



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dip. di Medicina Animale, Produzioni e Salute

Corso di laurea magistrale a ciclo unico in  
MEDICINA VETERINARIA

Accuratezza nella predizione della data del parto in  
cagne di razza Pastore Tedesco mediante misurazione  
dei parametri ecografici fetali ed extra-fetali

Relatore

Dott. Chiara Milani

Correlatore

Dott. Juri Vencato

Laureanda:

Emmanuela Micheli

Matricola n.

593694

ANNO ACCADEMICO 2013 - 2014



## INDICE

1. RIASSUNTO/ABSTRACT.....	1-2
2. INTRODUZIONE.....	3-24
2.1. Ciclo riproduttivo e accoppiamento nel cane.....	3-5
2.2. Durata della gravidanza.....	5-6
2.3. Fattori di variabilità della durata della gravidanza.....	7
2.4. Utilità della conoscenza del giorno del parto.....	7-8
2.5. Metodi per predire la data di parto.....	8-17
2.6. Esame ecografico.....	18-24
2.6.1. Rilevazioni all'esame ecografico durante la gravidanza.....	18-20
2.6.2. Vantaggi e svantaggi dell'esame ecografico.....	21
2.6.3. Datazione del parto con l'ecografia.....	22-24
3. SCOPI DEL LAVORO.....	25
4. MATERIALI E METODI .....	27-33
4.1. Impianto dello studio.....	27-33
4.2. Analisi statistica.....	33
5. RISULTATI.....	35-40
6. DISCUSSIONE.....	41-45
7. CONCLUSIONI.....	47
8. BIBLIOGRAFIA .....	49-54



## 1. RIASSUNTO

La gravidanza della cagna ha una durata molto variabile dall'accoppiamento al parto ed è compresa tra 57-72 giorni (Concannon et al., 1983). È importante conoscere con anticipo la data di parto per assistere l'animale durante il travaglio ed eseguire un taglio cesareo programmato (Smith, 2007). La misurazione ecografica di diversi parametri fetali ed extra-fetali permette di determinare con una buona accuratezza l'età gestazionale e di calcolare la data di parto. Lo scopo di questo lavoro è confrontare l'accuratezza di alcuni parametri ecografici nella stima dell'età gestazionale e stabilire se questa è influenzata dalla conoscenza del giorno dell'ovulazione. I soggetti studiati sono femmine di razza Pastore Tedesco e sono stati divisi in GRUPPO 1 (animali con ovulazione nota) e GRUPPO 2 (ovulazione non nota). Sono stati misurati i parametri ICC, CRL, BD, BP e DPTV. Per ciascuno di questi si è calcolata l'età gestazionale grazie alle rette di regressione definite da Milani et al. (2011). I valori così ottenuti sono stati confrontati con quelli reali, ottenendo degli errori di stima per ciascun parametro. Dai risultati emerge che ICC è il parametro più accurato, mentre tra gli altri non sono emerse differenze significative. Inoltre non risultano differenze nell'accuratezza tra GRUPPO 1 e 2; ciò indica che è possibile utilizzare le misure ecografiche per calcolare l'età gestazionale in animali di cui non si conosce la storia clinica. Le equazioni di riferimento per ICC, BP e BD sono affidabili nel calcolo dell'età gestazionale, perché presentano un basso errore (ICC: per GRUPPO 1 =  $0,27 \pm 0,471$  giorni e per GRUPPO 2 =  $0,72 \pm 0,41$  giorni; BP: per GRUPPO 1 =  $2,06 \pm 1,39$  giorni e per GRUPPO 2 =  $0,94 \pm 0,77$  giorni; BD: per GRUPPO 1 =  $1,92 \pm 0,59$  giorni e per GRUPPO 2 =  $1,07 \pm 0,40$  giorni). CRL e DPTV sono i parametri che presentano un errore maggiore e le loro rette di riferimento sono sovrastimate rispetto all'età gestazionale reale (CRL: per GRUPPO 1 =  $1,85 \pm 1,49$  giorni e per GRUPPO 2 =  $3,34 \pm 2,02$  giorni; DPTV: per GRUPPO 1 =  $4,67 \pm 1,36$  giorni e per GRUPPO 2 =  $3,59 \pm 3,13$  giorni).

## 1. ABSTRACT

The duration of canine pregnancy from breeding to parturition has a high variability, ranging from 57-72 days (Concannon et al., 1983). An accurate prediction of the day of parturition allows to assist the animal during the delivery and to plan a cesarean section (Smith, 2007). The ultrasonographic measurement of foetal and extra-foetal parameters is useful to determinate the gestational age with a good accuracy and also to calculate the day of the delivery. The present study was designed in order to compare the accuracy of ultrasonographic parameters in calculating gestational age and in order to see if the accuracy is influenced by the knowledge of the ovulation day. We studied German shepherd bitches divided into GROUP 1 (animals with known ovulation day) and GROUP 2 (animals without known ovulation day). We took into account the parameters ICC, CRL, BD, BP e DPTV; for each one we calculated the gestational age using the equations defined by Milani et al. (2011). The values thus obtained were compared to the real values, obtaining an error for each parameter. The results showed that ICC is more accurate than BP, BD, CRL and DPTV, while no difference was found between the other parameters. No significant differences in the accuracy of prediction of gestational age between the two groups are described; that means it is possible to use ultrasonography to evaluate gestational age in dogs without a known ovulation day in their clinical history. The equation for ICC, BP and BD are accurate, because they show a low error (ICC: for GROUP 1 =  $0,27 \pm 0,471$  days and for GROUP 2 =  $0,72 \pm 0,41$  days; BP: for GROUP 1 =  $2,06 \pm 1,39$  days and for GROUP 2 =  $0,94 \pm 0,77$  days; BD: for GROUP 1 =  $1,92 \pm 0,59$  days and for GROUP 2 =  $1,07 \pm 0,40$  days). CRL and DPTV have the highest error and their equations are overestimated compared to the real gestational age (CRL: for GROUP 1 =  $1,85 \pm 1,49$  days and for GROUP 2 =  $3,34 \pm 2,02$  days; DPTV: for GROUP 1 =  $4,67 \pm 1,36$  days and for GROUP 2 =  $3,59 \pm 3,13$  days).

## **2. INTRODUZIONE**

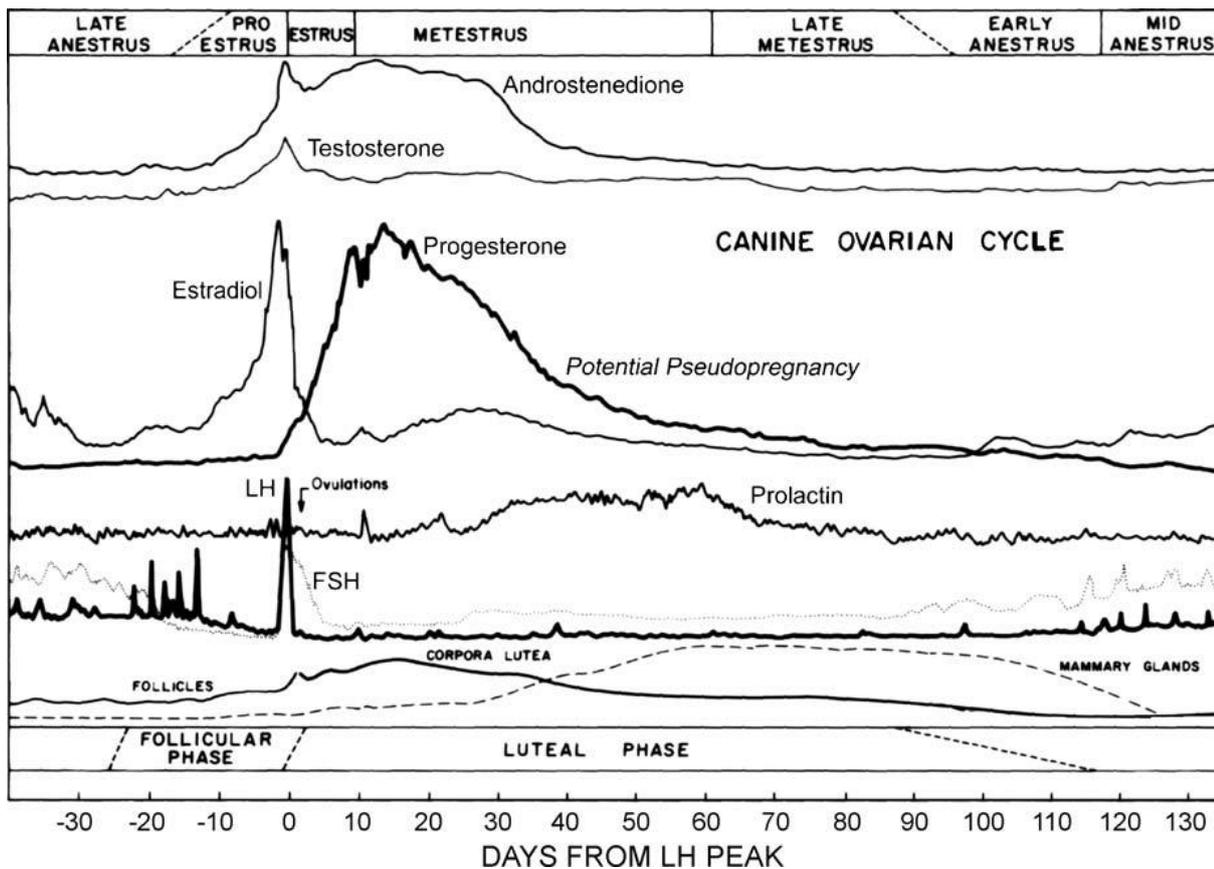
### **2.1. Ciclo riproduttivo e accoppiamento nel cane**

La cagna è un animale monoestrale non stagionale, cioè presenta un solo ciclo estrale ad ogni stagione sessuale, ma è ormai perso ogni riferimento ad una stagione riproduttiva ben precisa a causa della sua addomesticazione (Gavrilovic et al., 2008; Concannon, 2009; Concannon, 2011).

