riportato brevemente lo stato di salute dell' animale, prestando attenzione al fatto che il soggetto fosse o meno sottoposto a trattamenti farmacologici di qualsiasi tipo.

3.1.1.4 Anamnesi riproduttiva

Lo scopo di questa sezione è dare un' immagine complessiva della vita riproduttiva dell' animale e, nel caso di pluripare, prestando attenzione all' andamento dei parti precedenti e allo stato delle cucciolate.

3.1.1.5 Management dell'allevamento

Questa sezione comprende informazioni generali sull'allevamento o, nel caso di privati, sulla gestione dell' animale, trattando dello stato delle vaccinazioni, dei trattamenti antielmintici, il tipo di alimentazione e la presenza o meno dell'herpes virus canino all'interno dell'allevamento.

3.1.2 L' intervallo di tempo

Abbiamo scelto di effettuare il campionamento a dieci giorni circa dal parto. Questo intervallo di tempo ci ha permesso di ottenere non solo una quantificazione dei batteri presenti sulla base della loro crescita in coltura, ma anche la loro tipizzazione con isolamenti in terreni selettivi o con metodiche biochimiche, ed infine un antibiogramma che ha dato una fondamentale indicazione sull'antibiotico da usare per trattare femmine con cariche batteriche importanti o trattare cuccioli poco vitali con sospetta batteriemia in atto. Inoltre, considerato che Mycoplasma impiega circa 7 giorni a crescere in un terreno selettivo, tale intervallo di

tempo ci è stato necessario per verificare se la femmina era positiva o meno a tale microrganismo.

3.2 Il prelievo dei campioni vaginali per il batteriologico

Per effettuare la valutazione dei batteri presenti nella vagina della cagna pre-parto abbiamo utilizzato dei comuni tamponi sterili da esame batteriologico dotati di terreno di trasporto neutro, di tipo Amies, composto da una soluzione salina tamponata in forma di gel, dove mancano carbonio e fattori di crescita: questo tipo di terreno, come gli altri terreni di trasporto, garantisce la vitalità di tutti i microrganismi presenti, pur impedendo la loro replicazione durante il trasporto in laboratorio di analisi, e quindi impedendo l'alterazione delle loro concentrazioni;

prima di inserire ogni tampone abbiamo disinfettato la vulva con due-tre passaggi di disinfettante iodio-iodurato, tipo Betadine, intervallati da due-tre passaggi di alcool; per evitare che il tampone venisse contaminato da eventuali batteri presenti nella parte più caudale del canale vaginale abbiamo ricavato una guida tagliando le estremità di un portatampone sterile, e prima di inserire il tampone in vagina, abbiamo delicatamente inserito la guida(nelle femmine di piccola taglia questo non è possibile, quindi va posta ancor maggiore attenzione nella disinfezione esterna).

Il tampone va inserito con un'inclinazione di circa 60°, mantenendolo spostato verso la parete dorsale del canale vaginale per evitare che si incunei all'interno del meato urinario, e quando circa la metà si trova all'interno del canale vaginale(in dipendenza della dimensione della femmina), va spostato quasi parallelo al suolo, sempre spingendolo delicatamente in direzione craniale: la resistenza che ad un certo punto si incontra indica che la testa cotonata sta toccando la volta della vagina;

a questo punto il tampone va ruotato e delicatamente estratto, nonché immerso nel terreno di coltura, refrigerato ed inviato al più presto al laboratorio.



Fig 16: Tamponi sterili con terreno di trasporto Amies

3.3 Prelievo dei campioni per la ricerca di *Mycoplasma*.

Il prelievo del campione per l'isolamento di Mycoplasma viene effettuato con la stessa metodica descritta sopra, ma con un tampone diverso: abbiamo utilizzato dei tamponi sterili a secco, imbevuti di soluzione fisiologica sterile appena prima dell'inserimento all'interno della vagina; il vantaggio di utilizzare un tampone imbevuto di liquido si ha nel momento della lettura della piastra di semina: mentre un terreno di trasporto gelatinoso com'è l'Amies ostacola la visualizzazione delle colonie di Mycoplasma, il liquido non altera la superficie liscia del terreno di coltura, permettendo di visualizzare le tipiche colonie a "uovo fritto" prodotte.

Abbiamo effettuato il tampone per Mycoplasma dopo aver effettuato il batteriologico per evitare che il liquido di cui il tampone è imbevuto alterasse le concentrazioni dei batteri presenti. Tale tampone va subito refrigerato e seminato nel terreno apposito entro le 24 ore successive: la struttura fisica di Mycoplasma lo rende un microrganismo particolarmente labile, e quindi, prima si effettua la semina, maggiori sono le probabilità di isolarlo.



Fig 17: tampone per mycoplasma con fisiologica sterile

3.4 Prelievo dei campioni di latte pre e post parto.

Il prelievo di latte viene effettuato utilizzando o tamponi sterili con terreno di trasporto, tipo Amies, o con un portalatte sterile, a seconda della quantità di liquido prelevabile: se il latte si riduce a poche gocce, come accade con il colostro pre parto, è preferibile utilizzare il tampone con terreno di trasporto per evitare che l'essiccamento del campione causi la morte dei batteri presenti.

Abbiamo effettuato la disinfezione della mammella con tre passaggi di disinfettante iodio-iodurato intervallati da tre passaggi di alcool, e, partendo dall'estremità prossimale, abbiamo effettuato una delicata e continua pressione sulla mammella in direzione prossimo-distale per determinarne la mungitura: il tampone non va appoggiato al capezzolo, ma le gocce di latte vanno fatte cadere sul tampone, per ridurre al minimo le contaminazioni batteriche derivanti dalla cute.

Dopo il prelievo il tampone va refrigerato e inviato al laboratorio.



Fig 18: capezzolo di Boxer con goccia di latte

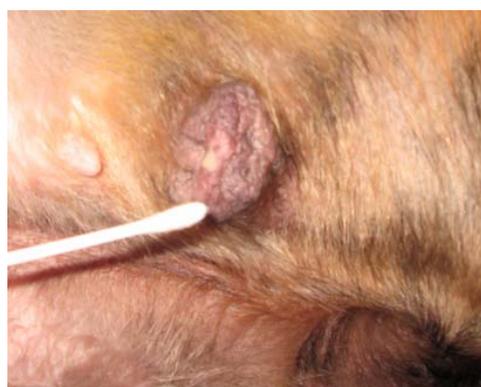


Fig 19: tampone in prossimità del capezzolo

3.5 Preparazione del terreno selettivo per *Mycoplasma*

Nel nostro studio abbiamo utilizzato un terreno selettivo per mycoplasma, il PPLO's o terreno "MYCOPLASMA AGAR BASE" contenente:

peptone batteriologico 10.0g/L

estratto di carne 10.0g/L

sodio cloruro 5.0g/L

supplemento minerale 0.5g/L

agar 10.0g/L

Questi ingredienti sono selezionati come esenti da sostanze tossiche o inibenti la crescita dei mycoplasmi; il supplemento minerale migliora la crescita delle colonie mantenendo il terreno trasparente per la lettura al microscopio; l' agar viene arricchito anche con siero di cavallo, senza il quale non vi è crescita dei microrganismi; infine vengono aggiunti agenti antibatterici per evitare che la lenta crescita dei mycoplasmi venga sopraffatta dalla crescita più rigogliosa di microrganismi contaminanti: nel nostro caso il terreno è addizionato con penicillina (50/500 unità per ml) e acetato di tallio (1/2000 e 1/8000). Abbiamo preparato il terreno a partire da un composto granulare in commercio, il quale va diluito in acqua sterile tiepida, mescolato fino allo scioglimento dei granuli e suddiviso nelle piastre Petri, ottenendo uno spessore di circa un centimetro; una volta raffreddato il terreno assume una consistenza gelatinosa; se non viene utilizzato subito, va conservato ad una temperatura di 2-8° C.

3.6 Semina dei tamponi

Per poter identificare, caratterizzare e classificare un microrganismo, questo deve essere isolato e fatto moltiplicare in colonie singole, in modo da avere la presenza identificabile delle diverse specie presenti nel campione. Per questa finalità è indispensabile seminare il materiale su agar-sangue, in modo tale da ottenere la separazione dei singoli elementi batterici uno dall' altro, cosicché questi, moltiplicandosi durante l' incubazione in termostato, possano dare origine a singole colonie isolate. La tecnica di semina più usata a tale scopo è quella che prevede la distribuzione del campione, per strisciamento, in un solo quadrante della piastra contenente il terreno; successivamente si distribuisce una parte del materiale dal primo al secondo quadrante, dopo aver cambiato l' ancia sterile: si continua con questa tecnica in modo da distribuire il materiale sui quattro quadranti.

Per identificare i microrganismi presenti è necessario effettuare la semina anche su un terreno selettivo per i batteri Gram-negativi, in particolare le Enterobacteriaceae, chiamato Mac Conkey-agar; nel caso in cui nelle piastre non cresca nulla, per isolare batteri in piccolissima quantità è necessario seminare il campione anche in un brodo colturale che permette di evidenziare il moltiplicarsi anche del singolo microrganismo.

Il tampone per la ricerca di Mycoplasma viene anch' esso seminato con la tecnica dei quattro quadranti nel terreno PPLO sopra descritto, ma incubato in modo diverso.



Fig 20: semina per quadranti su Mac Conkey-agar



Fig 21: semina su agar-sangue



Fig 22: inserimento del campione nel brodo culturale.

3.7 Tecnica di autopsia di un cucciolo

I cuccioli usati per le nostre autopsie sono in parte freschi, in parte congelati. Il congelamento altera le concentrazioni batteriche, determinando la morte di alcuni microrganismi, ma generalmente porre i campioni derivanti da organi scongelati in brodi di arricchimento favorisce la ripresa della moltiplicazione dei batteri rimasti.

Il cadavere va prima di tutto valutato esternamente per notare la presenza di ematomi, anomalie della struttura corporea, ferite...va poi scuoiato per valutare se nel sottocute siano o meno presenti soffiusioni emorragiche.

Con cura va aperta la cavità addominale, e va evidenziata la presenza di ascite o spandimento emorragico nel peritoneo, vanno estratti gli organi per notarne aumenti di volume, congestione, anomalie di forma, estratti e aperti stomaco e intestino per veder se il cucciolo nell' ante mortem ha mangiato; va successivamente aperta la cavità toracica per evidenziare lo stato dei polmoni e del cuore, e anche da questa vanno estratti cuore e polmoni; su un piccolo pezzo di polmone viene effettuata la prova docimasica per capire se il cucciolo sia nato vivo o morto; i prelievi vengono effettuati da tutti gli organi parenchimatosi previa cauterizzazione della superficie esterna dell' organo con termocauterio al fine di eliminare eventuali

contaminanti venuti in contatto con il cadavere in corso di autopsia, nonché dallo stomaco e dal cervello.

I campioni vengono seminati sia in agar- sangue che in agar- Mac Conkey e in brodo colturale e seguono le stesse linee identificative di una comune valutazione batteriologica.



Fig 23: cucciolo scuoiato



Fig 24: apertura della cavità addominale e toracica



Fig 25: fegato congesto



Fig 26: milza



Fig 27: cuore e polmoni congesti



Fig 29: apertura del cranio



Fig 30: prelievo di campioni dopo cauterizzazione degli organi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie SCT3 Struttura complessa territoriale di Padova e Rovigo Direttore Dr. Luciano Iob Laboratorio Diagnostica Clinica Viale dell'Università, 10 - 35020 LEGNARO (PD) Tel. 049-8084290 Fax 049-8830277				
 RAPPORTO DI PROVA 07DIA-PD/4292		RICEVIMENTO DEL 07/11/2007 NUMERO 07DIA-PD/4292		
RICHIEDENTE UNIVERSITA' STUDI TORINO - DIP. PATOLOGIA ANIMALE VIA LEONARDO DA VINCI, 44 10095 GRUGLIASCO (TO)		VERBALIZZANTE ROTA ADA Verbale invito campioni n. del 07/11/2007		DESTINATARIO UNIVERSITA' STUDI TORINO - DIP. PATOLOGIA ANIMALE VIA LEONARDO DA VINCI, 44 10095 GRUGLIASCO (TO)
Proprietario PASCIN GIANNI VIA BOTTE, 36 30032 FIESSO D'ARTICO (VE)		Origine campioni MILANI CHIARA VIALE DELL'UNIVERSITA', 12 35020 LEGNARO (PD)		Luogo prelievo MILANI CHIARA VIALE DELL'UNIVERSITA', 12 35020 LEGNARO (PD)
RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE				
Analisi Metodica	Analisi Data inizio Data fine	Materiale Specie Causale Invio	Campione / Identificazione	Esito
- ESAME AUTOPTICO/NEGROSCOPICO/VA PATOLOGICO - ESAME AUTOPTICO/ANATOMOPATOLOGICO /	08/11/2007 08/11/2007	- CARCASSA - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA / RICERCA	2- 3- 4-	EFFETTUATO ESAME AUTOPTICO/ANATOMOPATOLOGICO O EFFETTUATO ESAME AUTOPTICO/ANATOMOPATOLOGICO O EFFETTUATO ESAME AUTOPTICO/ANATOMOPATOLOGICO O
- HERPESVIRUS CANE - POLYMERASE CHAIN REACTION / - eseguito da Lab. Virologia / 07RS/1863	12/11/2007 14/11/2007	- ORGANO - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA / RICERCA - Numero campioni: 1		Campioni (n. 1) esito: NEGATIVO
- ESAME BATTERIOLOGICO - METODICA MICROBIOLOGICA /	08/11/2007 09/11/2007	- FEGATO - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA / RICERCA - Numero campioni: 2	6-1 7-2	POSITIVO da indiretta ENTEROCOCCUS SPP. POSITIVO STAPHYLOCOCCUS COAG. NEG. POSITIVO Alta carica STAPHYLOCOCCUS COAG. NEG.
- ESAME BATTERIOLOGICO - METODICA MICROBIOLOGICA /	08/11/2007 09/11/2007	- CERVELLO - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA / RICERCA - Numero campioni: 2	8-1	POSITIVO da indiretta ENTEROCOCCUS SPP. POSITIVO STAPHYLOCOCCUS COAG. NEG. Altri campioni (n. 1) esito: NEGATIVO
- ESAME BATTERIOLOGICO - METODICA MICROBIOLOGICA /	08/11/2007 09/11/2007	- MILZA - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA / RICERCA - Numero campioni: 2	10-1 11-2	POSITIVO da indiretta ENTEROCOCCUS SPP. POSITIVO da indiretta ENTEROCOCCUS SPP. POSITIVO da indiretta STAPHYLOCOCCUS COAG. NEG.
- ESAME BATTERIOLOGICO - METODICA MICROBIOLOGICA /	08/11/2007 09/11/2007	- STOMACO - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA / RICERCA - Numero campioni: 2	13-2	POSITIVO bassissima carica STAPHYLOCOCCUS COAG. NEG. G. Altri campioni (n. 1) esito: NEGATIVO
- ESAME BATTERIOLOGICO - METODICA MICROBIOLOGICA /	08/11/2007	- POLMONE - CANE	15-2	POSITIVO da indiretta ENTEROCOCCUS SPP. POSITIVO bassissima carica STAPHYLOCOCCUS COAG. NEG.