Il ciclo estrale della cagna è suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, diestro ed anestro (Fig. 2.1). Il proestro ha una durata variabile tra i 5 e i 20 giorni ed è caratterizzato dalla presenza di perdite vulvari emorragiche e vulva arrossata ed edematosa (De Gier et al., 2006; Concannon, 2011). In questa fase la femmina attira le attenzioni dei maschi, ma non accetta la monta. L'estro ha una durata variabile tra i 3 e i 21 giorni (Concannon et al., 1989; Kutzler et al., 2003; De Gier et al., 2006) e coincide col periodo in cui la femmina è disponibile all'accoppiamento. Anche in questa fase si riscontrano delle perdite vulvari, che di solito sono più chiare rispetto al proestro. Il diestro (anche detto metestro) inizia quando la femmina smette di manifestare un comportamento estrale, cioè quando non accetta più il maschio. In questa fase le perdite vulvari sono in genere cessate. La durata del diestro può variare da 50 a 80 giorni (Concannon et al., 1975; Concannon, 2011). L'anestro rappresenta il periodo di riposo dell'attività ovarica e dura in media 3-5 mesi, ma può variare tra i 2 e i 10 mesi o anche più (Concannon et al., 1975; De Gier et al., 2006; Concannon, 2009). La sua durata segna l'intervallo tra il diestro e l'inizio delle perdite vulvari del proestro successivo. L'intervallo tra cicli estrali successivi nella cagna varia da 140 a 300 giorni, circa 5-12 mesi, con una media di 7-8 mesi (Concannon et al., 1975; Concannon, 2009).

Da un punto di vista ormonale, il ciclo estrale della cagna è regolato dagli stessi ormoni sessuali che influenzano il ciclo riproduttivo della donna e degli altri animali d'interesse veterinario (Fig. 2.1).

Figura 2.1 - Ciclo estrale della cagna e variazioni dei diversi ormoni (Concannon, 2011).



Nella cagna si ha un iniziale aumento di FSH e LH durante il proestro e ciò induce uno sviluppo follicolare molto intenso (Fig. 2.1). I follicoli cominciano a produrre estrogeni che inizialmente, essendo a basse concentrazioni, agiscono a feedback negativo sull'ipofisi e sull'ipotalamo, inibendo la produzione di LH e FSH. Aumentando di dimensioni, i follicoli producono quantità sempre maggiori di estrogeni, che esercitano un feedback positivo su ipotalamo e ipofisi, stimolando quindi un rilascio massiccio di LH (Sherwood et al., 2006; De Gier et al., 2006). Il picco degli estrogeni provoca l'insorgenza del picco di LH e avviene in genere da 0 a 3 giorni prima di quest'ultimo (Fig. 2.1) (Concannon et al., 1975; Concannon et al., 1997; De Gier et al., 2006; Concannon, 2009). In concomitanza col picco di LH possiamo notare un iniziale aumento nei valori sierici del progesterone (P4), che nella cagna induce una luteinizzazione delle cellule follicolari prima dell'ovulazione (Fig.2.1) (Concannon et al., 1975; Hase et al., 2000; De Gier et al., 2006; Renton et al., 1991; Concannon, 2009). L'ovulazione è indotta dal picco di LH e avviene approssimativamente 1-3 giorni dopo questo picco (Phemister et al., 1973; Wildt et al., 1978; Concannon et al., 1997; Hase et al., 2000; Mir et al., 2011). L'oocita appena ovulato non è pronto per la fecondazione perché si trova ancora nella prima fase della meiosi (Phemister et al., 1973; Hase et al., 2000) e deve compiere sia la prima sia la seconda divisione meiotica ed espellere entrambi i globuli polari che si formano durante questa trasformazione. Questo avviene entro 3

giorni dall'ovulazione (approssimativamente 60 ore dopo l'ovulazione) ed entro 5 giorni dal picco di LH (Phemister et al., 1973; Hase et al., 2000). La cellula uovo dopo la sua maturazione resta fertile per circa 2 giorni, quindi fino a 5 giorni dopo l'ovulazione (Hase et al., 2000). Da questo ne consegue che il periodo migliore per l'accoppiamento è 3-5 giorni dopo l'ovulazione, cioè 4-7 giorni dopo il picco di LH, quando cioè l'oocita ha già compiuto il suo processo di maturazione ed è ancora fertile (Hase et al., 2000; Moxon et al., 2012).

## **2.2. Durata della gravidanza**

Nella cagna la durata della gestazione dal momento dell'ovulazione al parto è di  $63 \pm 1$  giorni (Son et al., 2001; Luvoni e Beccaglia, 2006; Seki et al., 2010), mentre dal picco di LH al parto è di  $65 \pm 1$  giorni (Mir et al., 2011; Kutzler et al., 2003; Kim et al., 2007; Seki et al., 2010; Concannon et al., 1983; Eilts et al., 2005), considerando che il picco di LH avviene circa 2 giorni prima dell'ovulazione. Questi dati sono abbastanza costanti e ripetibili, quindi la durata della gravidanza da questi due momenti ha una variabilità molto bassa.

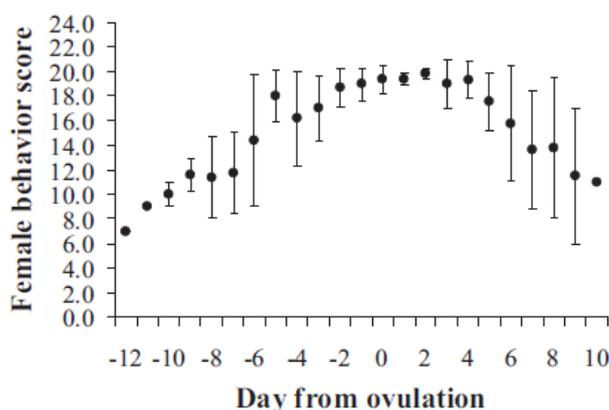
Al contrario la gravidanza considerata dal momento dell'accoppiamento al parto ha una durata molto incostante, ed è in media di 65 giorni circa, variando tra i 57 e i 72 giorni dopo accoppiamenti multipli, tra i 58-69 giorni dopo un singolo accoppiamento (Concannon et al., 1983; Kutzler et al., 2003; Jutkowitz, 2005). È evidente che 13 giorni di variabilità su una durata di gestazione di circa 2 mesi sono un intervallo molto ampio. Questo non avviene nelle altre specie, nelle quali la variabilità è molto inferiore se considerata la durata complessiva della gestazione. Questa differenza è causata da alcune particolarità riproduttive della specie canina. Innanzitutto i gameti maschili restano vitali nelle vie genitali femminili molto a lungo. Doak et al. (1967) hanno dimostrato la presenza di spermatozoi motili nell'utero in numero non diminuito rispetto all'eiaculato fino a 4-6 giorni dopo un singolo accoppiamento. Col passare del tempo il numero di spermatozoi motili diminuisce, ma si possono ritrovare fino all'11° giorno dopo la monta (Doak et al., 1967). Holst e Phemister (1974) hanno constatato che gli spermatozoi canini restano fertili nelle vie genitali femminili per circa 7-10 giorni.

Inoltre la femmina resta recettiva al maschio per un intervallo di tempo molto lungo e variabile. In media l'inizio dell'estro avviene 1-3 giorni dopo il picco di LH e l'ovulazione avviene 1,5-2 giorni dopo il picco di LH, quindi di solito la cagna ovula nei primi giorni dell'estro (Phemister et al., 1973; Concannon et al., 1983; Concannon et al., 1997; Hase et al., 2000). Tuttavia questi dati sono indicativi, poiché nella cagna il comportamento sessuale è molto variabile tra i diversi individui e non è correlabile a un determinato stadio del ciclo estrale (Luvoni e Beccaglia, 2006; Kim et al., 2007). Nello studio di Moxon et al. (2012) sono stati presi in considerazione

diversi comportamenti della femmina quando presentata al maschio ed a ciascuno sono stati assegnati dei punteggi (Tab. 2.2).

**Tabella 2.2 – Tratti comportamentali della femmina quando è presentata al maschio e risultati (Moxon et al., 2012)**

Comportamento	Punteggio				
	1	2	3	4	5
<b>Interesse nei confronti del maschio</b>	Guarda il maschio, ma non si avvicina	Scappa o mostra resistenza nell'approccio al maschio con atteggiamento di sottomissione	Approccia il maschio con interesse mantenendo un comportamento di non sottomissione	Approccia il maschio e gioca	Approccia il maschio e cerca attivamente la sua attenzione mostrando la regione ano-genitale e stando immobile
<b>Deviazione della coda</b>	Non è deviata	Leggero movimento della coda	Coda deviata lateralmente a meno di 45°	Coda deviata lateralmente a più di 45°	Coda deviata lateralmente a più di 45° con lordosi
<b>Permette al maschio di avvicinarsi/ annusare/ leccare la regione anogenitale</b>	Non permette al maschio di avvicinarsi	Permette al maschio di avvicinarsi e di annusarla	Permette al maschio di annusare la regione ano-genitale	Permette al maschio di annusare e leccare la regione ano-genitale	Incoraggia il maschio a annusare e leccare la regione ano-genitale mentre sta immobile
<b>Resistenza al maschio</b>	Mostra aggressività nei confronti del maschio	Mostra comportamento di sottomissione e di fuga	Periodi di accettazione con momenti di allontanamento dal maschio	Gioca col maschio permettendo accesso intermittente alla regione ano-genitale	Permette al maschio di annusare, leccare, montare ripetutamente



I risultati hanno confermato che il comportamento sessuale della cagna non è associato ad un particolare stadio del ciclo. Infatti il momento in cui la femmina mostra la massima recettività (punteggio di 20) varia tra i diversi animali e può manifestarsi tra i 6 giorni prima e i 6 giorni dopo l'ovulazione. Inoltre molte femmine sono recettive anche molto prima e dopo il periodo fertile. Al contrario alcune non manifestano mai la massima recettività.

### **2.3. Fattori di variabilità della durata della gravidanza**

La durata della gravidanza all'interno di una stessa specie può variare in base a diversi fattori. La maggior parte degli autori concorda sul fatto che le dimensioni della nidiata influenzano negativamente la durata della gravidanza. È stato dimostrato che gravidanze con meno di 3-4 cuccioli sono significativamente più lunghe rispetto a gravidanze con una nidiata maggiore (Eilts et al., 2005; Mir et al., 2011). Gavrilovic et al. (2008) asseriscono che ciascun cucciolo in più rispetto alla media corrisponde ad una diminuzione della durata di gestazione di 0,25 giorni e viceversa per ciascun cucciolo in meno.

Altri parametri che possono influenzare la durata della gestazione sono la razza e le dimensioni materne. Secondo Eilts et al. (2005), il Labrador Retriever ha una gravidanza più corta del Pastore Tedesco, del Golden Retriever e del Segugio. Mir et al. (2011) riportano che la gravidanza del Pastore Tedesco è più breve di quella del Rottweiler, mentre quella del Golden Retriever ha una durata intermedia.

Sono stati presi in esame anche l'età e l'ordine di parto della madre. Da quasi tutti gli studi emerge che questi non influiscono sulla durata della gravidanza (Seki et al., 2010; Okkens et al., 1993; Gavrilovic et al., 2008; Mir et al., 2011; Eilts et al., 2005). Nello studio di Gavrilovic et al. (2008) tuttavia è stato dimostrato che l'età e l'ordine di parto della madre influenzano la numerosità della nidiata, che a sua volta influenza la durata della gravidanza. Infatti cagne che partoriscono per la prima volta a più di 5 anni hanno una numerosità della cucciolata inferiore. Inoltre il numero di cuccioli partoriti aumenta significativamente tra il primo e il terzo parto, poi diminuisce.

Infine è stato considerato il sesso dei cuccioli, ma anche questo parametro non sembra influenzare la durata della gravidanza nel cane (Gavrilovic et al., 2008; Mir et al., 2011). È in contrasto con questa affermazione lo studio di Linde-Forsberg et al. (1999), dal quale risulta che una percentuale maggiore di feti maschi è correlata negativamente con la durata della gravidanza. Mir et al. (2011) spiega questa discordanza asserendo che il sesso dei cuccioli influenza la numerosità della nidiata: cucciolate composte per il 90-100% da femmine sono meno numerose ed hanno una durata di gravidanza maggiore rispetto a quelle composte principalmente da cuccioli maschi.

### **2.4. Utilità della conoscenza del giorno del parto**

Un'accurata determinazione della data di parto permette al padrone della cagna di assisterla durante questo momento. Quando si avvicina il giorno del travaglio, il proprietario dovrebbe predisporre un ambiente adatto ad accogliere al meglio la madre e i cuccioli. La presenza di una supervisione durante il parto permette di valutare precocemente l'eventuale insorgenza di distocie, e

quindi la necessità di un intervento veterinario. Inoltre l'assistenza al parto è importante anche in caso di un parto eutocico: la madre, soprattutto se primipara, può non interessarsi ai cuccioli e in questo caso un intervento esterno è indispensabile.

È importante la conoscenza della data di parto anche quando si sceglie di pianificare un taglio cesareo. Questo avviene per esempio per molte razze brachicefale come il Bulldog e in alcuni terrier, come il Boston Terrier e lo Scottish Terrier (Jutkowitz, 2005; Smith, 2007). Infatti in queste razze il canale del parto è troppo piccolo perché permetta il passaggio di un feto di dimensioni normali. Si può scegliere di ricorrere al taglio cesareo anche nelle cagne con un numero di cuccioli inferiore a 2 o superiore a 8. La numerosità della nidiata è correlata alle dimensioni dei feti: maggiore è il numero di feti, minori sono le dimensioni di ciascun feto e viceversa (Smith, 2007; Johnson, 2008). Gravidanze con un solo cucciolo sono una frequente causa di distocia, poiché il cucciolo arriva a termine troppo cresciuto e quindi è opportuno affrontarle con un taglio cesareo pianificato. Altri motivi per cui si può ricorrere al taglio cesareo programmato sono la presenza di cagne con anamnesi di distocia, cagne primipare che hanno più di 5 anni, cagne obese e cagne con meno di un anno di età (Smith, 2007; Johnson, 2008; Mir et al., 2011).

Infine la conoscenza della data di parto permette di capire se la gravidanza si sta prolungando oltre il termine, cioè superati i 72 giorni di gestazione dall'accoppiamento (Smith, 2007). In genere il prolungamento della gravidanza è dovuto a inerzia uterina. Questo provoca un eccessivo accrescimento dei cuccioli, che al momento del parto potrebbero essere troppo grossi per il canale materno con conseguente rischio di distocia.

## **2.5. Metodi per predire la data di parto**

Diversi metodi sono a disposizione del veterinario per predire la data di parto nella cagna. A seconda dell'età di gestazione in cui il paziente è portato in ambulatorio, si possono utilizzare diverse tecniche di previsione:

- a) Ovulazione
- b) Picco di LH
- c) Progesteronemia all'accoppiamento
- d) Diestro citologico
- e) Esame radiografico
- f) Comportamento ed esame clinico materno
- g) Progesteronemia al parto
- h) Temperatura rettale
- i) Esame ecografico

### **a) Ovulazione**

Il metodo migliore per datare il parto è la determinazione del giorno dell'ovulazione, poiché il parto avviene  $63 \pm 1$  giorni dopo l'ovulazione con una bassa variabilità (Luvoni e Beccaglia, 2006). Tuttavia nella cagna, a differenza di quanto avviene nelle altre specie, è abbastanza complesso individuare questo giorno. Diversi studi hanno eseguito degli esami ecografici transaddominali con questo obiettivo, ma con risultati non soddisfacenti (England e Yeager, 1993; Hase et al., 2000). Grazie all'ecografia durante il proestro sull'ovaio si possono identificare numerosi follicoli: si presentano con una parete ben distinta e una zona anecogena centrale che aumenta di dimensioni man a mano che ci si avvicina all'ovulazione (Fig. 2.3) (Silva et al., 1996; Hase et al., 2000; Davidson e Baker, 2009). Non è facile rilevare l'ovulazione tramite l'ecografia poiché nella cagna i follicoli non collassano, le modificazioni di ecogenicità non sempre sono visibili e inoltre i corpi lutei hanno una cavità centrale piena di liquido simile a quella dei follicoli (Fig. 2.5) (Hase et al., 2000; Luvoni e Beccaglia, 2006; Silva et al., 1996). Si può capire che l'ovulazione è avvenuta quando si rileva sull'ovaio una diminuzione delle strutture anecogene e inoltre questo non presenta più follicoli sporgenti, ma ha una forma tondeggianti e più lineare (Fig. 2.4) (Hase et al., 2000; Luvoni e Beccaglia, 2006). Per identificare l'ovulazione è necessario fare dei rilievi ecografici almeno 2 volte al giorno (England e Yeager, 1993), ma questo è poco pratico da un punto di vista ambulatoriale. Inoltre lo studio di Hase et al. (2000) è riuscito a valutare l'ovulazione soltanto in metà delle cagne esaminate, nonostante siano state eseguite ecografie 3 volte al giorno. Per questi motivi l'uso dell'esame ecografico non è un buon metodo per la determinazione del momento dell'ovulazione (Silva et al., 1996).