Fig 31: referto di autopsia di cucciolo

3.8 Lettura delle piastre

Nelle situazioni più comuni, quando si seminano i patogeni nelle piastre di agar-sangue secondo la tecnica descritta, si osservano numerose colonie, diverse per forma, dimensione e colore che rappresentano la flora microbica presente sul tampone: si tratta in genere di un insieme di patogeni, contaminanti e costituenti la flora microbica del soggetto. Confrontare l' agar-sangue con l' agar Mac Conkey ci permette già di effettuare una prima ipotesi sul genere di microrganismi che ci troviamo di fronte: se la crescita è avvenuta in entrambi i terreni, essendo il Mac Conkey selettivo per le Enterobacteriaceae, probabilmente avremo di fronte dei Gram-negativi; se invece nel Mac Conkey non è avvenuta crescita, o si tratta di microrganismi Gram-positivi, o si tratta di Gram-negativi non appartenenti alle Enterobacteriaceae, come le Pasteurelle.



Fig 32: coltura su piastra di agar-sangue



Fig 33: coltura su Agar-Mac Conkey

Questo tipo di scrematura iniziale non è sempre possibile, pertanto, dopo il primo isolamento è necessario eseguire delle sub-colture a partire da quelle colonie che più sono rappresentate.

Per ottenere le colture pure si toccano con l'ancia sterile le superfici di singole colonie e si riseminano in una nuova piastra di agar-sangue, sempre secondo la tecnica di strisciamento per quadranti; dopo l'incubazione di circa 24 ore si avrà una coltura pura, cioè la crescita di colonie tutte identiche, costituite da un singolo tipo di batterio. Tale coltura pura viene poi utilizzata per definire le caratteristiche morfologiche, biochimiche, immunologiche e patogeniche del batterio e per eseguire l'antibiogramma.

Del batterio di cui si cerca di capire il genere di appartenenza si osservano le caratteristiche morfologico-culturali delle singole colonie (dimensione, forma, pigmentazione, consistenza, odore): queste osservazioni forniscono alcune iniziali ed importanti indicazioni che ci indirizzano nell'identificazione; si prosegue con la colorazione di Gram, la quale oltre a discriminare batteri Gram-positivi da Gram-negativi sulla base della presenza o dell'assenza della parete batterica, ci permette di effettuare al microscopio l'esame morfologico dei corpi batterici, in modo da definire la forma (coccoide, bastoncellare o spirillare), le dimensioni, il tipo di agglomerati batterici (ammassi, grappoli, catenelle,..) e rilevare strutture particolari come flagelli, endospore, capsula.

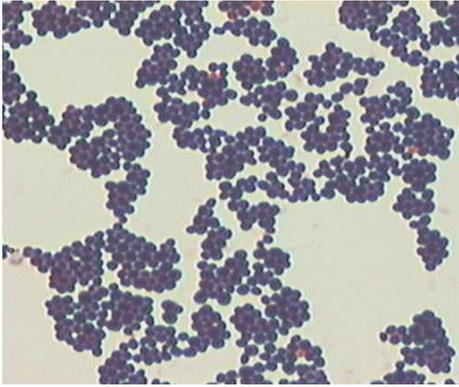


Fig 34: Batteri coccoidi Gram-positivi

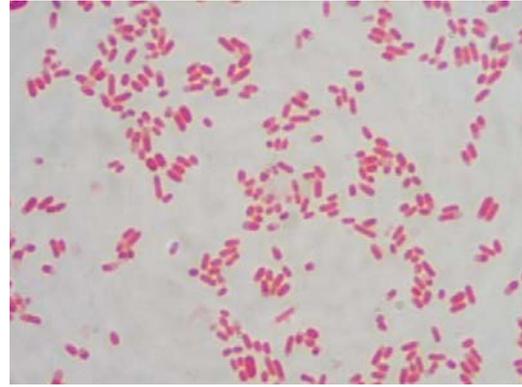


Fig 35: Batteri bastoncellari Gram-negativi

Queste prime valutazioni indirizzano per le successive: si effettueranno ulteriori accertamenti differenti a seconda che si tratti di un Gram-positivo o di un Gram-negativo, oppure che il batterio in esame sia coccoide o bastoncellare. Le prove più comuni usate per i batteri Gram-positivi sono:

la prova della catalasi che consente di svelare la presenza di tale enzima, definendo il tipo respiratorio del batterio; essa consiste nel prelevare una colonia con un'ancia e stemperarla su un vetrino in una goccia di perossido di idrogeno al 3%: la formazione di bollicine entro pochi secondi, e quindi di ossigeno indica la positività della reazione; questo ci permette di distinguere ad esempio le colonie di staphilococchi, catalasi-positivi, dalle colonie di streptococchi, catalasi-negativi;

la prova della coagulasi: una colonia viene stemperata in una provetta con del siero di coniglio, se avviene la coagulazione del liquido la prova va considerata positiva;



Fig 36: prova della catalasi positiva

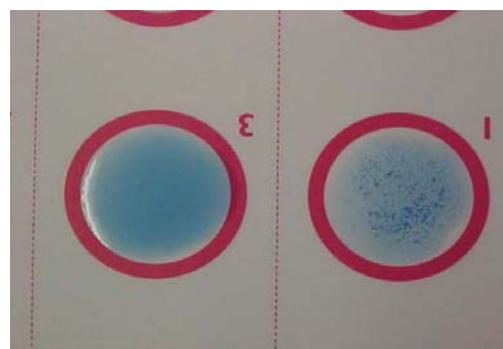


Fig 37: prova della coagulasi (positiva a dx)

Per i batteri Gram-negativi esistono altre prove di identificazione biochimica:

la SIM (produzione di composti Solforati/ Indolo/ Mobilità) dove il campione viene seminato in un terreno contenuto in provetta; se produce Indolo si formerà uno strato liquido rosa-

fluxia al di sopra del terreno; se produce H₂S il terreno virerà al nero; se il microrganismo è mobile diffonderà in tutto il terreno, altrimenti crescerà solo lungo la linea di infissione dell'ancia di semina;

i Gram-negativi vengono anche seminati in terreni ricchi di urea, e se si tratta di produttori di ureasi il terreno virerà al giallo intenso; infine ponendo il microrganismo in un terreno ricco di glucosio e lattosio si potrà discriminare se si tratta di un lattosio-fermentante, glucosio-fermentante in base alla colorazione che assume il terreno, o un produttore di gas se si formeranno o meno bolle all'interno del terreno.

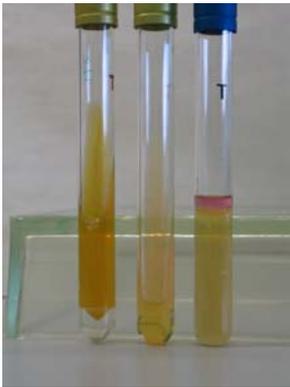


Fig 38: da sn a dx: prova della fermentazione di glucosio/lattosio; ricerca dell' ureasi; test dell' indolo.

Nel caso in cui, dopo tali prove biochimiche vi siano ancora dubbi riguardo il batterio in esame, è possibile effettuare un ulteriore approfondimento usando dei kit disponibili in commercio, costituiti da decine di terreni diversi e opportuni indicatori cromogeni, mantenuti separati in celledette di plastica: attraverso questi kit è possibile rilevare contemporaneamente le capacità del batterio di metabolizzare o meno diversi tipi di zuccheri, di produrre acidi o gas, di liquefare gelatina, di utilizzare citrati, di ridurre nitrati, di decarbossilare alcuni aminoacidi, di produrre idrogeno solforato, e così via. ,e questo ci permette di identificare le varie specie di enterobacteriaceae, streptococchi, staphilococchi, gram-positivi e lieviti.



Fig 39: test API per *Escherichia coli*

Esempi di metodiche immunologiche per l'identificazione dei batteri sono rappresentati dai test ELISA, che però sono specifici per un singolo microrganismo, oppure dall'agglutinazione rapida su vetrino: una colonia viene stemperata in una goccia di antisiero, o di anticorpo monoclonale, specifico per il batterio sospettato, posta su un vetrino, e se l'anticorpo reagisce contro il batterio ne provoca l'agglutinazione entro pochi minuti, la quale è visibile ad occhio nudo.

3.9 L'antibiogramma

Una volta che i batteri preponderanti nella coltura di partenza sono stati isolati e tipizzati, su essi viene effettuato l'antibiogramma, per poter instaurare una terapia adeguata in situazioni di elevate cariche batteriche vaginali, o quando si sospetti una batteriemia in neonati poco vitali. L'antibiogramma viene effettuato per aver indicazioni precise sulla terapia da seguire, senza incorrere in problematiche di antibiotico-resistenza. L'uso degli agenti antimicrobici promuove lo sviluppo di resistenza fra i microrganismi che vengono esposti a questi farmaci, sia che si tratti di patogeni infettanti che di componenti della flora normale. La velocità con cui tale resistenza si sviluppa dipende dalla densità di selezione (la quantità di antimicrobico utilizzata per individuo in una definita area geografica) (*Levy, S. B., 1997*). La stretta prossimità degli animali da compagnia con i loro proprietari offre le opportunità per uno scambio di microrganismi e di fattori che determinano la resistenza fra queste popolazioni (*Guardabassi et al., 2004*).

La determinazione della sensibilità del o dei microrganismi isolati ai diversi farmaci antimicrobici per poter instaurare una terapia adeguata è la finalità principale di un esame batteriologico.

L'antibiogramma viene effettuato secondo la tecnica Kirby-Bauer, che si basa sulla deposizione di un certo numero di dischetti in cellulosa, impregnati di quantità note di antibatterici, in una piastra di Petri contenente agar-base oppure, nel caso siano stati isolati batteri particolarmente esigenti, agar-sangue.



Fig 40: antibiogramma in agar-base (metodo Kirby-Bauer)

Durante il periodo di incubazione i chemioantibiotici diffondono dai dischetti al terreno circostante e, se efficaci, inibiscono la replicazione batterica in un' area tanto più grande quanto maggiore è la loro attività. Si osserva così la comparsa di aloni di inibizione di crescita attorno al dischetto antibiotato, il cui diametro è proporzionale all'attività antibatterica dell' antibiotico contenuto. L'assenza di aloni di inibizione indica invece l'inefficacia del farmaco. In base ai risultati dell' antibiogramma, il batterio in esame verrà definito *sensibile*, *intermedio* o *resistente*. Per ottenere risultati attendibili la tecnica viene standardizzata (quantità di batteri seminati, tipo di terreno, scelta degli antibiotici e loro concentrazione nei dischetti, condizione di incubazione della piastra) e la preparazione di questo tipo di piastre è del tutto meccanizzata.

Sulla base dell'antibiogramma abbiamo consigliato gli allevatori sugli antibiotici da utilizzare nelle fattrici: l'antibiotico è stato somministrato a 5-3 giorni dal parto se nel tampone vaginale o di latte pre parto sono state rilevate alte cariche batteriche.

Si è deciso invece di non trattare la cagne positive a *Mycoplasma* perchè i fluorochinoloni, antibiotici specifici per i batteri privi di parete, determinano elevato rischio di aborto nelle cagne gravide o effetti teratogeni nelle cucciolate.