Figura 2.3 – Ovaio in fase follicolare con follicoli multipli ipoecoici (Davidson e Baker, 2009)

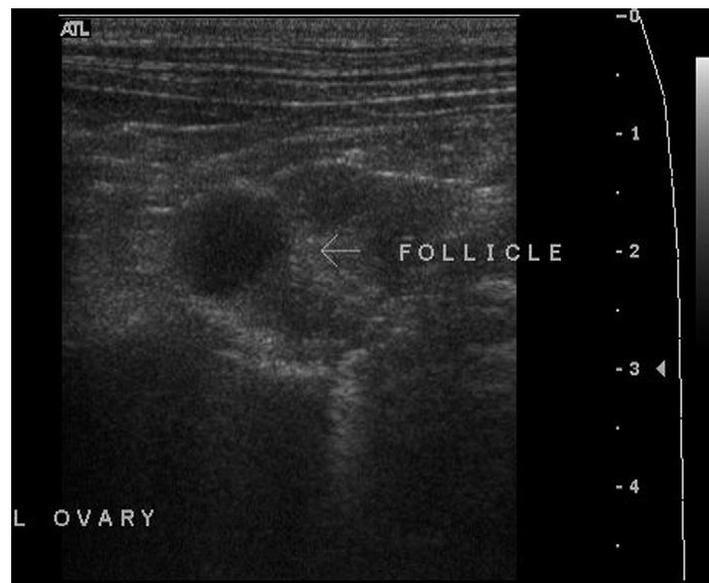


Figura 2.4 – Ovaio con ovulazione recente e corpo emorragico dall'aspetto isoecoico (Davidson e Baker, 2009)



Figura 2.5 – Ovaio durante la fase luteale con un corpo luteo maturo: la parete è spessa e il contenuto è fluido e ipoecoico (Davidson e Baker, 2009)



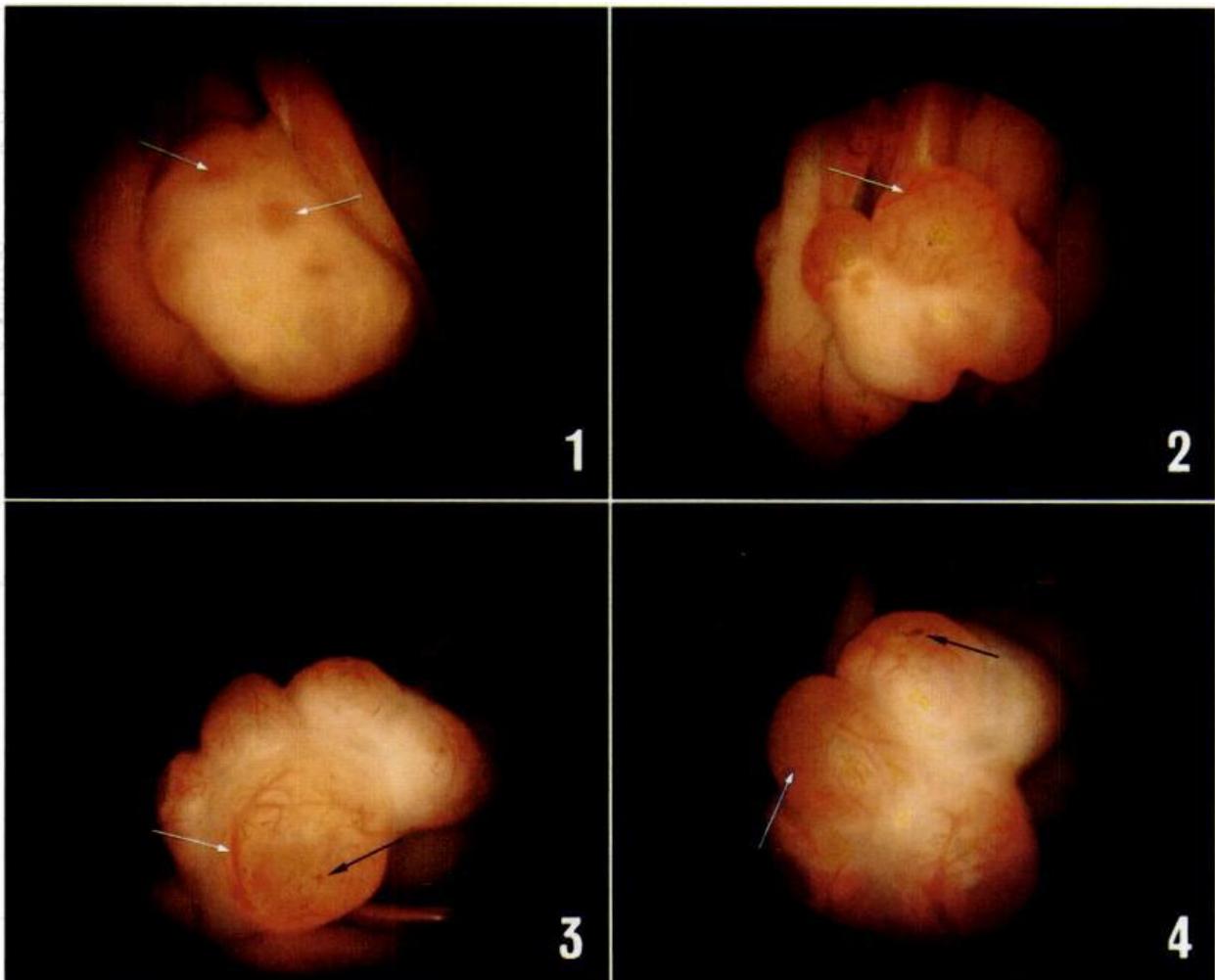
La valutazione macroscopica delle ovaie è stata praticata in diversi studi attraverso l'eutanasia e la necropsia delle cagne (Concannon et al., 1997; Phemister et al., 1973 ), oppure attraverso l'ovariectomia (Concannon et al., 1997) o la laparoscopia (Wildt et al., 1978). Per quanto riguarda quest'ultimo metodo, l'aspetto dei follicoli e la loro trasformazione sono descritti nella Figura 2.6. Tuttavia neanche la laparoscopia ha dato buoni risultati, poiché anche in questo caso risulta difficile determinare l'esatto momento dell'ovulazione (De Gier et al., 2006; Silva et al., 1996). Inoltre questa tecnica è molto invasiva e viene utilizzata soltanto come metodo sperimentale.

**Figura 2.6/1 – Ovaio a metà proestro con aree grigiastre sferiche, siti di sviluppo follicolare precoce (Wildt et al., 1978)**

**Figura 2.6/2 – Ovaio con un follicolo vescicolare maturo dall'aspetto prominente, chiaro e con piccoli vasi convoluti in superficie (Wildt et al., 1978)**

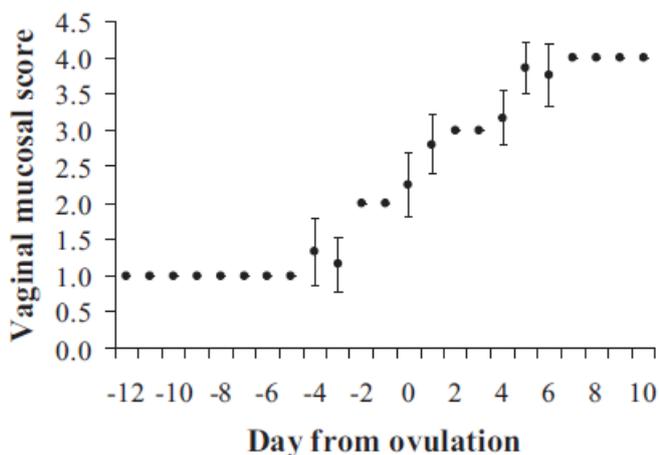
**Figura 2.6/3 – Ovaio contenente un follicolo vescicolare vicino all'ovulazione. La base del follicolo è opaca e i vasi sono aumentati di dimensioni (freccia bianca). Una piccola stigma nera si sta formando sulla superficie follicolare (freccia nera) (Wildt et al., 1978)**

**Figura 2.6/4 – Ovaio contenente un corpo luteo con una stigma distinta (freccia nera). Un altro follicolo sulla superficie dell'ovaio è prossimo all'ovulazione (freccia bianca) (Wildt et al., 1978)**



Diversi metodi non invasivi sono stati presi in considerazione dallo studio di Moxon et al. (2012), che li ha analizzati per determinare se questi fossero utili nella determinazione del momento dell'ovulazione e del giorno migliore per l'accoppiamento. Dai risultati emerge che uno dei parametri maggiormente correlati con lo stadio del ciclo e col livello di progesterone circolante è la valutazione soggettiva dell'aspetto della mucosa vaginale tramite l'endoscopia. È stato utilizzato il *Vaginal Mucosal Score* secondo il quale a ciascuna particolare immagine della vagina corrisponde un punteggio: 1 = immagine edematosa, 2 = piega raggrinzita senza angolazione, 3= piega raggrinzita con angolazione, 4= assenza del raggrinzimento. I risultati indicano che tutte le cagne esaminate hanno un punteggio di 1 nei giorni prima dell'ovulazione, 2 il giorno dell'ovulazione, 3 il 3° giorno dopo l'ovulazione e 4 il 7° giorno dopo l'ovulazione (Fig. 2.7).