I batteriologici e le necrosapie dei cuccioli sono stati effettuati presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Legnaro(Pd), mentre la ricerca di *Mycoplasma* è stata effettuata presso il laboratorio di microbiologia della facoltà di Medicina Veterinaria di Padova.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie SCT3 Struttura complessa territoriale di Padova e Rovigo Direttore Dr. Luciano Iob Laboratorio Diagnostica Clinica Viale dell'Università, 10 - 35020 LEGNARO (PD) Tel. 049-8084290 Fax 049-8830277				
 RAPPORTO DI PROVA 07DIA-PD/4613		RICEVIMENTO DEL 28/11/2007		
RICHIEDENTE UNIVERSITA' STUDI TORINO - DIP. PATOLOGIA ANIMALE VIA LEONARDO DA VINCI, 44 10095 GRUGLIASCO (TO)		VERBALIZZANTE ROTA ADA Verbale invio campioni n.		DESTINATARIO UNIVERSITA' STUDI TORINO - DIP. PATOLOGIA ANIMALE VIA LEONARDO DA VINCI, 44 10095 GRUGLIASCO (TO)
Proprietario PAGGIN GIANNI VIA BOTTE, 36 30032 FIESSO D'ARTICO (VE)		Origine campioni PAGGIN GIANNI VIA BOTTE, 36 30032 FIESSO D'ARTICO (VE)		Luogo prelievo MILANI CHIARA VIALE DELL'UNIVERSITA', 12 35020 LEGNARO (PD)
RISULTATI DELLE PROVE ESEGUITE				
N. campione / U.C. - Materiale Specie	Identificazione	Analisi Metodica	Data inizio analisi Data fine analisi	Esito
- 1. TAMPONE - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA - RICERCA / n. aliquote: 1		- ESAME BATTERIOLOGICO - METODICA MICROBIOLOGICA /	28/11/2007	
			04/12/2007	POSITIVO da esame indiretto
- 2. CEPPO BATTERICO - CANE - RICERCA, RING TEST, CENTRI DI REFERENZA - RICERCA / n. aliquote: 1	OCHROBACTRU M ANTHROP ^s	- ANTIBIOGRAMMA GRAM NEGATIVI - KIRBY BAUER / PDP DIA04 - Metodo interno rev.2 del 2002	02/12/2007	
			03/12/2007	
			SULFISOXAZOLO	INTERMEDIO
			SULFAMETOXAZOLO + TRIMETH	RESISTENTE
			STREPTOMICINA	INTERMEDIO
			KANAMICINA	SENSIBILE
			GENTAMICINA	SENSIBILE
			AMINOSIDINA	SENSIBILE
			AMPICILLINA	RESISTENTE
			CEFALOSPORINE III GENERAZIO	SENSIBILE
			AMOXICILLINA + ACIDO CLAVULA	SENSIBILE
			TETRACICLINA	SENSIBILE
			COLISTINA	SENSIBILE
			ACIDO NALIDIXICO	INTERMEDIO
ENROFLOXICINA	RESISTENTE			
SPECTINOMICINA	SENSIBILE			
APRAMICINA	SENSIBILE			

Fig 41: referto di esame batteriologico e antibiogramma

3.10 L'analisi statistica.

Per indagare se la presenza di batteri patogeni, o micoplasmi (Fontbonne A., 2006; Rota et al., 2007; Newell J.F., 2006; Davidson A.P., 2003; Dumon C., 1998; Munnich A., 2006; Convert G., 2006; Allaker R.P. et al., 1992; Sager M., Remmers C., 1990; Schafer-Somi S. et al., 2003; Beutin L., 1999) avesse un effetto sulle performance riproduttive si è dato un punteggio di performance ad ogni parto, tenendo in considerazione, razza, età, parità, prolificità, mortalità natale e perinatale: il minimo del punteggio è stato assegnato alle cagne che hanno perso l'intera cucciolata, il massimo alle cagne che hanno completato lo svezzamento tutti i cuccioli.

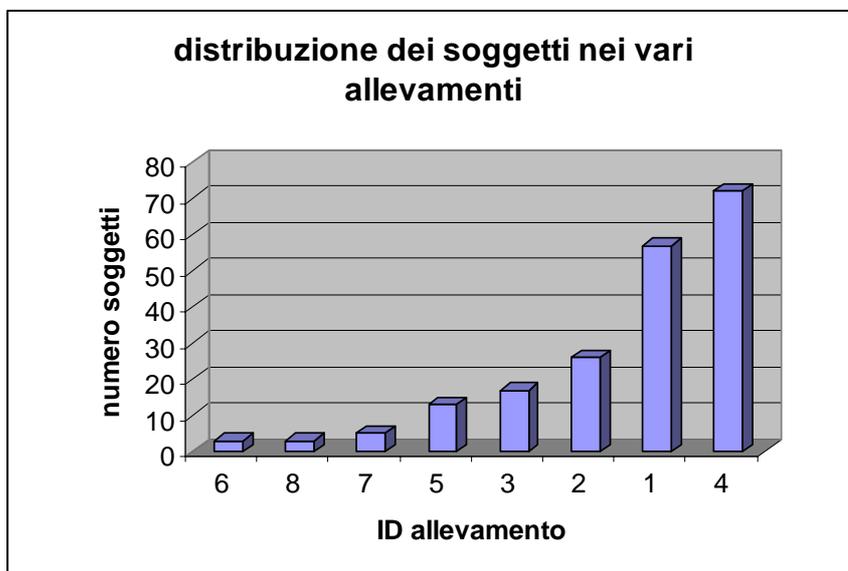
Si è poi applicato il test di U Mann-Whitney per confrontare il punteggio di performance riproduttiva e il numero e la percentuale di morti totali tra le cagne in cui era stato isolato il micoplasma e le altre e tra cagne in cui erano stati isolati batteri patogeni e le altre.

Inoltre si è eseguito un test esatto di Fisher per valutare se le cagne in cui era stato isolato il micoplasma avessero più spesso un punteggio minimo di performance riproduttiva, e se presentassero più frequentemente presenza di batteri patogeni a livello vaginale.

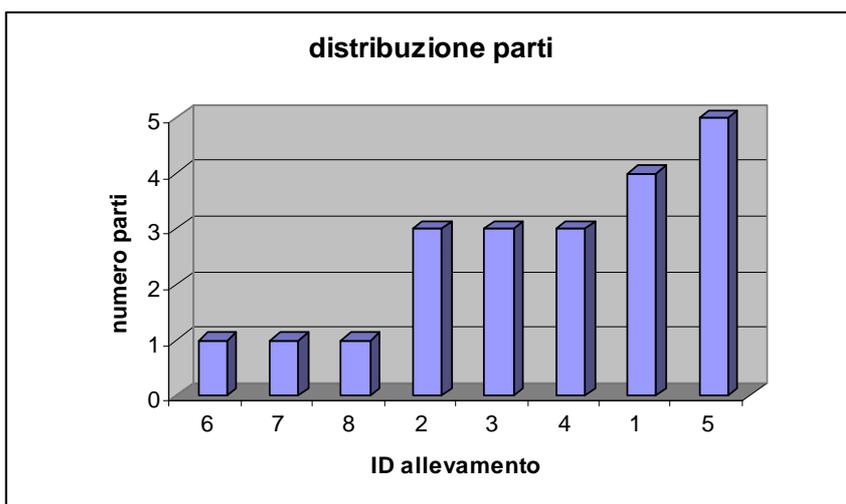
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

Il presente studio, che si è svolto nel periodo compreso tra il 15 gennaio 2007 ed il 21 gennaio 2008, ha interessato 8 allevatori di cani dislocati nelle province di Padova, Venezia e Vicenza. Tra gli allevatori che hanno partecipato, considerando il numero di soggetti in allevamento, le strutture e la continuità della attività, cinque possono essere considerati professionali mentre i restanti tre ricadono certamente nella categoria amatoriale.

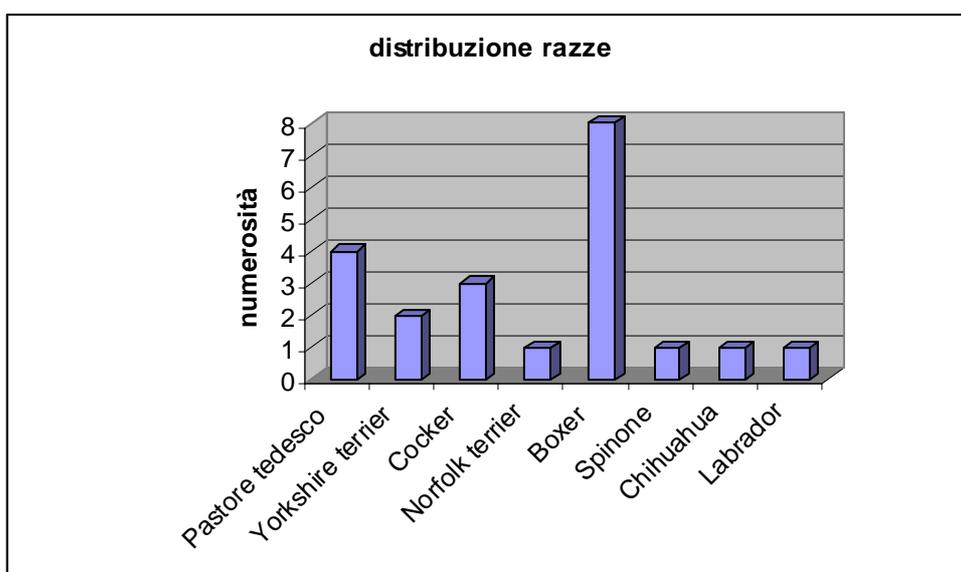
Il totale dei soggetti presenti nel periodo di osservazione negli allevamenti considerati ammontava a 196, di cui 164 femmine e 32 maschi. La distribuzione dei soggetti negli allevamenti, come si evince dal grafico sottostante era alquanto variabile.



Sulle 164 femmine presenti, nel periodo di osservazione abbiamo potuto esaminare 21 gravidanze. Questa disparità tra le fattrici presenti e le gravidanze osservate ha più di una ragione. Innanzi tutto occorre sottolineare che, nell'allevamento dell'animale da affezione, è normale che non tutte le fattrici siano ingravidate ad ogni calore. Gli accoppiamenti infatti sono spesso condizionati dalle richieste del mercato o dalla disponibilità di soggetti con particolari caratteristiche genealogiche. Inoltre è da considerare che il nostro protocollo inizia a due settimane dal parto e si conclude con lo svezzamento, quindi gli ultimi soggetti presi in considerazione non sono stati inclusi nell'elaborazione in quanto non sono ancora disponibili i dati definitivi.



Le 21 cagne considerate appartenevano ad 8 razze diverse riportate nel grafico sottostante con la relativa numerosità:



Questa distribuzione evidentemente ci impedirà di trarre conclusioni relative all'effetto della razza.

4.1 Descrizione degli allevamenti:

Allevamento 1

All'allevamento 1 appartengono i soggetti n°12, 13, 14, 15. E' composto in totale di 47 fattrici e circa una decina di maschi, somma di diverse razze toy: Yorkshire, Norfolk terrier, Chihuahua.

Gli animali vivono in box multipli, dove le femmine sono separate dai maschi, hanno libero accesso all'esterno perché ogni gabbia è dotata sia di una parte coperta che di una parte all'aperto.

Il metodo di rilevamento del periodo fertile usato è la convivenza con il maschio: lo stallone e la femmina che mostra perdite vulvari tipiche del proestro vengono posti in un box a parte e lasciati insieme per circa 15 giorni.

I box per il parto sono separati dal resto dell'allevamento e dotati ognuno di pavimento in piastrelle lavabili e lampade riscaldanti ad infrarossi che vengono lasciate accese 24 ore su 24 dopo la nascita dei cuccioli per i primi 10 giorni di vita. I cuccioli vengono spostati dai box adibiti al parto allo svezzamento.

Dopo lo svezzamento i cuccioli vengono separati dalla madre e tenuti in gabbie mobili all'esterno, che vengono periodicamente cambiate di posizione. Di notte i cuccioli hanno un ricovero interno, e rimangono sempre suddivisi per cucciolate.

La media di parto dell'allevamento è 3,5 cuccioli.

E' stata effettuata la ricerca per herpesvirus canino sul siero delle fattrici nel 2004, 2005 e 2006 e l'allevamento è risultato esente.

Dopo che la gabbia parto viene svuotata, viene disinfettata con soluzione acquosa di ipoclorito di sodio. Per ogni box vengono rimossi gli escrementi e cambiata l'acqua di abbeverata giornalmente.

Gli animali vengono nutriti con due pasti al giorno, l'allevatore utilizza diete commerciali a base di crocchette di buona qualità; viene variata l'alimentazione della cagna gravida a circa 7 giorni dal parto, e viene introdotta la somministrazione di latte vaccino fino allo svezzamento della cucciolata.

Ad ogni cagna gravida viene somministrato dell'antibiotico nei tre giorni precedenti il parto: l'allevatore usa da due anni il Rochefin, una cefalosporina ad uso umano. Se i cuccioli si mostrano poco vitali alla nascita viene somministrato loro il medesimo antibiotico fino alla scomparsa dei sintomi. Negli ultimi anni, è mediamente morto un cucciolo per ogni cucciolata.

Allevamento 2

All'allevamento 2 appartengono i soggetti n° 19, 20, 21. E' composto da 23 fattrici e 3 maschi di razza Boxer. Gli animali vivono in box multipli, dove le femmine sono separate dai

maschi: durante il giorno gli animali stazionano in recinti all'esterno, mentre durante la notte stazionano in box interni.

Il metodo di rilevamento del periodo fertile usato è la valutazione della progesteronemia.

I box per il parto sono separati dal resto dell'allevamento, sono situati all'interno dell'abitazione, alcuni dotati di lampade riscaldante ad infrarossi, con pavimento lavabile, altri dotati di tappeto riscaldato, su cui vengono stesi panni di cotone che vengono periodicamente cambiati; gli elementi riscaldanti vengono lasciati accesi 24 ore su 24 nei primi giorni dei cuccioli e poi accesi se la temperatura ambientale si abbassa al di sotto dei 20 gradi. I cuccioli vengono spostati dai box-parto allo svezzamento, e tali ambienti vengono disinfettati con ipoclorito di sodio. I box esterni costruiti su terra vengono puliti settimanalmente, vengono disinfettati solo quelli con pavimento cementato lavabile; gli animali vengono nutriti con due pasti al giorno, l'allevatore utilizza diete commerciali a base di crocchette di buona qualità, ed integra con carne fresca o scatolette di alimento umido per cani; viene variata l'alimentazione della cagna gravida a circa 15 giorni dal parto fino allo svezzamento, e viene introdotta la somministrazione di latte vaccino.

La media dei nati dell'allevamento è di 6 cuccioli, ma vi è elevata mortalità, e generalmente sopravvivono mediamente 3 cuccioli.

Ad ogni cagna gravida viene somministrato l'antibiotico 5 giorni prima del parto: frequentemente l'allevatore usa il Synulox, un'associazione di amoxicillina e acido clavulanico.

L'allevamento è esente da herpesvirus.

Allevamento 3

All'allevamento 3 appartengono i soggetti n°4, 5, 6. E' composto in totale di 15 fattrici e 2 maschi di razza Pastore Tedesco. Gli animali vivono in box singoli, all'aperto, dotati di tettoie. Le femmine vengono liberate una volta al giorno, singolarmente. Il metodo di rilevamento del periodo fertile usato è la misurazione della progesteronemia.

I box per il parto sono nello stesso ambiente dei box singoli ma distanziati da questi di qualche metro; ogni box parto è dotato di pavimento cementato e lampade riscaldanti che vengono lasciate accese 24 ore su 24 dopo la nascita dei cuccioli per i primi 10 giorni di vita. I cuccioli sono tenuti all'interno di box di legno, ricoperti di carta che viene cambiata periodicamente in base al grado di sporcizia presente; vengono spostati dai box-parto allo svezzamento.

La media di parto dell'allevamento è 6,5 cuccioli, ma l'allevatore sottolinea che nell'ultimo anno ci sono stati dei problemi di mortalità neonatale importanti.

Dopo che la gabbia parto viene svuotata, viene disinfettata con soluzione acquosa di ipoclorito di sodio. Per ogni box vengono rimossi gli escrementi e cambiata l'acqua di abbeverata giornalmente, e vengono disinfettati anch'essi con ipoclorito di sodio due volte la settimana.

Gli animali vengono nutriti con due pasti al giorno, l'allevatore utilizza diete commerciali a base di crocchette di buona qualità, sporadicamente viene somministrata anche della carne cotta; viene variata l'alimentazione della cagna gravida a circa 7 giorni dal parto, con la somministrazione di crocchette da cucciolo e viene introdotta la somministrazione di latte vaccino.

Ad ogni cagna gravida viene somministrato dell'antibiotico nei 4 giorni precedenti il parto: l'allevatore usa da alcuni anni cefalosporine. Se i cuccioli si mostrano poco vitali alla nascita viene somministrato lo stesso antibiotico fino alla scomparsa dei sintomi.

E' stata effettuata la ricerca per herpesvirus sul siero delle fattrici nel 2005 e nel 2006 e l'allevamento è risultato esente.

Allevamento 4

All'allevamento 4 appartengono i soggetti n°16, 17, 18. E' composto in totale di 62 fattrici e circa una decina di maschi, di due diverse razze: Cocker Spaniel e Labrador. Per ogni componente dell'allevamento viene effettuata una biopsia corneale e inviata ad un laboratorio tedesco che effettua ricerche di malattie genetiche tipiche della razza come la nefropatia cronico-progressiva del Cocker.

Gli animali vivono in box multipli che arrivano fino a 20 soggetti, all'interno di notte e all'esterno di giorno, dove le femmine sono separate dai maschi; i gruppi di animali sono suddivisi in base alle caratteristiche comportamentali di ogni soggetto.

I metodi di rilevamento del periodo fertile usati sono: la convivenza con il maschio in femmine con calori regolari, la valutazione della progesteronemia in femmine con calori atipici o di particolare pregio. Viene generalmente usata la monta naturale: l'allevatore ricorre alla monta artificiale solo per femmine che hanno avuto problemi di fertilità o di mortalità neonatale imponente.

I box per il parto sono separati dal resto dell'allevamento, inseriti in un ambiente riscaldato da una stufa; i pavimenti sono in piastrelle lavabili e i cuccioli sono tenuti sul pavimento

ricoperto di carta che viene giornalmente sostituita; ogni cucciolata ha a disposizione una lampada riscaldante ad infrarossi per i primi giorni di vita.

La gabbia parto viene pulita accuratamente ogni 3 giorni e dopo il suo svuotamento, viene disinfettata con soluzione acquosa di ipoclorito di sodio. Per ogni box vengono rimossi gli escrementi e cambiata l'acqua di abbeverata giornalmente.

Gli animali vengono nutriti con due pasti al giorno, l'allevatore utilizza diete commerciali a base di crocchette di buona qualità e la integra tre volte alla settimana con carni fresche; viene variata l'alimentazione della cagna gravida a circa 7 giorni dal parto, e viene introdotta la somministrazione di latte vaccino.

La media di parti dell'allevamento è 6 cuccioli.

E' stata effettuata la ricerca per herpesvirus sul siero delle fattrici nel 2006 e l'allevamento è risultato esente.

L'allevatore non usa antibiotici nelle femmine prima del parto.

Allevamento 5

All'allevamento 5 appartengono i soggetti n°7, 8, 9, 10, 11. E' composto in totale di una decina di fattrici e 2-3 maschi, tutti di razza Boxer. Gli animali vivono in box singolarmente o suddivisi in coppie in base alle caratteristiche caratteriali dei soggetti. I box sono interni e gli animali hanno accesso all'esterno una volta al giorno, singolarmente o a gruppi. Il metodo di rilevamento del periodo fertile usato è la valutazione della progesteronemia.

Viene generalmente usata la monta naturale: l'allevatore ricorre alla monta artificiale solo per femmine che hanno avuto problemi di fertilità. I box per il parto non sono separati dal resto dell'allevamento, sono dotati tutti di pavimento lavabile: ogni cucciolata ha a disposizione una lampada riscaldante per i primi giorni di vita ed è tenuta in uno spazio plastificato con carta e stracci che vengono periodicamente cambiati.

La gabbia parto viene pulita accuratamente dopo che viene svuotata, viene disinfettata con soluzione acquosa di ipoclorito di sodio. Per ogni box vengono rimossi gli escrementi giornalmente; l'acqua di abbeverata è posta in dispensatori che vengono riempiti in concomitanza del loro svuotamento.

Gli animali vengono nutriti con due pasti al giorno, l'allevatore utilizza diete commerciali a base di crocchette di buona qualità; viene variata l'alimentazione della cagna gravida a circa 7 giorni dal parto, e viene introdotta la somministrazione di latte vaccino.

La media di parto dell'allevamento è 5 cuccioli.

L'allevamento non è esente da herpesvirus e i soggetti 7, 8, 11 sono sieropositivi.

L'allevatore usa antibiotici preventivi, di solito Azitromicina, e li somministra dopo la monta, e a metà gravidanza.

Allevamento 6

Si tratta di un privato a cui appartiene il soggetto 2: la femmina vive all'esterno, per la maggior parte del giorno libera, oppure in un recinto condiviso con altri due maschi di piccola taglia.

Il recinto del parto è in contiguità con il recinto dove stazionano gli altri due cani, e le strutture sono per la maggior parte in legno: viene effettuata la pulizia dei recinti giornalmente, non viene effettuata alcuna disinfezione periodica.

L'alimentazione del soggetto è composta da crocchette, avanzi di cucina, carne, verdura, frutta; vengono somministrate crocchette da cuccioli e latte nella settimana prima del parto. Il parto è avvenuto nella cuccia di legno, non è stato messo a disposizione alcun elemento riscaldante. Non è stato effettuato alcun test per la ricerca di herpesvirus se non sui cuccioli morti, i quali sono risultati negativi.

Non viene effettuato alcun trattamento antibiotico.

Allevamento 7

Si tratta di un privato a cui appartiene il soggetto 1: la femmina vive in un box condiviso con altre due femmine di Pastore Tedesco; in prossimità c'è un altro box contenente due maschi.

Il recinto del parto è in contiguità con il resto: viene effettuata la pulizia dei recinti giornalmente, viene effettuata una disinfezione periodica con acqua e detersivo per pavimenti.

L'alimentazione del soggetto è composta da crocchette, avanzi di cucina, carne, verdura, frutta; vengono somministrate crocchette da cuccioli e latte nella settimana prima del parto.

Non si hanno notizie su herpesvirus.

Viene effettuato un trattamento antibiotico a 5 giorni dal parto con cefalosporine.

Allevamento 8

Si tratta di un privato a cui appartiene il soggetto 3: la femmina vive all'esterno, per la maggior parte del giorno libera, oppure in un recinto condiviso con altre due femmine: tutti i soggetti sono di razza Spinone Italiano.

Il box del parto è separato dai recinti, situato all'interno dell'abitazione, con temperatura ambientale adeguata, pavimento lavabile, lampada riscaldante a disposizione dei cuccioli 24 ore su 24 fino allo svezzamento. Viene effettuata la pulizia dei recinti giornalmente, non viene effettuata alcuna disinfezione periodica.

L'alimentazione del soggetto è composta da crocchette, avanzi, carne, verdura, frutta; vengono somministrate crocchette da cuccioli e latte nei 15 giorni prima del parto.

Non si hanno notizie su herpesvirus.

Non viene effettuato alcun trattamento antibiotico.

4.2 Descrizione dei soggetti

Sogg 1: MAGGIE

Il soggetto 1 è Maggie, un pastore tedesco di 8 anni, al 7° parto, appartenente all'allevamento N.7; il soggetto è piuttosto magro ma in buono stato di salute.

Il metodo per determinare il periodo fertile usato è la valutazione del progesterone ematico.

L'inseminazione è avvenuta con monta naturale. I parti dal 1° al 5° sono stati tutti normali, privi di mortalità neonatale, nel 6° parto di 12 cuccioli ne sono morti 4 nei giorni successivi. Nell'ultimo parto sono nati 2 cuccioli: è stato necessario effettuare un taglio cesareo d'urgenza per distocia; uno dei due cuccioli è nato morto, ed è stato estratto manualmente dal canale vaginale.

Non è stato possibile effettuare l'autopsia sul cucciolo, ma secondo il veterinario che ha effettuato il cesareo, il cucciolo è morto per soffocamento nel canale del parto.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Late pre parto	Latte post parto
Maggie	2/1	<i>E.coli</i> <i>Staphilo coag+</i> <i>Strepto spp</i>	<i>Ochrobacter</i>	sterile

Sogg 2: OLGA

Il soggetto 2 è Olga, un Labrador di 7 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento N.6. Il soggetto è obeso ma le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza col maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Sono nati 10 cuccioli, il parto è avvenuto al 65° giorno in circa 18 ore. Dopo il primo giorno di vita sono morti 3 cuccioli, nel giorno successivo altri 2. I rimanenti cuccioli sono tutti normali.

La produzione lattea dell'animale è sovrabbondante già una settimana prima del parto.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Late pre parto	Latte post parto
Olga	10/5	<i>S. aureus</i> <i>S. canis</i> entrambi in alta carica	<i>S. aureus</i>	<i>S. aureus</i>

Dall'autopsia dei cuccioli morti risulta la presenza di *Staphilococcus aureus* e *Streptococcus canis* in fegato, milza e polmone; nello stomaco, oltre a questi due batteri, risulta la presenza anche di *Escherichia coli*.

Batteri	n. resistenze su 16 antibiotici	n. mediamente resistenti
<i>S. canis</i>	2	3
<i>S. aureus</i>	4	0
<i>E. coli</i>	0	1

E. coli può derivare da una contaminazione fecale del canale del parto o dell'ambiente; *S. canis* è un batterio comunemente presente come saprofito nella vagina della cagna; il batterio più patogeno tra i tre è *S. aureus*, generalmente presente come potenziale patogeno sulla cute: è un produttore di endotossine che spesso risultano fatali in un cucciolo.

Anche nei tamponi di latte pre e post parto è stato isolato *S. aureus*.

Sogg 3: ISIDE

Il soggetto 3 è Iside, uno Spinone Italiano di 2,5 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento N.8. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone; dall'ecografia non sono risultate anomalie dell'apparato genitale.

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza col maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Sono nati 10 cuccioli, il parto è avvenuto al 60° giorno, in circa 4 ore. I cuccioli sono risultati esser tutti normali e in buono stato di salute.

La produzione lattea dell'animale è abbondante e sufficiente a svezzare i dieci cuccioli; in fase di allattamento la madre viene sostenuta con integratori di sali minerali e carne, aggiunti alla normale alimentazione da lattazione.

Soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Iside	10/0	<i>S. aureus</i> <i>Citrobacter</i>	Sterile	<i>S. aureus</i> <i>Ochrobacter</i> in bassa carica

L'animale si mostra di temperamento particolarmente tranquillo ed ha un ottimo rapporto col proprietario; ha a disposizione un recinto con ampi spazi e convive con altri soggetti.

Sogg 4 : ALFA

Il soggetto 4 è Alfa, un Pastore Tedesco di 3 anni al 3° parto appartenente all'allevamento N.3. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Sono nati 11 cuccioli, il parto è avvenuto al 59° giorno, in circa 30 ore. I cuccioli sono risultati esser tutti nati morti. Nei parti precedenti, si è verificato il 50% di natimortalità nei primi giorni successivi al parto.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Alfa	11/11 POSITIVA a <i>Mycoplasma</i>	<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Staphilococcus</i> <i>coag.positivo</i> <i>Streptococcus</i> spp.	<i>S. coag.positivo</i>

La necropsia dei cuccioli è avvenuta su cadaveri congelati, quindi anche se i batteri rilevati erano in bassa carica, ci sembra opportuno evidenziare la loro presenza: nel polmone e nel cervello sono stati isolati *Staphilococcus* coagulasi positivo e *Klebsiella*, in fegato e stomaco sono stati isolati *Enterococcus* e *Staphilococcus* coagulasi positivo, mentre nella milza solo *Staphilococcus* coagulasi positivo.

Klebsiella in bassa carica può rappresentare un comune ritrovamento nel polmone, e la stessa cosa vale per *Enterococcus* a livello di intestino, e, per contiguità, di fegato; in questo caso il rilevamento anomalo è lo *Staphilococcus* coagulasi positivo, batterio mediamente virulento, e la sua presenza anomala nel latte dimostra che la madre era infetta, e probabilmente non ha sviluppato sufficienti anticorpi da trasmettere ai cuccioli. Inoltre, lo stafilococco presente nel cucciolo risulta essere resistente alle cefalosporine somministrate dall'allevatore come terapia preventiva alla madre 5 giorni prima del parto.

Batteri	n. resistenze su 16 antibiotici	n. mediamente resistenti
<i>S. coag. Positivo</i>	5	3
<i>Klebsiella</i>	1	0

Va ricordato che il parto è stato languido, fenomeno che ha anch'esso in qualche modo contribuito alla perdita della cucciolata.

Sogg 5: RAISSA

Il soggetto 5 è Raissa, un Pastore Tedesco di 3 anni al 3° parto, appartenente all'allevamento 3.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone; il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Sono nati 10 cuccioli, il parto è avvenuto al 62° giorno, in circa 12 ore. I cuccioli nati sono 10, dei quali 3 sono stati parzialmente mangiati dalla madre. Nei parti precedenti non si è verificato alcun problema.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Raissa	10/3	<i>Escherica coli</i> <i>Streptococcus canis</i>	Sterile	<i>S. aureus</i> <i>Enterococcus</i>

La necropsopia è stata effettuata su cuccioli congelati, quindi, anche se i batteri ritrovati sono risultati in bassa carica, ci sembra comunque opportuno evidenziarne la presenza:

è risultata la presenza di *Enterococcus* e *Staphilococcus* coagulasi positivo in fegato, cervello, milza, polmone, e di *Staphilococcus* coagulasi positivo nello stomaco.