**Figura 2.7 – Media del *Vaginal Mucosal Score* durante i diversi stadi del ciclo (giorno 0= giorno dell'ovulazione) (Moxon et al., 2012)**



### **b) Picco di LH**

Durante l'inizio del proestro i valori dell'ormone luteinizzante si aggirano attorno a livelli basali, ovvero di 1,4 ng/ml. Subito dopo il picco degli estrogeni si riscontra un picco di LH e in questa fase i valori sono in media di  $7,5 \pm 0,8$  ng/ml (Concannon et al., 1975). È stato dimostrato da diversi studi che la durata della gravidanza dal picco di LH al parto è abbastanza costante, cioè varia da 64 a 66 giorni (Concannon et al., 1983; Kutzler et al., 2003; Johnson, 2008). In particolare Kutzler et al. (2003) hanno dimostrato che la durata della gravidanza dopo l'iniziale aumento di LH è di  $65 \pm 1$  giorni nel 67% dei casi,  $65 \pm 2$  giorni nel 90% dei casi e  $65 \pm 3$  giorni nel 100% dei casi. Questa buona capacità di predizione del momento del parto dal picco di LH è dovuta al fatto che l'ovulazione avviene in genere 2 giorni dopo questo picco (Seki et al., 2010; Mir et al., 2011). Nella realtà della clinica il livello di LH non è quasi mai calcolato, se non in via sperimentale, in quanto prevede l'utilizzo di una tecnica costosa e complessa (Kutzler et al., 2003). Inoltre per

ottenere risultati affidabili è necessario eseguire diversi prelievi di sangue al giorno e ciò rende questo metodo poco praticabile (Luvoni e Beccaglia, 2006).

### c) Progesteronemia

Il monitoraggio della progesteronemia è una metodica molto utilizzata perché di semplice esecuzione e poco costosa.

Diversamente da quanto accade negli altri animali, nella cagna il progesterone (P4) aumenta già prima dell'ovulazione e induce una luteinizzazione precoce del follicolo preovulatorio. Questa è una particolarità del ciclo estrale canino molto importante, perché ci consente di stimare quando avvengono il picco di LH e l'ovulazione, grazie al dosaggio sierico del progesterone. Prima del picco di LH il progesterone è a livelli basali, cioè minori di 1ng/ml. L'iniziale aumento del progesterone nella cagna è strettamente associato ed avviene simultaneamente al picco di LH (Fig. 2.1) (Concannon et al., 1975; Renton et al., 1991; Concannon et al., 1997; Hase et al., 2000; De Gier et al., 2006). Il giorno in cui il progesterone supera i valori di 1,5 ng/ml è considerato il giorno del picco di LH, ovvero il giorno 0 e la gravidanza si può datare  $65 \pm 1$  giorni dopo con una buona affidabilità (Tab. 2.8) (Kutzler et al., 2003).

Il progesterone può anche essere usato per valutare il giorno dell'ovulazione e datare il parto  $63 \pm 1$  giorni dopo. L'ovulazione avviene circa 2 giorni dopo il picco di LH, con valori di progesterone compresi tra 4-10 ng/ml (Vannozzi et al., 2001; Root Kustritz, 2001; Payan-Carreira et al., 2011). In letteratura tuttavia si trovano pareri discordanti sul valore di P4 al giorno dell'ovulazione, variando da 2-10 ng/ml (Hase et al., 2000; Tsutsui et al., 2006; Luvoni e Beccaglia, 2006; Mir et al., 2011; Vannozzi et al., 2001; Payan-Carreira et al., 2011; Kutzler et al., 2003).

**Tabella 2.8 – Valori del progesterone prima e dopo il picco di LH in cani di diverse taglie (Kutzler et al., 2003)**

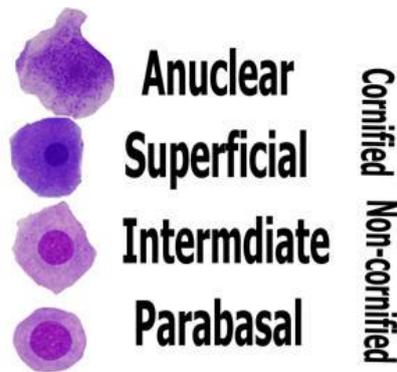
Comparison of mean ( $\pm$ S.D.) progesterone (P4) concentrations (ng/ml) from previous studies (reported as prior to the LH surge, on the day of LH surge, and on the day of ovulation) and from the present study (where Day 0 is defined by the initial rise in P4)

	Prior to LH surge			LH surge	Ovulation		
	-3 days	-2 days	-1 day	Day 0	1 day	2 days	3 days
Wright [14]	<1.0			2-4 (range)	5.5		
Badinand et al. [6]				>1.0	>5		
Present study							
Small	0.92	0.78	1.46	2.14 (0.05)	3.46	11.86	15.13
Medium	0.85	0.84	1.26	1.79 (0.20)	3.10	4.10	5.00
Large	0.53	0.68	1.01	2.18 (0.09)	3.38	5.18	8.27
Giant	0.57	0.61	0.96	1.97 (0.08)	3.99	4.62	6.98
Mean ( $\pm$ S.D.), all groups	0.72 (0.2)	0.73 (0.1)	1.17 (0.23)	2.02 (0.18)	3.48 (0.37)	6.44 (3.64)	8.84 (4.4)

#### d) Diestro citologico

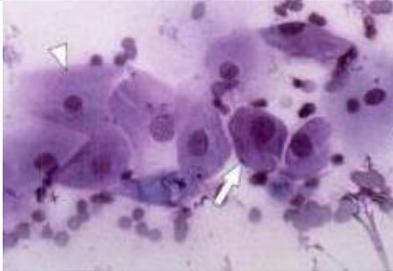
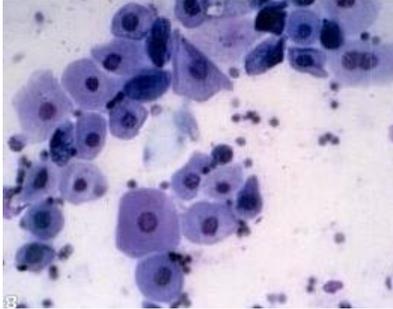
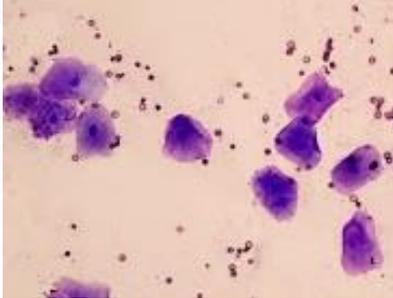
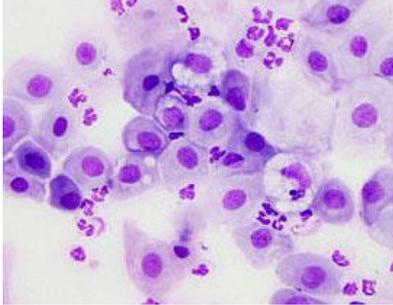
Un altro modo per datare il giorno del parto nella specie canina è quello di individuare l'inizio del diestro grazie alla citologia vaginale. In base al periodo del ciclo estrale, si potranno vedere globuli rossi, globuli bianchi e diversi tipi di cellule epiteliali della mucosa vaginale: cellule epiteliali parabasali, intermedie e cheratinizzate (Post, 1985).

**Figura 2.9 - Cellule della mucosa vaginale riscontrabili con esame citologico**  
([http://www.newportharborvets.com/canine\\_breeding.html](http://www.newportharborvets.com/canine_breeding.html))



Le cellule parabasali sono le più piccole osservabili negli strisci vaginali. Hanno un elevato rapporto nucleo/citoplasma, citoplasma basofilo e forma rotondeggiante (Fig. 2.9) (Poli et al., 2007). Le cellule intermedie hanno dimensioni doppie rispetto alle parabasali, hanno forma prevalentemente rotondeggiante e citoplasma abbondante (Fig. 2.9) (Poli et al., 2007). Le cellule cheratinizzate o superficiali sono le più mature riscontrabili negli strisci vaginali. Queste cellule si presentano di forma poligonale con citoplasma abbondante e cheratinizzato e il nucleo può mancare negli elementi più maturi (Fig. 2.9) (Poli et al., 2007). A seconda della fase del ciclo estrale in cui ci troviamo, si avrà una prevalenza diversa dei tipi cellulari (Tab. 2.10).

**Tabella 2.10. Citologia vaginale durante i diversi stadi del ciclo estrale della cagna. Immagini tratte da:**  
<http://www.omeopatiapossibile.it/clinica-veterinaria/ostetricia-ginecologia/il-ciclo-estrale-della-cagna/>;  
<http://loricaninefeline.blogspot.it/201>

<p>INIZIO PROESTRO</p>		<p>Durante i primi giorni di proestro si possono trovare molte cellule parabasali (freccia) e intermedie (puntatore) e poche cellule cheratinizzate (Post, 1985)</p>
<p>PROESTRO TARDIVO</p>		<p>Verso la fine del proestro e l'inizio dell'estro, sotto l'influenza degli estrogeni, l'epitelio della mucosa vaginale comincia a proliferare, differenziarsi ed esfoliare. In questa fase troveremo un notevole aumento delle cellule cheratinizzate rispetto alle cellule parabasali ed a quelle intermedie (Post, 1985)</p>
<p>ESTRO</p>		<p>Durante l'estro la popolazione cellulare prevalente sono le cellule cheratinizzate. Si ritiene che l'inizio dell'estro coincida con una percentuale di cellule cheratinizzate negli strisci vaginali di circa l'80% e che questa percentuale raggiunga il 100% nel momento dell'ovulazione (Post, 1985).</p>
<p>DIESTRO</p>		<p>Il primo giorno di diestro si può notare una diminuzione drastica di cellule cheratinizzate nell'arco di 24 ore (Bouchard et al., 1991). In questa fase si ha una prevalenza di cellule parabasali, intermedie e dei neutrofili. Il vetrino risulta simile a quello d'inizio proestro.</p>

Raccogliendo strisci vaginali giornalmente si può determinare con una certa sicurezza il primo giorno di diestro. Diversi autori (Luvoni e Beccaglia, 2006; Bouchard et al., 1991) riportano che il diestro inizia in media 8 giorni dopo l'ovulazione e che da questo la durata della gravidanza è di  $57 \pm 3$  giorni (Eilts et al., 2005; Johnson, 2008). Tuttavia questo metodo di predizione del parto non è molto accurato, poiché il cambio di citologia vaginale che segna l'inizio del diestro può

avvenire in un intervallo compreso tra i 6 e gli 11 giorni dopo l'ovulazione (Luvoni e Beccaglia, 2006).

#### e) Esame radiografico

La determinazione dell'epoca di gravidanza con la radiografia si basa sulla comparsa di determinate strutture ossee grazie alla loro mineralizzazione nei diversi stadi della gestazione. Di seguito è riportata la tabella con le varie strutture utilizzabili per definire l'epoca gestazionale (Tab. 2.11). Questo metodo di predizione della data di parto non è tuttavia considerato affidabile, poiché l'epoca in cui compaiono le diverse strutture radiografiche è molto variabile, come si può vedere dalla tabella (Lopate, 2008).

**Tabella 2.11 – Parametri usati per stabilire l'età gestazionale con la radiografia ed epoca in cui compaiono (Lopate, 2008)**

Table 1  
Structures that can be used to determine the stage of canine pregnancy and when they are visible radiographically [1,2,4-6]

Feature	Detection (d) after LH surge	
	Mean	Range
Spherical uterine swellings	35	31-38
Ovoid uterine swellings	41	38-44
First evidence of mineralization of the fetal skull	45	43-46
Scapula, humerus, and femur	48	46-51
Radius, ulna, and tibia	52	50-53
Pelvis and all ribs	54	53-59
Coccygeal vertebrae, fibula, calcaneus, and distal extremities	61	55-64
Teeth	61	58-63

#### f) Comportamento ed esame clinico materno

Negli ultimi giorni prima del parto alla visita clinica materna si possono notare sviluppo mammario con o senza perdita di latte, edema vulvare, perdite vaginali mucose e rilassamento dei legamenti pelvici (Jutkowitz, 2005). Nelle ultime ore prima del parto inoltre la femmina può diventare nervosa, anoressica, tende a isolarsi e a creare un nido, urina e defeca frequentemente, si lecca la regione perineale e a volte può mostrare i sintomi di un leggero dolore colico.

### **g) Progesteronemia al parto**

Si ritiene che la maturazione dell'asse ipotalamo-ipofisaria fetale e il rilascio di corticotropine sia lo stimolo che induce l'inizio del parto. Infatti il rilascio di cortisolo dalle ghiandole surrenali dei feti porta alla sintesi e al rilascio di prostaglandine F<sub>2α</sub> nell'utero e nella placenta. La prostaglandina F<sub>2α</sub> causa la lisi del corpo luteo e un improvviso calo nei livelli di progesterone circolanti. Con una diminuzione dei livelli di progesterone è tolta l'inibizione alle contrazioni uterine e in questo modo il miometrio comincia a contrarsi e la cervice a dilatarsi, portando in breve tempo al parto (Veronesi et al., 2002; Jutkowitz, 2005; Johnson, 2008). Questo meccanismo è stato dimostrato da numerosi studi, che hanno mostrato come nei giorni precedenti il parto ci sia un calo netto dei livelli di progesterone e un aumento invece dei livelli di PGF e di cortisolo (Concannon et al., 1977; Veronesi et al., 2002). Per capire quando una cagna si avvicina al momento del parto quindi si esegue un prelievo di sangue giornalmente negli ultimi giorni di gestazione, tenendo in considerazione che il livello di progesterone cala a livelli < 2ng/ml 1-2 giorni prima dell'inizio del parto (Concannon et al., 1977; Veronesi et al., 2002; Jutkowitz, 2005; Luvoni e Beccaglia, 2006; Smith, 2007; Johnson, 2008).

### **h) Temperatura rettale**

Il progesterone è un ormone termogenico, quindi un calo dei livelli circolanti di quest'ormone nel preparto provoca un calo della temperatura corporea (Veronesi et al., 2002). A conferma di questa teoria nello studio di Concannon e Hansel (1977) è stato notato un calo transitorio della temperatura corporea anche dopo una luteolisi indotta dalla somministrazione di prostaglandine F. Diversi studi hanno dimostrato che la temperatura misurata per via rettale cala di 1,1-1,7 °C (2-3 °F) nell'ultimo giorno prima del parto (Jutkowitz, 2005; Luvoni e Beccaglia, 2006; Smith, 2007; Johnson, 2008). Il calo della temperatura rettale è un evento transitorio e per essere sicuri di riuscire a rilevarlo i proprietari dell'animale dovrebbero misurare questo parametro tre volte al giorno negli ultimi giorni prima del parto.

Secondo altre ricerche invece il calo della temperatura rettale non è un parametro attendibile e correlabile al parto. Nello studio di Veronesi et al. (2002) non è stata messa in evidenza una differenza statisticamente significativa della temperatura corporea della cagna negli ultimi 2 giorni prima del parto. Questo potrebbe essere dovuto alla presenza di feci o gas nel retto, che alterano la misurazione della reale temperatura corporea (Johnson, 2008).

## 2.6. Esame ecografico

### 2.6.1. Rilevazioni all'esame ecografico durante la gravidanza

All'esame ecografico nei primi giorni dopo il concepimento l'utero appare nella norma, ovvero come una struttura ipoeoica situata dorsalmente alla vescica (Cartee e Rowles, 1984). Si può accertare l'avvenuta gravidanza intorno al 20° giorno dopo il picco di LH (Yeager et al., 1992) o al 18° giorno dopo l'ovulazione (Kim e Son, 2007) grazie alla visualizzazione nel lume uterino di una vescicola gestazionale anecogena (Fig. 2.13). Il diametro uterino esterno è di dimensioni maggiori a livello del sito d'impianto rispetto al resto del corno uterino e continua a crescere fino a fine gravidanza. In particolare al 25° giorno è il 100% più grande del resto dell'utero: in questa epoca di gravidanza è possibile fare diagnosi di avvenuta fecondazione anche grazie alla palpazione addominale, individuando l'utero di dimensioni maggiori in alcuni tratti rispetto ad altri (Yeager et al., 1992). Intorno al 21° giorno dopo l'ovulazione si rileva la placenta, che è rappresentata da due lamine ecogene che circondano il sacco gestazionale (Fig. 2.13). Questa diventa poi zonata intorno al 27° giorno e appare di forma cilindrica e si richiude ai margini lungo il piano longitudinale (Fig. 2.13) (Yeager et al., 1992; Kim e Son, 2007).