Sogg 6: ANDY

Il soggetto 6 è Andy, un Pastore Tedesco di 3 anni al 3°parto, appartenente all'allevamento N.3.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone;

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Sono nati 8 cuccioli, il parto è avvenuto al 60° giorno, in circa 12 ore. L'andamento dei parti precedenti non ha messo in evidenza alcun problema di fertilità, ma degli 8 cuccioli nati nell'ultimo parto nessuno è sopravvissuto a causa del cannibalismo della madre.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto
Andy	8/8	<i>Proteus spp.</i>	<i>Ochrobacter</i>

I tamponi vaginale e del latte pre parto non hanno evidenziato presenze batteriche importanti e le specie rilevate hanno un ruolo di contaminanti del campione.

Sogg 7: HELEN

Il soggetto 7 è Helen, un Boxer di 2,5 anni al 2° parto, appartenente all'allevamento N.5. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone;

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Nel parto precedente sono nati 4 cuccioli e non vi è stato alcun problema. Nell'ultimo parto sono nati 6 cuccioli, il parto è avvenuto al 62° giorno, in circa 20 ore. I cuccioli nati sono 6, dei quali 1 è nato morto.

Soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Helen	6/1	<i>Pasteurella</i> <i>Streptococcus</i> <i>canis</i>	<i>Staphilococcus</i> <i>coag.positivo</i>	<i>Staphilococcus</i> <i>coag.positivo</i>

La necropsia non ha dato alcun risultato rilevante: gli organi del cucciolo sono sterili. Lo stafilococco presente nel latte pre e post parto si è mostrato resistente all'antibiotico somministrato dall'allevatore. Non è stata effettuata la ricerca di Herpesvirus, ma se la causa dell'aborto del cucciolo è virale ci aspettiamo di ritrovare sintomi evidenti o mortalità veloce ed improvvisa anche nel resto della cucciolata. L'allevamento da cui proviene la madre e la madre stessa non sono esenti da Herpesvirus: essa trasmette immunità ai cuccioli ma può essere che la risposta all'infezione sia diversa a seconda del soggetto.

Sogg 8: HILARY

Il soggetto 8 è Hilary, un Boxer di 2,5 anni al 2° parto, appartenente all'allevamento N.5.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Nel parto precedente sono nati 3 cuccioli sani. L'ultimo parto è avvenuto al 62° giorno, in circa 18 ore. I cuccioli nati sono 5, dei quali 1 è nato morto.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Hilary	5/1	<i>E. coli emolitico</i> <i>Streptococcus canis</i>	<i>E. coli</i> <i>Proteus</i>	<i>Staphilococcus aureus</i>

La necropsia non ha dato alcun risultato rilevante: gli organi del cucciolo sono sterili. Lo stafilococco presente nel latte post parto è risultato essere resistente all'antibiotico somministrato comunemente dall'allevatore. Non è stata effettuata la ricerca di Herpesvirus, ma se la causa dell'aborto del cucciolo è virale ci aspettiamo di ritrovare sintomi evidenti o mortalità veloce ed improvvisa anche nel resto della cucciolata.

Sogg 9: ATLANTA

Il soggetto 9 è Atlanta, un Boxer di 1,5 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento N.5. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Atlanta, in un parto normale, ha dato alla luce 6 cuccioli, di cui 2 nati morti.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Atlanta	6/2	<i>E. coli</i> <i>Enterococcus</i> <i>S. aureus</i>	<i>Staphilococcus coag. positivo</i>	<i>Staphilococcus coag. negativo</i>

Lo stafilococco ritrovato nel latte pre e post parto si è dimostrato resistente ai macrolidi che somministra l'allevatore come terapia pre parto. Non è stato possibile effettuare l'autopsia sui cuccioli.

Escherichia coli ed *Enterococcus* ritrovati nel tampone vaginale potrebbero rappresentare una contaminazione di origine fecale, mentre gli stafilococchi ritrovati sia in vagina che nel latte non sono di comune riscontro. Non abbiamo sufficienti elementi però per determinare se la morte dei cuccioli sia legata a questi batteri.

Sogg 10: ANDALUZ

Il soggetto 10 è Andaluz, di razza Boxer, di 1,5 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento N.5. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Andaluz ha partorito 3 cuccioli sani e vitali.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Andaluz	3/0 POSITIVA a <i>Mycoplasma</i>	<i>Bacillus</i> <i>Enterococcus</i> <i>S. intermedius</i>	<i>Bacillus spp.</i>	<i>S. intermedius</i>

I bacilli e gli enterococchi ritrovati nei tamponi possono essere interpretati come contaminanti del campione, mentre lo *S. intermedius* è un comune saprofito delle vie genitali della cagna.

Sogg 11: ZIVA

Il soggetto 11 è Ziva, un Boxer di 2,5 anni al 2° parto, appartenente all'allevamento N.5. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Nel parto precedente sono nati 5 cuccioli e ne sono morti 2.

Nell'ultimo parto sono nati 10 cuccioli e ne sono morti 4, di cui 2 nati morti e 2 deceduti nelle ore successive al parto.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Ziva	10/4	<i>E. coli emolitico</i> <i>Pasteurella</i>	mancante	<i>Staphilococcus intermedius</i>

Lo stafilococco riscontrato nel latte post parto è risultato resistente all'antibiotico usato dall'allevatore.

Non abbiamo a disposizione l'autopsia dei cuccioli, ma la presenza di *E. coli* emolitico nel tampone vaginale non è di normale riscontro: questo batterio può rappresentare un pericolo per un cucciolo.

Sogg 12: BEAUTY DREAM

Il soggetto 12 è Beauty Dream, uno Chihuahua di 1,5 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento 1. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza con il maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Sono nati 2 cuccioli, il parto è avvenuto al 68° giorno, in circa 20 ore. I cuccioli sono risultati esser tutti nati morti: uno dei due rimasto incastrato nel canale del parto per macrosomia fetale, l'altro invece presentava palatoschisi.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Beauty Dream	2/2 POSITIVA a <i>Mycoplasma</i>	<i>S. aureus</i>	Sterile	<i>Bacillus spp.</i>

Non è stato possibile effettuare l'autopsia dei cuccioli.

Tra i batteri isolati *S. aureus* rappresenta l'unico patogeno stretto, caratteristico della cute umana. Se esso determina batteriemia, generalmente il soggetto muore per endotossicosi.

Sogg 13: CHANEL

Il soggetto 13 è Chanel, uno Yorkshire di 3 anni al 4° parto, appartenente all'allevamento 1.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone;

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza con il maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

I parti precedenti hanno presentato il 30% di natimortalità.

Dall'ultimo parto sono nati 2 cuccioli, uno dei quali è risultato esser nato morto; il parto è avvenuto al 62° giorno, in circa 20 ore.

Soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Chanel	2/1 POSITIVA a <i>Mycoplasma</i>	<i>S. aureus</i> <i>E. coli</i> <i>S. canis</i>	Mancante	Sterile.

La necropsia dei cuccioli è avvenuta su cadaveri refrigerati: fegato, polmone e cervello sono risultati negativi ai test batteriologici, mentre nella milza sono stati isolati *Staphilococcus coagulasi negativo*, *S. intermedius* e *Streptococcus spp.*

Inoltre dal cervello del cucciolo è stato isolato Herpesvirus: sulla base di test sierologici la madre è risultata esser sieronegativa.

Batteri	n. resistenze su 16 antibiotici	n. mediamente resistenti
<i>S. intermedius</i>	6	1

I batteri rilevati nel tampone vaginale non hanno rilevanza clinica, perché non sono la coltura pura di microrganismi patogeni, bensì la coltura mista di microrganismi per la maggior parte saprofiti della vagina.

Particolare attenzione va posta all'herpesvirus: l'allevamento di provenienza è esente e la madre è sieronegativa, quindi non ha mai sviluppato immunità e non ha potuto trasmetterla ai cuccioli con il colostro.

Sogg 14: JOGA

Il soggetto 14 è Joga, un Norfolk Terrier di 7 anni al 7° parto, appartenente all'allevamento 1.

Il soggetto è leggermente sovrappeso, ma le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza con il maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

I parti precedenti sono andati tutti bene: nel penultimo è accaduta la morte di un cucciolo in una cucciolata di 3 cuccioli.

Dall'ultimo parto sono nati 2 cuccioli, sani e vitali; il parto è avvenuto al 62° giorno, in circa 20 ore.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Joga	2/0	<i>Pasteurella</i>	Sterile.	<i>Enterococcus</i>

Nessuno dei batteri rilevati dai tamponi è considerato patogeno dell'apparato genitale. L'enterococco isolato dal latte post parto è risultato resistente all'antibiotico utilizzato in allevamento.

Sogg 15: LARA

Il soggetto 15 è Lara, uno Yorkshire di 2,5 anni al 2° parto, appartenente all'allevamento 1.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone; è una femmina particolarmente stressabile, che si sottrae anche alle manipolazioni del proprietario.

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza con il maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Il parto precedente si è concluso con l'aborto dell'intera cucciolata

Dall'ultimo parto sono nati 3 cuccioli, sani e vitali; il parto è avvenuto al 62° giorno, in circa 20 ore; nel giorno successivo al parto è morto uno dei cuccioli.

Soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Lara	3/1	<i>E. coli</i> <i>Staphilococcus coagulasi</i> <i>negativo</i>	<i>Bacillus</i>	sterile

L'autopsia del cucciolo è stata effettuata su cadavere congelato.

Dal fegato e dall'intestino è stato isolato *Enterococcus*, rilievo abbastanza comune, mentre da polmone e milza è stato isolato anche *E. coli*; quest'ultimo batterio è stato isolato anche dal cervello.

La madre ha fatto particolare fatica ad allattare i cuccioli per scarsità di latte, l'allevatore ha dovuto integrare con latte in polvere; inoltre la madre, nel corso delle prime settimane dopo il parto si è mostrata abbattuta e con disoressia.

I ceppi batterici isolati dal cucciolo sono risultati esser resistenti a molte classi di antibiotici.

Batteri	n. resistenze su 16 antibiotici	n. mediamente resistenti
<i>Enterococcus</i>	13	1
<i>E. coli</i>	5	0

Sogg 16: HOPE

Il soggetto 16 è Hope, un Cocker Spaniel di 2,5 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento 4.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone;

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza con il maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Il parto è avvenuto regolarmente nei tempi previsti: sono nati 8 cuccioli sani e vitali.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Hope	8/0	<i>E. coli emolitico</i> <i>Staphilococcus coagulasi</i> <i>negativo</i>	Mancante	Mancante

I due batteri ritrovati nel tampone vaginale non sono di normale riscontro

Sogg 17: ELISABETH

Il soggetto 17 è Elisabeth, un Cocker Spaniel di 3 anni al 1° parto, appartenente all'allevamento 4.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone;

Il periodo fertile è stato determinato con la convivenza con il maschio; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale. Il parto è avvenuto regolarmente nei tempi previsti: sono nati 4 cuccioli sani e vitali.

soggetto	Nati/morti	Tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Elisabeth	4/0 POSITIVA a <i>Mycoplasma</i>	<i>Pasteurella</i>	Mancante	Mancante

Pasteurella isolato dal tampone vaginale non risulta essere un batterio patogeno dell'apparato genitale, perché tipico di patologie polmonari: la sua presenza va interpretata come una contaminazione del campione.

Sogg 18: VALERY

Il soggetto 18 è Valery, un Cocker Spaniel di 5 anni al 5° parto, appartenente all'allevamento 4.

Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone;

Il periodo fertile è stato determinato con la progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale, effettuata portando la femmina al maschio, in Germania;

Nel penultimo parto il soggetto ha presentato una mortalità del 100%.

L'ultimo parto è avvenuto regolarmente nei tempi previsti: sono nati 4 cuccioli;

uno dei cuccioli presenta la mancanza di un arto anteriore, ma vivacità e appetito, il resto della cucciolata risulta lievemente depressa e inappetente: l'allevatore alimenta forzatamente i cuccioli mungendo la madre, li tratta con Amoxicillina e Acido clavulanico per via sottocutanea, ma ad un giorno dal parto muoiono due cuccioli, a due giorni ne muore un altro, e nel terzo giorno post parto muore anche l'ultimo cucciolo.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Valery	4/4	<i>Bacillus</i> <i>S. canis</i>	Mancante	Mancante

I batteri rilevati nel tampone vaginale fanno parte della flora saprofita della vagina.

Dall'autopsia dei cuccioli, effettuata su cadaveri congelati, vengono isolati *S. intermedius* e *S. canis* da fegato, stomaco, polmone e cervello, il che ci suggerisce una batteriemia in corso che molto probabilmente è la causa della morte dei cuccioli.

I batteri isolati risultano sensibili all'antibiotico usato nel post parto dall'allevatore.

Batteri	n. resistenze su 16 antibiotici	n. mediamente resistenti
<i>S. intermedius</i>	5	1
<i>S. canis</i>	5	3

Sogg 19: DAMA

Il soggetto 19 è Dama, un Boxer di 6,5 anni al 4° parto, appartenente all'allevamento N.2. Il soggetto è normopeso, e le sue condizioni di salute sono buone.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Nei parti precedenti Dama ha mostrato elevata mortalità nei cuccioli: la media di nati per parto è 7, ma ne è sempre sopravvissuto uno soltanto. Nell'ultimo parto, avvenuto nei tempi previsti e in circa 18 ore, sono nati 3 cuccioli di cui 1 nato morto e uno morto poche ore dopo il parto con palatoschisi.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Dama	3/2	<i>S. canis</i>	<i>Aeromonas hydrophila</i> <i>Staphilococco coag. positivo</i>	Mancante

Non è stato possibile effettuare l'autopsia dei cuccioli.

Aeromonas è un batterio prevalentemente causa di enteriti, produttore di tossine, che generalmente causa malattia se prende il sopravvento sulle difese immunitarie dell'ospite; in

un tampone vaginale assume un ruolo di contaminante; in questo caso si è dimostrato resistente all'antibiotico comunemente usato dall'allevatore.

Sogg 20: VITTORIA

Il soggetto 20 è Vittoria, un Boxer di 5 anni al 2° parto, appartenente all'allevamento N.2.

Il soggetto è normopeso, presenta da qualche settimana una broncopolmonite da *Pasteurella* spp., è in trattamento con Synulox.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Nel parto precedente sono nati 6 cuccioli, ne è sopravvissuto uno soltanto; 2 sono probabilmente deceduti in seguito a schiacciamento del cranio, mentre 3 presentavano una batteriemia da *E. coli* e *Streptococcus* spp. Nell'ultimo parto, avvenuto per cesareo programmato, sono nati 2 cuccioli sani.

soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Vittoria	2/0 POSITIVA a <i>Mycoplasma</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Bacillus</i>	Mancante

Sogg 21: QUERCIA

Il soggetto 21 è Quercia, un Boxer di 5 anni al 5° parto, appartenente all'allevamento N.2. Il soggetto è normopeso, e in buono stato di salute. Nel 3° e nel 4° parto si è verificata la morte di 3 cuccioli su 5.

Il periodo fertile è stato determinato con la misurazione della progesteronemia; l'inseminazione è avvenuta con monta naturale.

Nell'ultimo parto sono nati 7 cuccioli di cui nati morti 2.

Soggetto	Nati/morti	tampone vaginale	Latte pre parto	Latte post parto
Quercia	7/2	<i>Enterococcus spp. Pasteurella multocida</i>	Sterile	<i>S. aureus</i>

Non è stato possibile effettuare l'autopsia sui cuccioli. I batteri ritrovati nel tampone vaginale assumono il ruolo di contaminanti: in particolare *Pasteurella* è un batterio che determina patologie a livello di apparato respiratorio.

Dei 21 soggetti testati, 8 sono di razza Boxer, 4 sono Pastori Tedeschi, 3 sono Cocker Spaniel, 2 sono Yorkshire, 1 è di razza Labrador, 1 di razza Spinone, 1 di razza Norfolk e 1 di razza Chihuahua. L'età media è di 3,7 anni.

Tab2: Confronto tra l'età, il numero di nati vivi e il numero di nati morti nelle femmine positive a Mycoplasma.

Nome	Eta'	Allevamento di appartenenza	Nati	Morti
Alfa	3 anni	3	11	11
Andaluz	1,5anni	5	3	0
Beauty dream	1,5anni	1	2	2
Chanel	3 anni	1	2	1
Dama	6,5 anni	2	2	2
Hope	2,5 anni	4	8	0
Elisabeth	3 anni	4	4	0
Vittoria	5 anni	2	2	0

Tab 3: Tipo di batteri isolati nei tamponi vaginali confrontati con uno studio su 82 soggetti.

Presente studio	Krustritz MR et al.
<i>Streptococcus canis</i>	<i>E. coli</i>
<i>Enterococcus</i>	<i>Pasteurella spp.</i>
<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Pasteurella</i>	<i>Streptococcus spp.</i>
<i>E. coli emolitico</i>	<i>Streptococcus beta-emolitico</i>
<i>Proteus</i>	<i>Streptococcus alfa-emolitico</i>
<i>Pseudomonas spp.</i>	<i>Bacillus spp.</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Proteus</i>
<i>Staphilococcus intermedius</i>	<i>S. intermedius</i>
<i>Streptococcus alfa emolitico</i>	<i>Staphilococcus spp.</i>
<i>Citrobacter</i>	<i>S. canis</i>

Tab 4: Tipo di batteri isolati da colostro pre parto in ordine di frequenza

Tipo di batteri	Numero di isolamenti
<i>Staphilococcus coagulasi positivo</i>	3
<i>Ochrobacter anthropy</i>	2
<i>Staphilococcus aureus</i>	2
<i>E.coli</i>	1
<i>Proteus</i>	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	1

Tab5: Tipo di batteri isolati da latte post-parto in ordine di frequenza

<i>Enterococcus</i>	2
<i>Staphilococcus coagulasi negativo</i>	1
<i>Bacillus spp</i>	1
<i>Staphilococcus intermedius</i>	1

In questo studio sono stati effettuati test batteriologici anche sul latte pre e post parto, ed in questi i batteri più frequentemente isolati sono stati, per quanto riguarda il latte prima del parto, *S. coagulasi positivo*, *Ochrobacter anthropy*, *S. aureus*, *E. coli*, *Proteus*, *Aeromonas hydrofila*, e, per quanto riguarda il latte post parto, *S. aureus*, *S. coagulasi positivo*, *Enterococcus*, *S. coagulasi negativo*, *Bacillus*, *S. intermedius*.

La maggior parte dei batteri isolati nei tamponi vaginali e nel latte sono batteri Gram-negativi, produttori di tossine che nel cucciolo possono determinare sia setticemia che la “Sindrome da latte tossico”. All’antibiogramma molti di questi batteri hanno mostrato resistenza ai più comuni antibiotici, soprattutto in uno di questi allevamenti, dove l’allevatore somministra due cicli di antibiotico alle fattrici: subito dopo la monta e a metà gravidanza.

Nessuno dei tamponi vaginali risulta sterile, come ci si può aspettare, considerata la numerosa flora saprofita presente in vagina, mentre 5 tamponi di latte pre parto e 2 tamponi post parto risultano privi di batteri;

Tab 6: identificazione delle cagne il cui latte o tampone vaginale erano sterili

Nome	Elemento sterile
Raissa	Latte pre
Beauty dream	Latte pre
Joga	Latte pre
Maggie	Latte post
Iside	Latte pre
Quercia	Latte pre
Chanel	Latte post

Tab 7: elenco dei batteri isolati dai tamponi vaginali e dal latte nei diversi allevamenti.

Allevatori professionisti	Batteri isolati
2	DA TAMPONI VAGINALI: <i>S. canis</i> <i>Enterococcus</i> <i>Pasteurella</i> DA LATTE: <i>Citrobacter</i>

	<p><i>Bacillus</i></p> <p><i>Pasteurella</i></p> <p><i>S. intermedius</i></p>
5	<p>DA TAMPONI VAGINALI:</p> <p><i>S. canis</i></p> <p><i>Pasteurella</i></p> <p><i>E. coli emolitico</i></p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>S. intermedius</i></p> <p>DA LATTE:</p> <p><i>Staphilococcus coagulasi</i></p> <p><i>positivo</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>Proteus</i></p> <p><i>S. intermedius</i></p> <p><i>Bacillus</i></p>
3	<p>DA TAMPONI VAGINALI:</p> <p><i>Pseudomonas</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>S. canis</i></p> <p><i>Proteus</i></p> <p><i>Pasteurella</i></p> <p>DA LATTE:</p> <p><i>Staphilococcus coagulasi</i></p> <p><i>negativo</i></p> <p><i>Streptococcus spp.</i></p> <p><i>Enterococcus</i></p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>Ochrobacter anthropy</i></p>

1	<p>DA TAMPONI VAGINALI:</p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>S. canis</i></p> <p><i>Pasteurella</i></p> <p><i>Staphilococcus coagulasi</i> positivo</p> <p><i>Staphilococcus coagulasi</i> negativo</p> <p>DA LATTE:</p> <p><i>Bacillus</i></p> <p><i>Enterococcus</i></p>
4	<p>DA TAMPONI VAGINALI:</p> <p><i>E. coli emolitico</i></p> <p><i>Staphilococcus coagulasi</i> negativo</p> <p><i>Pasteurella</i></p> <p><i>Bacillus</i></p> <p><i>S. canis</i></p>

Allevatori amatoriali	Batteri isolati
6	<p>DA TAMPONE VAGINALE:</p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>S. canis</i></p> <p>DA LATTE:</p> <p><i>E. coli</i></p> <p><i>S. aureus</i></p> <p><i>S. canis</i></p>
7	<p>DA TAMPONI VAGINALI:</p> <p><i>E. coli</i></p>

	<i>S. aureus</i> DA LATTE: <i>Ochrobacter antropi</i>
8	DA TAMPONE VAGINALE: <i>Citrobacter</i> <i>Staphilococcus coagulasi</i> positivo DA LATTE: <i>Ochrobacter anthropy</i> <i>Staphilococcus coagulasi</i> positivo

Tab 8: batteri isolati dalla necropsopia dei cuccioli in ordine di frequenza.

Batteri isolati	Frequenza
<i>Enterococcus</i>	3
<i>Staphilococcus coag negativo</i>	3
<i>S. canis</i>	2
<i>E. coli</i>	2
<i>S. intermedius</i>	2
<i>S. aureus</i>	1
<i>Streptococcus spp.</i>	1
<i>Klebsiella</i>	1
<i>Staphilococcus coag positivo</i>	1

Nel nostro lavoro abbiamo preso in considerazione 21 cucciolate, di femmine provenienti da diversi allevamenti; sono nati 117 cuccioli, ne sono nati morti 25; sono morti nelle successive 48 ore dopo il parto 23 cuccioli; dei 117 sono sopravvissuti 69 cuccioli, cioè il 59%; il 41% dei cuccioli è deceduto, e la loro morte ha causato non poche perdite economiche negli allevatori.

Sono stati presi in esame 14 cadaveri, provenienti da 8 cucciolate diverse delle seguenti razze: Labrador, Pastore Tedesco, Boxer, Yorkshire, Cocker Spaniel. Le carcasse dei cuccioli sono state conservate a temperatura di refrigerazione, se l'invio al laboratorio era previsto entro le 24 ore, oppure congelate. Le autopsie sono state eseguite presso l'Istituto Zooprofilattico

Sperimentale delle Venezie; nei cuccioli provenienti dagli allevamenti esenti sono stati ricercati gli antigeni di Herpesvirus canino: solo un cucciolo è risultato positivo.

I sopralluoghi effettuati negli allevamenti hanno messo in evidenza strutture per lo più idonee, a parte in alcuni casi in cui i box del parto non erano particolarmente puliti; la gestione degli allevamenti è risultata buona, solo una cosa concettualmente sbagliata accomuna 6 degli 8 allevatori presi in esame: l'uso indiscriminato di antibiotici nella cagna prima del parto. Viene somministrato lo stesso principio attivo per ogni femmina gravida dell'allevamento, alcuni iniziano a somministrarlo a 3 giorni dal parto, altri a 5, altri scelgono di effettuare qualche giorno di terapia dopo la monta e a metà gravidanza.

Generalmente gli allevatori considerano normale la morte di qualche cucciolo neonato e quasi mai si preoccupano di indagarne le cause. Richiedono invece l'intervento del veterinario quando più soggetti di una cucciolata manifestano sintomi di malattia oppure muoiono, senza rendersi conto che la situazione a quel punto è già critica, tanto da rendere difficile l'applicazione di misure terapeutiche. I neonati muoiono rapidamente, presentando il più delle volte segni clinici aspecifici: cessano di alimentarsi, si lamentano, non aumentano di peso da un giorno all'altro; in questi casi solo un'adeguata terapia intensiva (fluidi per via intraossea, antibiotici) riesce talvolta a dare risultati (*Hoskins J.D., 2001*), mentre ben più incisivi risultano essere gli interventi di tipo preventivo, basati sulla corretta gestione dell'allevamento e della riproduzione. L'approccio diagnostico per comprendere le cause di un'eccessiva mortalità neonatale precoce comporta l'analisi approfondita dell'organizzazione e della storia riproduttiva dell'allevamento allo scopo di stabilire l'andamento della mortalità e rilevare elementi ambientali ad essa connessi, quali strutture inadeguate, specialmente nel settore destinato ai parti, scarsa igiene, inappropriate condizioni di temperatura e umidità (*Rota A. et al., 2007*). È importante verificare se il problema riguarda solo alcune fattrici, ed è fondamentale escludere patologie uterine o mammarie (*Blunden T., 1988*).

Pertanto l'indagine sui cuccioli morti è solamente uno degli elementi necessari (anche se forse uno dei più importanti) per comprendere le cause del problema (*Rota A., 2007*).

Nei neonati le infezioni batteriche sono una delle prime cause di malattia dei primi giorni di vita, e il latte materno non è la prima fonte di infezione (*Fontbonne A., 2006*).

L'utilizzo di antibiotici "preventivi" prima o dopo la monta o durante la gravidanza non è consigliabile, se non dopo aver effettuato un tampone vaginale e un antibiogramma sui batteri

riscontrati; l'uso indiscriminato di antibiotici in animali sani promuove la crescita di batteri opportunisti come *E. coli* o *Mycoplasma*; *Mycoplasma* spp. in particolare determinano nell'animale uno stato di portatore senza manifestazioni cliniche, finché nell'organismo non si verificano alterazioni del sistema immunitario che determinano immunosoppressione: le sequele di tale situazione sono solitamente la morte embrionale o fetale o i sintomi di malattia (Newell J.F., 2006).

L'antibiogramma e una terapia mirata hanno un provato effetto nell'eradicare i batteri della flora vaginale già dopo i primi due giorni di trattamento: al termine del trattamento la ricolonizzazione dei tessuti avviene in circa 4 giorni; gli antibiotici che è possibile usare in gravidanza non sono efficaci contro i micoplasmi e va considerata la possibilità che nel corso della cura antibiotica questi prendano il sopravvento sulla flora sensibile al trattamento (Newell J.F., 2006).

La normale flora batterica contiene geni che esprimono la resistenza agli antibiotici, tanto negli individui sottoposti a tali trattamenti, quanto negli individui a cui gli antibiotici non sono mai stati somministrati; è provato che negli individui sottoposti a cure antibiotiche si verificano maggiori resistenze (Sorum H, Sunde M, 2001).

La percentuale di mortalità neonatale è massima nella prima settimana di vita (Davidson A.P., 2003), con picchi in corrispondenza del primo e del terzo giorno post parto (Sager M., Remmers C., 1990).

Spesso le cause di morte vanno indagate tra i metodi di gestione dell'allevamento, delle fattrici, delle cucciolate; altre volte si tratta di cause soggettive, dipendenti dal sistema ormonale e immunitario della madre. Anche errori nell'alimentazione della madre possono influenzare la salute dei cuccioli: la gestante necessita di 1000UI/kg/die di vitamina A e un eccesso di tale elemento, ad esempio, predispone a mummificazione fetale o a problemi del sistema nervoso; oppure un'alimentazione ipolipidica nelle settimane precedenti il parto non permette ai feti di costituirsi delle riserve di glicogeno epatico sufficienti da impedire l'ipoglicemia neonatale, e li predispone quindi ad infezioni; e ancora, un eccesso proteico nella madre può determinare la "Swimming puppy syndrome", che, soprattutto nelle razze condrodistrofiche (Bulldog, Basset Hound..) determina un ritardo dell'ossificazione nel feto (Dumon C., 1998).