A partire dal giorno 22-23 dopo l'ovulazione si comincia a vedere l'embrione, ovvero una struttura iperecoica allungata all'interno del sacco corionico e apposta alla parete uterina (Fig. 2.13). Col passare del tempo l'embrione diventa di forma bipolare grazie alla differenziazione tra testa e corpo. Prima del 30° giorno le uniche strutture che si possono valutare nell'embrione sono il cuore e un'area focale anecogena all'interno della testa (Fig. 2.13). Quest'ultima si pensa potrebbe essere riferibile a una struttura analoga rilevata nel cranio di feto umano, ovvero il romboencefalo, che darà origine al quarto ventricolo (Yeager et al., 1992). Il cuore si vede molto chiaramente intorno al 23° giorno di gestazione grazie alla sua attività e al passaggio del sangue e permette di misurare la frequenza cardiaca. Tra il 24° e il 26° giorno dopo l'ovulazione l'embrione appare attaccato ad una membrana fetale ecogena a forma di U, ovvero il sacco vitellino (Fig. 2.13). Una seconda membrana fetale meno ecogena e più sottile si comincia a vedere a partire dal 27° giorno: si tratta dell'allantoide (Yeager et al., 1992; Kim e Son, 2007). Tra il giorno 27 e 33 di gestazione si possono mettere in evidenza gli abbozzi degli arti (Fig. 2.13) e i movimenti fetali si possono già vedere a partire dal 32°-34° giorno (Yeager et al., 1992 ; Kim e Son, 2007). Lo scheletro comincia a essere visibile intorno al 35° giorno dopo l'ovulazione (Yeager et al., 1992; Kim e Son, 2007). Le strutture ossee appaiono inizialmente come delle strutture iperecogene e col passare dei giorni la loro ecogenicità aumenta in seguito ad una maggiore mineralizzazione. Inoltre col progredire della calcificazione compaiono anche le ombre acustiche tipiche delle strutture mineralizzate (Cartee e

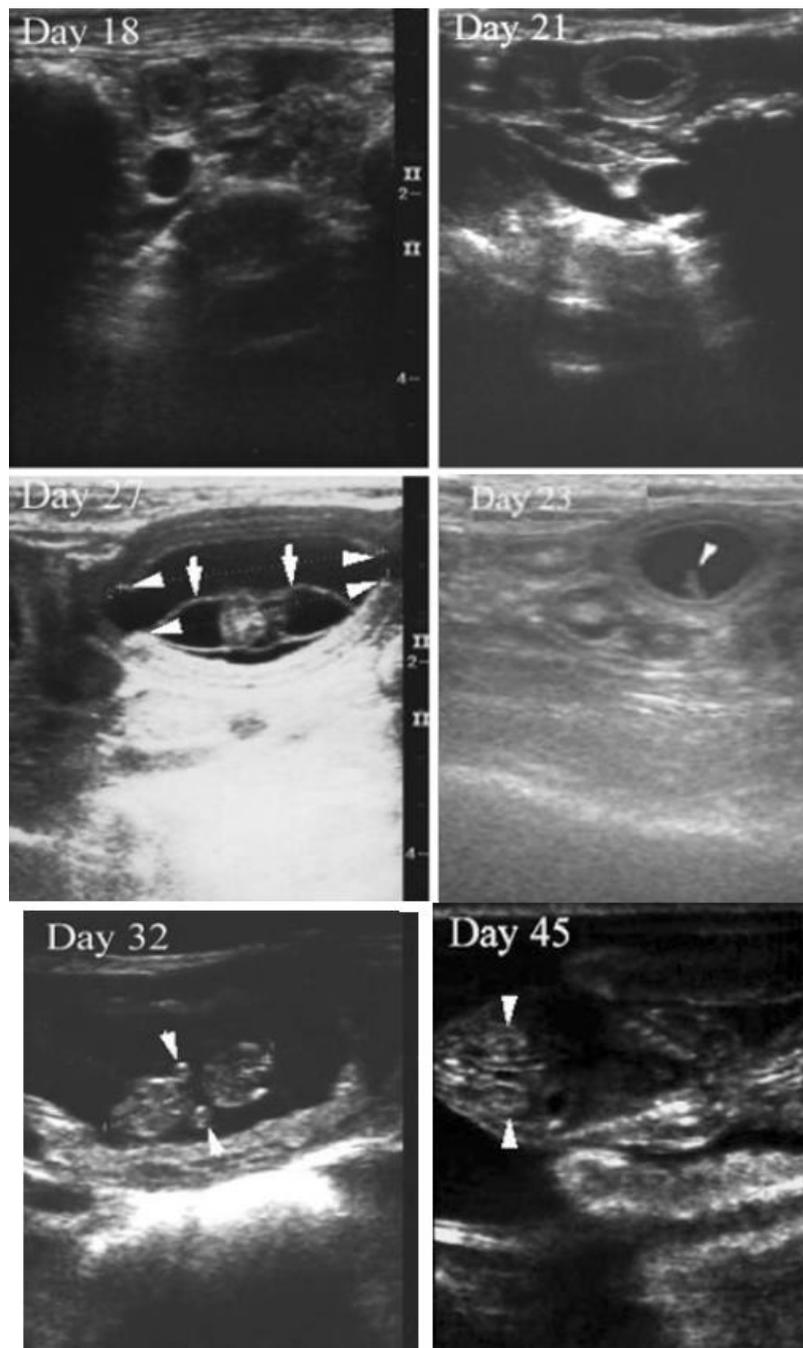
Rowles, 1984). Le prime strutture addominali a essere visualizzate sono lo stomaco e la vescica, tra i 29 e i 35 giorni di gestazione, che appaiono come delle cavità distinte e piene di fluidi. Tra il 35° e il 40° giorno circa i polmoni diventano iperecogeni rispetto al fegato mentre il fegato diventa ipoecogeno rispetto al resto dell'addome (Yeager et al., 1992; Kim e Son, 2007). Nello stesso periodo il diametro corporeo diventa maggiore rispetto a quello della testa di almeno 2mm. I reni e gli occhi si rilevano tra i giorni 40-46 e infine si può visualizzare l'intestino dal 57° fino al 63° giorno dopo il picco di LH (Yeager et al., 1992).

Nella tabella 2.12 sono elencate le diverse strutture che possiamo rilevare all'esame ecografico di un feto e l'epoca gestazionale della loro prima possibile visualizzazione.

**Tabella 2.12 - Età gestazionale media della prima visualizzazione di diverse strutture fetali (Kim e Son, 2007)**

Pregnancy features (Embryo and fetus)	Day after ovulation	
	Mean $\pm$ SD	Range
- Initial detection		
Embryo	22.6 $\pm$ 0.5	22-23
Heartbeat	23.4 $\pm$ 0.5	23-24
Bipolar shape	28.9 $\pm$ 1.1	27-30
Limb bud	29.8 $\pm$ 1.4	27-31
Anechoic area in head	31.8 $\pm$ 1.3	29-33
Fetal movement	32.5 $\pm$ 0.8	32-34
Stomach	31.2 $\pm$ 1.6	29-33
Urinary bladder	32.6 $\pm$ 1.8	31-35
Skeleton	34.9 $\pm$ 1.6	34-38
Lung hyperechoic vs liver	35.8 $\pm$ 0.8	34-36
Liver hypoechoic vs abdomen	36.9 $\pm$ 1.0	35-38
Kidney	42.2 $\pm$ 0.7	41-43
- Parturition	63.0 $\pm$ 1.7	61-65

Figura 2.13 – Immagini ecografiche durante diversi stadi della gravidanza



Day 18 – Immagine ecografica di un sacco gestazionale anecoico (Kim e Son, 2007)

Day 21 – Immagine trasversa di un sacco gestazionale in cui è visibile la parete placentale ecogena (Kim e Son, 2007)

Day 27 – Immagine longitudinale di un sacco gestazionale contenente un embrione. I puntatori indicano la placenta zonata, mentre le frecce indicano il sacco vitellino (Kim e Son, 2007)

Day 23 – Immagine trasversa di un sacco longitudinale contenente un embrione di forma allungata (Kim e Son, 2007)

Day 32 – Immagine fetale longitudinale nella quale sono visibili gli abbozzi degli arti (puntatori bianchi) e un'area anecogena a livello della testa (Kim e Son, 2007)

Day 45 – Immagine longitudinale fetale nella quale sono mostrati i reni (puntatori bianchi) (Kim e Son, 2007)

### **2.6.2. Vantaggi e svantaggi dell'esame ecografico**

L'esame ecografico è molto affidabile nel predire la data di parto e presenta anche molti altri vantaggi. Prima di tutto è un esame poco invasivo e ben tollerato degli animali (Root Kustritz, 2005). Sono stati effettuati diversi studi per capire se gli US hanno degli effetti negativi sulla salute del feto, in quanto provocano una vibrazione e quindi un riscaldamento dei tessuti che attraversano. Fino a questo momento tutti i test effettuati sono risultati negativi (Hunter, 2009).