La “Sindrome del latte tossico” si verifica nei cuccioli a 5 ore dal parto: presentano depressione, un ano edematoso e violaceo, tenesmo e gemiti; è dovuta raramente ad una incompatibilità del latte materno e del cucciolo, molto più spesso la causa sono tossine batteriche prodotte da microrganismi come *E. coli*, streptococchi o stafilococchi che, probabilmente per carenze di Zinco o proteine prima del parto, colonizzano la mammella (Dumon C., 1998).

La media di cuccioli per cucciolata di un allevamento è, non solo il riflesso della fertilità delle fattrici, ma dipende anche dalla gestione dei soggetti e della riproduzione da parte dell'allevatore.

La cucciolata nelle specie multipare è il risultato del tasso di ovulazione, del numero di ovuli fecondati, della capacità uterina, e della sopravvivenza embrionale; il numero medio di cuccioli per cucciolata varia da razza a razza, e generalmente aumenta con l'aumentare della taglia; esiste una variazione individuale sul numero di cuccioli di una cucciolata che dipende per la maggior parte dalle caratteristiche genetiche della madre, e che ci permette di suddividere le fattrici in fertili e subfertili: queste vanno selezionate non solo per il numero medio di cuccioli per cucciolata, ma anche in base alle perdite neonatali, anch'esse probabilmente determinate in parte da una base genetica (Beuing R. et al., 2006).

La percentuale di mortalità perinatale è altamente variabile: generalmente è all'interno di un range che va da 5 a 35% in dipendenza di fattori quali l'andamento del parto, la presenza di distocia, il tempo e il tipo di interventi intercorsi durante il parto, fattori genetici, malformazioni, disturbi materni, stato delle vaccinazioni della madre, temperatura dell'ambiente, agenti infettivi (Munnich A., 2006). Alcune situazioni predispongono i cuccioli a infezioni:

TAb 11: Situazioni più comuni che predispongono i neonati a malattia (Munnich A., 2006).

Fattori predisponenti	Malattie
Sindrome da stress respiratorio	Infezioni batteriche
Ipoglicemia, disidratazione	Infezioni locali
ipotermia	Infezioni batteriche
Sindrome di tossicità da latte	Infezioni virali
Eventi traumatici	Sepsi

La sindrome da stress respiratorio causa il 60% delle morti perinatali ed è il risultato di problemi durante l'espulsione dei feti, ma può derivare anche dall'anestesia della madre in corso di cesareo. La condizione ipossica dei feti è dipendente da: taglia dell'animale, età dell'animale (è maggiormente riscontrata nelle primipare), durata dell'espulsione (il limite è 6 ore dalla rottura delle membrane fetali), l'uso di ossitocina, cesareo, durata del parto (Munnich A., 2006).

Anche anomalie congenite sono causa di perdita di cuccioli perché generalmente vengono sottoposti ad eutanasia se l'anomalia non è curabile, come nel caso di palatoschisi, idrocefalo, ernie ombelicali o diaframmatiche.

Le infezioni batteriche sono causa anch'esse di un'elevata mortalità in fase perinatale: le madri sono sospettate di esser la causa di infezione, ma molti cuccioli soccombono perché sono in atto altri meccanismi che li immunodeprimono.

Per quanto riguarda le infezioni virali, normalmente l'immunità colostrale protegge i cuccioli, perlomeno da quei virus con cui è venuta in contatto la madre; per garantire protezione ai cuccioli alla nascita, le madri andrebbero vaccinate contro Cimurro, Leptosirosi, Adenovirus, Parainfluenza, Parvovirus, *Bordetella* e andrebbe somministrato un antielmintico all'inizio e alla fine dell'estro e a metà gravidanza per ottenere dei cuccioli non infestati da Ascaridi (Convert G., 2006).

Nelle 21 cucciolate il tasso medio di mortalità intra cucciolata è stato del 39%, variabile dal 17% al 100%. In nessun caso l'indagine necroscopica ha rilevato malformazioni congenite.

Sono state effettuate le autopsie dei cuccioli di 8 delle cucciolate con problema di mortalità e solo 2 di queste presentavano cuccioli sterili; nei cuccioli morti nel post parto si è avanzata l'ipotesi di setticemia batterica e/o shock endotossico: la prima è stata confermata dall'isolamento di batteri patogeni da più visceri. In particolare sono stati isolati i seguenti microrganismi:

Batteri isolati	Frequenza
<i>Enterococcus</i>	3
<i>Staphilococcus coag negativo</i>	3
<i>S. canis</i>	2
<i>E. coli</i>	2
<i>S. intermedius</i>	2

<i>S. aureus</i>	1
<i>Streptococcus spp.</i>	1
<i>Klebsiella</i>	1
<i>Staphilococcus coag positivo</i>	1

Negli organi in cui l'esame batteriologico metteva in evidenza la presenza di batteri Gram-negativi, e considerato macroscopicamente il loro aspetto congesto, si è ipotizzato lo shock endotossico, il quale andrebbe però confermato con l'istopatologia dei tessuti.

Relativamente ai batteri isolati, essi sono molto simili a quelli già descritti in letteratura, ma molti di questi mostrano una preoccupante resistenza alla maggior parte degli antibiotici, risultato questo, probabilmente dovuto all'utilizzo poco razionale da parte degli allevatori di antibiotici prima del parto;

Staphilococcus intermedius è un componente della flora batterica oro-nasale e cutanea normale del cane (Allaker R.P. et al., 1992); generalmente non è considerato causa di setticemia neonatale, al contrario di *Staphilococcus aureus* (Sager M., Remmers C., 1990).

Tuttavia l'ingestione o l'inalazione di tale batterio da parte del neonato può costituire un elemento di rischio perché le tossine prodotte dal microrganismo possono aggravare condizioni patologiche o immunodepressione, abbassando la capacità di reazione dell'organismo (Schäfer-Somi S. et al., 2003). A causa della sua localizzazione sulla cute e sul capezzolo, *S. intermedius* può contaminare il latte e trovarsi sia nel tratto gastroenterico dei neonati senza causare particolari problemi, sia nei campioni di latte da analizzare, pur prelevati in condizioni di sterilità.

Lo stesso batterio può in alcuni casi essere un innocuo contaminante, in altri, un importante patogeno; in un caso da noi osservato per esempio, *S. intermedius* è stato isolato nel polmone, nel fegato e nel cervello di un cucciolo morto due giorni dopo il parto, situazione che ci fa fortemente sospettare ad una setticemia fatale; in un altro caso è stato isolato sia dal tampone vaginale pre parto, sia nel latte, ma nella cucciolata non si sono verificate morti.

Escherichia coli è stato considerato una causa importante di morte nei cuccioli (Beutin L., 1999), anche se si è concluso che il batterio colonizza animali deboli e stressati (Sager M., Remmers C., 1990).

Altri batteri isolati nel nostro studio sono notoriamente implicati nella setticemia neonatale, per esempio *Streptococcus canis* e ceppi di *E. coli* emolitico (Munnich A. et al., 1995).

Trattamenti antibiotici mirati e misure igieniche preventive possono essere efficaci per ridurre sia l'insorgenza di patologie, sia le perdite neonatali dei cuccioli (*Munnich A., Lubke-Becker A., 2004*); se infatti, prima del parto, a seguito di isolamento di batteri potenzialmente patogeni nella parte craniale della vagina e/o nel latte, le cagne vengono trattate con gli opportuni antibiotici si può ridurre la mortalità dei cuccioli (*Rota A. et al., 2007*).

4.3 CONCLUSIONI

Non esiste un'unica pratica igienica che possa prevenire tutte le innumerevoli malattie causate dai vari patogeni: il vapore rimane il disinfettante più efficace e più economico, ma deve venir in contatto con le superfici, da cui vanno rimossi tutti i residui organici (*Convert G., 2006*); se nell'allevamento sono presenti problematiche di tipo infettivo vanno identificati i patogeni ambientali e va istituita una disinfezione mirata; l'uso indiscriminato di disinfettanti, come quello di antibiotici, non fa che selezionare popolazioni batteriche o virali sempre più resistenti.

In questo lavoro le significatività statistiche non sono rilevanti: probabilmente il numero di campioni disponibili è limitato; ritengo però che con questo tipo di studio si siano aperte molte strade: l'anamnesi di un allevamento spesse volte, in caso di problemi di fertilità è molto più significativa della singola ricerca della causa precisa che determina elevata mortalità nei cuccioli: spesso, maggior attenzione alla pulizia dell'ambiente, l'alternanza periodica dei disinfettanti utilizzati, l'osservanza delle comuni regole che garantiscono il benessere animale possono determinare notevoli miglioramenti sulla performance riproduttiva dell'intero allevamento, molto più che ingiustificate cure antibiotiche che mascherano, sulla singola fattrice, gli effetti di una cattiva gestione dell'allevamento, ma che a lungo andare comportano la selezione di microrganismi sempre più virulenti che andranno ad approfittare delle condizioni fisiche di femmine debilitate.

La convinzione che spesso la causa di malattia sia un agente patogeno piuttosto che un altro è a mio avviso sbagliata quando si parla di allevamento, in cui molteplici sono i fattori e le variabili che condizionano la sopravvivenza di una cucciolata.

Maggior interesse degli allevatori per quegli aspetti che riguardano non soltanto l'igiene, ma a la naturalezza della condizione in cui vivono le fattrici può essere un punto di partenza per il realizzarsi di un obiettivo comune.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Allaker R.P., Jensen L., Lloyd D.H., Lamport A.I.: "Colonization of Neonatal puppies by staphylococci." In *British Veterinary Journal*, N.148, 1992, pagg.523-528.
- 2) Anvik JO: "Clinical considerations of canine herpesvirus infection." In *Veterinary Medicine*, N.86, 1991, pagg. 394-403.
- 3) Barsanti J, Finco D: "Canine prostatic disease." In *Current therapy in Theriogenology* 2, Morrow D(Ed), WB Saunders, Philadelphia, 1986, pag.544.
- 4) Beach FA, Merari A.: "Coital behavior in dogs. Effects of estrogen and progesterone on mating and other forms of social behavior in the bitch." In *Journal of Comparative Physiology and Psychology*, N. 70(1), 1970, pagg.1-22.
- 5) Beccaglia M, Luvoni GC: "Comparison of the accuracy of two ultrasonographic measurements in predicting the parturition date in the bitch." In *Journal of Small Animal Practice*, N.5, 2006, pagg. 1-4.
- 6) Bertrand M. : "Psychisme et infertilité dans l'espèce canine" In *Pratique Medical et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie*, N.24(3), 1989, pagg. 243-251.
- 7) Beuing R., Jassen N., Brand H.: "Analysis of fertility in canine population in respect to genetic and environmental influences." In *Proceedings of 5th Biannual Congress of EVVSAR*, 7-9 April 2006, Budapest, Hungary.
- 8) Beutin L.: "*Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats." In *Veterinary Research*, N.30, 1999, pagg.285-298.
- 9) Bledinger K. "The estrous cycle in the bitch" In *Atti del 56th congresso SCIVAC*, Rimini, Giugno 2007, pagg.103-114.
- 10) Blunten T.: "Diagnosis and treatment of common disorders of new born puppies." In *Practice*, N.10, 1988, pagg. 175-184.
- 11) Bjustorm L., Linde-Forsberg C.: "Long-term study of aerobic bacteria of the genital tract in breeding bitches." In *American Journal of Veterinary Research*, N.53, 1992, pagg. 665-669.
- 12) Bjurstrom L. "Aerobic bacteria occurring in the vagina of bitches with reproductive disorders." In *Acta Veterinaria Scandinavica*, N. 34, 1993, pagg. 29-34.
- 13) Bolin CA: "Diagnosis of leptospirosis: a reemerging disease of companion animals", In *Seminars in Veterinary Medicine and Surgery (Small Animals)*, N.11(3), 1996, pagg.166-171.

- 14) Bondestam S, Karkkainen M, Alitao L, Forss M: "Evaluating the accuracy of canine pregnancy diagnosis and litter size using real-time ultrasound." In *Acta Veterinaria Scandinavica*, N. 25, 1984, pagg. 327-32.
- 15) Bulgins MS, Ward ACS et al.: "Abortion in the dog due to *Campylobacter* spp." In *American Journal of Veterinary Research*, N. 45(3), 1984, pagg. 555-556.
- 16) Burke TJ: "Causes of infertility." In *Small Animal Reproduction and Infertility: A Clinical Approach to Diagnosis and Treatment*. Lea and Febiger, Philadelphia, 1986, pagg. 399-480.
- 17) Cain JL: "A logical approach to infertility in the bitch." In *Veterinary Clinic of North America, Small Animal Practice*, Vol. 31 n 2, march 2001(a), pagg. 237-245.
- 18) Cain JL: "An overview of canine reproduction services." In *Veterinary Clinic of North America, Small Animal Practice*, Vol. 31 n 2, march 2001(b), pagg. 209-217.
- 19) Concannon P.W. "Understanding and monitoring canine pregnancy." In *Proceedings of the 30th World Congress of the WSAVA*, May 11-14, 2005, Mexico-City, Mexico.
- 20) Concannon P.W., England G., Verstegen III J. and Linde-Forstberg, "Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations" In *International Veterinary Information Service*, Ithaca NY (www.ivis.org), 2002, Documento N.A1231.0602
- 21) Convert G.: "Kennel caught in breedings." In *Proceedings of the 5th biannual Congress of EVVSAR*, 7-9 April 2006, Budapest, Hungary.
- 22) Davidson A.P.: "Current concepts on infertility in the bitch", In *WALTHAM Focus*, Vol. 16 n°2, [s.i.], 2006, pagg 13-21.
- 23) Davidson A.P.: "Approaches to reducing neonatal mortality in dogs" In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ithaca, NY, 2003, documento IVIS N. A1266.0303.
- 24) Doig PA, Ruhnke HL, Bosu WTK "The genital mycoplasma and ureaplasma flora of healthy and diseased dog" In *Canadian Journal of Comparative Medicine*, N.45, July 1981, pagg. 233-238.
- 25) Dow C: "Ovarian abnormalities in the bitch." In *Journal of Comparative Pathology*, N.70, 1960, pagg. 59-70.
- 26) Dumon C.: "Mortalitè neonatale." In *Proceedings of the 1st EVVSAR Congress*, 1-3 May 1998, Barcelona.
- 27) Eilts BE: "The canine breeding soundness examination form: its practical role in your clinic." In *American College of Theriogenology and Society for Theriogenology*, Proceedings of Canine Male Symposium, Montreal, Canada, 1997, pag. 37.

- 28) England G, Concannon PW: "Determination of the optimal breeding time in the bitch: basic considerations." In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ithaca, 2002, documento IVIS N. A1231.0602.
- 29) England G, Yeager A and Concannon PW, "Ultrasound imaging of the reproductive tract of the bitch" In *Recent Advances in Small Animal Reproduction*, Ithaca NY, 2003,documento IVIS n. A1203.0703.
- 30) England GCW "Ultrasonography assessment of abnormal pregnancy." In *Veterinary Clinic of Small Animal Practice*, Vol.28 N.4, July 1998, pagg.849-864.
- 31) England GCW, Allen E, Porter DJ: "Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of conceptus and determination of gestational age." In *Journal of Small Animal Practice*, N. 31, 2004, pagg.324-329.
- 32) England GCW: "Small animal reproductive ultrasonography." In Gottard PJ (ed): *Veterinary Ultrasonography*, London CAB international, 1995, pag.55.
- 33) Evans JM et al, "The book of the bitch: a complete guide to understanding and caring for bitches", [s.i.], 1988.
- 34) Feldman EC, Nelson RW: "Canine female reproduction." In *Canine and Feline Endocrinology and Reproduction*. Philadelphia, WB Saunders, 1987, pagg. 399-480.
- 35) Feldman EC, Nelson RW: *Canine and feline endocrinology and reproduction*. Ed. WB Saunders, Philadelphia, 2003.
- 36) Freshman JL "Clinical approach to infertility in the cycling bitch" In *Veterinary Clinic of North America, Small Animal Practice*, N.21(3)1991, pagg.427-435.
- 37) Freshman JL, "Clinical management of the subfertile stud dog." In *Veterinary Clinic of North America, Small Animal Practice*, Vol.31 N.2, March 2001, pagg.259-269.
- 38) Freshman JL, Olson PN, Amann RP, et al.: "The effects of methyltestosterone in male greyhounds." In *Theriogenology*, N.33, 1990.
- 39) Freshman JL: "Drugs affecting fertility in the male dog." In Kirk(Ed): *Current veterinary therapy X*. Philadelphia, WB Saunders, 1989, pag.1224.
- 40) Gandotra V.K., Prabhakar S., Dwivedi P.N., et al.: " Infectious infertility in bitches- identification and in vitro drug sensitivity of the pathogens." In *Indian Veterinary Journal*, n.69, 1992, pagg.619-622.
- 41) Goodman M. "Ovulation Timing, concepts and controversies." In. *Veterinary Clinic of North America, Small Animal Practice*, Vol.31 N.2, March 2001, pagg. 219-233.

- 42) Greene CE: "Chlamidial infection." In Greene: *Infection disease of the dog and the cat*, 2nd ed. WB Saunders, Philadelphia, 1998, pagg.172-174.
- 43) Guardabassi L., Schwarz S., Lloyd D. H. "Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria." In *The Journal of Antibacterial Chemotherapy*, N.54, 2004, pagg.321-32.
- 44) Guigal PM, Fontbonne A, Grandjean D et al.: "Prevalence of antibodies against herpesvirus in french breeding kennels." In 3rd EVSSAR European Congress Liège (Belgium), May 10-12, 2002.
- 45) Hirsch DC and Wiger N: "The bacterial flora of the normal canine vagina compared with that of vaginal exsudates." In *Journal of Small Animal Practice*, N.18(1), 1977, pagg.25-30.
- 46) J.F. Newell "Success with frozen semen: brood bitch management." Proceedings of the North America Veterinary Conference, Orlando, Florida, JANUARY 17-21, 2004.
- 47) Johnson C. "Current concepts on infertility in the dog." In *WALTHAM focus*, Vol.16 N.2, [s.i.], 2006, pagg.7-12.
- 48) Johnson C.A.: "The effect of maternal illness on perinatal health." In *Veterinary Clinic of North America, Small Animal Practice*, N.17, 1987, pagg.1335-1338.
- 49) Johnston S. D. "Clinical approach to azoospermia in dogs" Proceedings of the 28th Congress of the WSAVA, October 24-27, Bangkok, Thailand, 2003.
- 50) Johnston S.D., Root-Kustritz M.V. and Olson P.N.S.: *Canine and Feline Theriogenology*, WB Saunders, Philadelphia, 2001, pag.592,257-273.
- 51) Johnston SD: "Clinical approach to infertility in the Bitch." Proceedings of the 51st Annual Meeting Proceedings of AAHA,[s.i.],1984, pagg. 423-425.
- 52) Johnston SD: "Diagnostic and therapeutic approach to infertility in the bitch." In *Journal of the American Veterinary Medical Association*, N.176, 1980, pagg.1335-1338.
- 53) Jones DE, Joshua JO: "Infertility." In *Reproductive Clinical Problems in the Dog*, 2nd Ed., UK, Butterworths, 1988, pag.187.
- 54) Konrad Blendinger "Il ciclo estrale nella cagna." Proceedings of the 48th SCIVAC congress, Rimini, 2007.
- 55) Kustritz M.V. "Collection of tissues and culture samples from the canine reproductive tract." In *Theriogenology*, N.66, 2006, pagg. 567-574.
- 56) Kustritz M.V.: "Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog." In *Theriogenology*, N.64, 2005, pagg. 755-765.

- 57) Hoskins J. D.,: "Puppy and kitten losses." In *Veterinary Pediatrics. Dogs and Cats from Birth to six months*, WB Saunders, Philadelphia, 2001, pagg. 57-61.
- 58) L.Fekete S. et al.: "Fertile estrus induced in bitches by bromocriptine, a dopamine agonist: a clinical trial." In *Theriogenology*, N.55, 2001, pagg.1657-1666.
- 59) Levy S. B., Chadwick, D.J., Goode, J.: "Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread." Ed. Chichester John Wiley & Sons, 1997, pagg.1-14.
- 60) Linde-Forsberg C. and Bolse G. "Canine genital mycoplasmas and ureaplasmas. " In Bonagura and Kirk: *Kirk's current veterinary therapy XII. Small Animal Practice* , WB Saunders, Philadelphia, 1995, pagg.1090-1094.
- 61) Lloyd D.H.: "Quando lo staphilococco si comporta da patogeno." Atti del 48th congresso SCIVAC, Rimini, 2007.
- 62) Luchetti E., Pasquini A., Rota A., Cardini G. "Il dosaggio del progesterone sierico nella specie canina: tre metodi a confronto" In *Journal of small animal practice*, N.4, 2005, pagg.10-14.
- 63) Malandain E., Fontbonne A., "The Royal Canin Cut-out and Keep Guide...Vaginal smears in bitches" In *WALTHAM Focus*, Vol 16, N 2, 2006, pagg.39-40.
- 64) Malmo J., "Anomalie dell'apparato riproduttivo." In *Manuale Merk Veterinario*, 8th edizione, Merk & Co. inc., Whitehouse station, NJ, USA, 2003, pagg.1018-1031.
- 65) Mannion P "Diagnostic ultrasound in small animal practice", ed. Blackwell, 2006.
- 66) Mateu de Antonio, Delgado S et al. " L'infection à Brucella chez le chien en Espagne." In *Recueil de médecine veterinaire* , N.174, 1998, pagg.6-9.
- 67) Mimouni P: « Mycoplasmaes et pathologie de la reproduction chez le chien. » In *Le Point Veterinaire* , N. 28(180), 1999, pagg.789-792.
- 68) Myers LJ, Nusbaum KE, Swango LJ, et al.: "Disfunction of sense of smell caused by canine parainfluenza virus infection in dogs." In *American Journal of Veterinary Research*, N. 49, 1988, pag.188.
- 69) Munnich A., Grubel T., Leopold T.H.: "Experiences in diagnosis and treatment of diseases in new born puppies." In *Tieraraztliche Praxis*, N.23, 1995, pagg.497-501.
- 70) Munnich A., Lubke-Becker A.: "*Escherichia coli* infection in new born puppies-clinical and epidemiological investigation." In *Theriogenology*, N.62, 2004, pagg.562-575.
- 71) Nelson R.W., Couto C.G.: *Small animal internal medicine*, 3rd ed., Ed. Elsevier, Torino, 2003.
- 72) Newell J.F.: "Success with frozen semen: brood bitch management." In *NAVC Proceedings 2006*, North American Veterinary Conference (Eds.), Ithaca, NY, 2006.

- 73) Okkens AC, Bevers MM et al.: "Fertility problems in the bitch." In *Symposium of Canine and Feline Reproduction, Animal Reproduction Science*, N.28, 1992, pagg.379-387.
- 74) Okuda Y, Ishida K, Hashimoto A et al.: "Virus reactivation in bitches with a medical history of herpesvirus infection." In *American Journal of Veterinary Research*, N.54, 1993, pagg.551-4.
- 75) Olson PN, Thomas TN, Husted PW, et al.: "Clinical evaluation of infertility in the bitch." In *Clinical signs and diagnosis in small animal practice*. Ed. Ford RB, New York, Churchill Livingstone, 1988, pp 631-654.
- 76) Olson PNS: "Canine vaginal flora." MS Thesis, University of Minnesota, 1976.
- 77) Olson P.N., Mather E.C.: " Canine vaginal and uterine bacterial flora." In *American Journal of Veterinary Medicine Association*, N.172, 1978, pagg. 708-711.
- 78) P.A.Doig, H.L.Ruhnke and W.T.K. Bosu, "The genital mycoplasma and ureaplasma flora of healthy and diseased dog." In *Canadian Journal of Comparative Medicine*, N. 45, 1981, pagg.233-238.
- 79) Patel A., Lloyd, D. H., Lamport, A. I.: *Advances in Veterinary Dermatology*, Vol.4, Ed. Blackwell Science, Oxford, 2002, pagg. 85-91.
- 80) Poli G, Cocilovo A.: *Microbiologia e immunologia veterinaria*. Ed. UTET, Bologna, 2001.
- 81) Poulet H, Guigail PM, Soulier M et al.: "Protection of puppies against canine herpesvirus by vaccination of the dams." In *Veterinary Research*, N. 148(22), 2001, pagg.691-5.
- 82) Purswell BJ, Wicke JR: "Use of GnRh in the intact male dog." Proceedings of the annual meeting of the Society for Theriogenology, San Antonio, 1992, p 140.
- 83) Quinn P.J.: *Clinical Veterinary Microbiology*. Ed.Mosby Year Group, USA, 1994.
- 84) RM Brown: "Canine Infertility, a silent threat of mycoplasma infection." Jackson Area Pet Hospital, LLC, Jackson, Working retriever. Com, 2007.
- 85) Root-Kustritz MV, Johnston SD: "Artificial insemination in the bitch." In Bonagura JD (Ed): *Kirk's Current Veterinary Therapy XIII. Small Animal Practice*. Philadelphia WB, Saunders, 2000, p 916.
- 86) Rota A., Corro' M., Cavicchioli L. et al.: " Mortalità neonatale nel cane: cause e difficoltà diagnostiche." In *Praxis Veterinari*, Vol.27, N.4, 2007, pagg.9-14.
- 87) Sager M., Remmers C., "Some aspects of perinatal mortality in the dog. A clinical, bacteriological and pathological study." In *Tierarztliche Praxis*, N.18, 1990, pagg.415-419.

- 88) Schafer-Somi S., Spergser J., Breitenfellner J., Aurich J.E.: "Bacteriological status of canine milk and septicaemia in neonatal puppies-A retrospective study." In *Journal of Veterinary Medicine B*, N.50, 2003, pagg.343-346.
- 89) Sodikoff C.H.: *Medicina di laboratorio del cane e del gatto*, Ed. Veterinarie Masson, Milano,1997, pag.37.
- 90) Sorum H., Sunde M.: "Resistance to antibiotics in normal flora of the animals." In *Veterinary Research*, N.32, 2001, pagg. 227-241.
- 91) Sturgess CP: "Listerial abortion in the bitch." In *Veterinary Research*, N. 124(7), 1989, pagg.177.
- 92) Van Duijkeren E.: "Significance of the vaginal bacterial flora in the bitch: a review." In *Veterinary Research*, N. 131(16), 1992,pagg. 367-369-435.
- 93) Verstegen J, Onclin K et al.: "Early termination of anestrus and induction of fertile estrus in dogs by the dopamine super-agonist carbegoline." In *Biology of Reproduction Suppl.*,vol.50, 1994, pag.157.
- 94) Verstegen J. "Estrous control in the bitch" Proceedings of the 27th WSAVA congress, Liege, Belgium, 2002.
- 95) Watson, A.D.J., Maddison J.E. and Elliott J.: "Antibacterial Drugs." In: *Canine Medicine and Therapeutics*, Ed. Blackwell, Oxford, pagg. 53-72.
- 96) Watts JR, Whright PJ and Whitbear KC : "Uterine, cervical and vaginal microflora of the normal bitch throught the reproductive cycle." In *Journal of Small Animal Practice*, N.37, 1996, pagg. 54-60.
- 97) Wilkinson B.J.: *The staphylococci in human diseases*. Ed. Churchill Livingstone, New York, 1997, pagg. 1-38.
- 98) Wright P and Watts JR " The infertile female" in England and Harvey *BSAVA Manual of small Animal Reproduction and Neonatology*, BSAVA Ed., 1998.
- 99) Zoldag L, Fekete S et al.: "Fertile estrus induced in bitches by bromocriptine, a dopamine agonist: a clinical trial." In *Theriogenology*, N.55, 2001, pagg.1657-1666.