L'esame ecografico permette di fare diagnosi di gravidanza già dal diciottesimo giorno dopo l'ovulazione, anche se l'accuratezza dipende molto dall'abilità del veterinario e aumenta col passare dei giorni. In particolare la precisione è del 94-98% se la diagnosi viene fatta il 24-25° giorno dopo l'accoppiamento, mentre è del 99% se viene eseguita il 28° giorno (Root Kustritz, 2005). Inoltre grazie all'ecografia possiamo monitorare la salute e la vitalità fetale durante tutta la durata della gravidanza ed al momento del parto (Root Kustritz, 2005). Il parametro più importante da questo punto di vista è il battito fetale, che dà un'indicazione molto accurata del benessere dei cuccioli e della loro sopravvivenza futura. Il battito fetale normale è compreso tra i 200 e i 250 battiti per minuto e se un feto ha una frequenza cardiaca inferiore, ciò indica che sta soffrendo (Johnson, 2008). In caso di patologie fetali e riassorbimenti potremmo notare le seguenti modificazioni: alterato/rallentato accrescimento, flocculazione ecogene nella vescicola embrionale, perdita di fluidi fetali con diminuzione delle dimensioni della vescicola e alterazione della sua forma, assenza del battito cardiaco, sfocatura dei margini e alterazione della normale anatomia fetale, distacco della placenta dalla parete uterina. (England e Russo, 2006; Davidson e Baker, 2009).

L'ecografia presenta tuttavia degli svantaggi da non sottovalutare. Per prima cosa la tecnica dipende molto dall'abilità dell'ostetrico, dalla qualità dell'immagine ottenuta, dal posizionamento fetale e dalle dimensioni della madre (Hunter, 2009). Inoltre con l'esame ecografico non si riesce a dare un'indicazione precisa della numerosità della nidiata, a causa della sua dinamicità, della piccola finestra mostrata dal trasduttore e della tortuosità dell'utero canino (Davidson e Baker, 2009). Infine, per determinare la data di parto, i parametri sono misurati su dei feti che potrebbero avere dei problemi e che possono andare incontro a riassorbimento o espulsione. Le misure prese su questi feti possono alterare la data di parto prevista, poiché spesso hanno una crescita rallentata e quindi sono immaturi e più piccoli.

### 2.6.3. Datazione del parto con l'ecografia

Per predire il momento del parto con l'ecografia sono stati presi in considerazione diversi parametri fetali ed extra-fetali. Le strutture misurate variano in relazione all'età gestazionale, per cui ciascun parametro può essere misurato solo nell'epoca di gravidanza in cui è facilmente riconoscibile.

In una fase precoce di gravidanza, cioè a più di 25 giorni dal parto, si possono misurare diverse strutture extra-embrionali come il diametro uterino esterno sul sito d'impianto (Outer Uterine Diameter = OUD), lo spessore placentale (Placental Thickness = PT) e la lunghezza della placenta zonata (Placental Length = PL) (Luvoni e Grioni, 2000; Son et al., 2001; Luvoni e Beccaglia, 2006). Questi parametri sono tuttavia meno correlati all'età gestazionale rispetto all'altro parametro misurabile nello stesso periodo, ovvero il diametro interno della cavità corionica (Inner Chorionic Cavity = ICC). Ciò può essere dovuto al fatto che i margini della placenta e dell'utero non sono ben definiti come quello della vescicola corionica e come conseguenza si ha un peggioramento dell'accuratezza nel calcolo dell'età gestazionale. ICC, al contrario, da molti studi risulta un ottimo parametro da questo punto di vista (Luvoni e Grioni, 2000; Son et al., 2001; Beccaglia e Luvoni, 2006; Luvoni e Beccaglia, 2006).

Dopo il 25° giorno prima del parto si possono valutare molti altri parametri fetali. Quello che può essere misurato più precocemente è la distanza cranio-bacino (Crown-Rump Length, CRL), ovvero lo spazio tra il punto più rostrale del cranio e il punto più caudale del perineo (Son et al., 2001; Kutzler et al. 2003). Un'altra struttura che si può considerare è il diametro del cuore fetale (=HDT), facendo una media tra la misura del suo asse maggiore e di quello minore. Tuttavia l'affidabilità di questo parametro è fortemente influenzata dalla fase del ciclo cardiaco in cui viene misurato (Luvoni e Beccaglia, 2006). Una misura che ha una buona correlazione con l'età gestazionale è il diametro corporeo (Body Diameter, BD), che è misurato ottenendo una visione trasversale del feto a livello dello stomaco e del fegato (Son et al., 2001; Kutzler et al., 2003; Luvoni e Beccaglia, 2006). Infine si possono considerare diversi parametri a livello del cranio fetale. La struttura più correlata all'età gestazionale nella seconda metà della gravidanza è una di queste, ovvero il diametro biparietale (Biparietal Diameter, BP). Questo parametro rappresenta la distanza tra le ossa parietali osservata su un piano di visione longitudinale (Luvoni e Grioni, 2000; Son et al., 2001; Beccaglia e Luvoni, 2004; Luvoni e Beccaglia, 2006). Sullo stesso piano si può visualizzare anche la porzione profonda della vescicola telencefalica (Deep Portion of Telencephalic Vesicle, DPTV), che è rappresentata dal talamo e dai nuclei basali primordiali (Beccaglia e Luvoni, 2004; Beccaglia e Luvoni, 2006; Luvoni e Beccaglia, 2006; Beccaglia et al., 2008). Sempre a livello di cranio fetale possiamo valutare anche il diametro della testa (Head

Diameter, HD), considerando il diametro maggiore lungo un piano di sezione orizzontale. Affinché questo metodo sia accurato, bisogna valutare attentamente la simmetria della testa e la *falx cerebri* deve essere in posizione centrale (Son et al., 2001; Luvoni e Beccaglia, 2006).

Un altro metodo con cui si può determinare l'età gestazionale grazie all'esame ecografico è la valutazione dello sviluppo anatomico degli organi e delle varie strutture fetali. Per esempio il cuore si vede dal 23-24° giorno dopo il picco di LH, gli abbozzi degli arti cominciano a vedersi tra 33 e 35 giorni e i movimenti fetali tra 34 e 36 giorni (Tab. 2.14) (Yeager et al., 1992). Se durante l'esame ecografico si rileva un feto in movimento, con battito cardiaco e abbozzi degli arti, si determina che l'età gestazionale è di 34-36 giorni dopo il picco di LH, e si daterà il parto 29-31 giorni dopo (Lenard et al., 2007). L'accuratezza di questo metodo è elevata: il parto avviene entro 1 giorno dalla data prevista nel 74,6% dei casi ed entro 2 giorni nel 91,9% dei casi. Inoltre secondo Lenard et al. (2007) l'accuratezza della determinazione dell'età gestazionale è maggiore rispetto a quella stimata utilizzando diverse misure fetali, come CRL, BP, BD. Tuttavia questo metodo ha degli svantaggi, come il fatto che utilizzando delle sonde ad alta risoluzione si potrebbero riuscire a identificare alcune strutture fetali più precocemente (in questo studio è stata utilizzata una sonda convex da 7 MHz). Inoltre il riconoscimento delle varie strutture fetali può dipendere dall'esperienza dell'operatore che esegue l'esame ecografico e può essere più soggettivo rispetto alla misura delle dimensioni fetali (Lenard et al., 2007).

Tabella 2.14 – Età gestazionale (giorni dopo il picco di LH) alla quale si ha la prima visualizzazione ecografica delle seguenti strutture fetali (Yeager et al., 1992)

Pregnancy feature	Days after the LH surge	N*
Gestational sac	20	7
Uterine wall		
Echogenic at gestational sac	20 to 23	8
Placental layers	22 to 24	7
Zonary placenta	27 to 30	8
Embryo position		
Apposed to uterine wall	23 to 25	8
Dependent in chorionic cavity	29 to 33	8
Fetal membranes		
Yolk sac membrane	25 to 28	7
Allantoic membrane	27 to 31	7
Yolk sac tubular shape	27 to 31	8
Yolk sac folded cross section	31 to 35	6
Embryo and fetus		
Heartbeat	23 to 25	8
Bipolar shape	25 to 28	8
Anechoic area in head	27 to 31	6
Choroid plexus	31 to 35	6
Limb buds	33 to 35	6
Fetal movement	34 to 36	5
Dorsal sagittal tube	30 to 39	6
Skeleton	33 to 39	4
Bladder	35 to 39	4
Stomach	36 to 39	4
Lung hyperechoic vs liver	38 to 42	4
Liver hypoechoic vs abdomen	39 to 47	4
Kidney	39 to 47	3
Eyes	39 to 47	4
Umbilical stalk	40 to 46	5
Intestine	57 to 63	4
Relative size relationships		
Body diameter 2 mm > head	38 to 42	4
Body diameter:chorionic cavity diameter > 1:2	38 to 42	4
Crown-rump length > placenta	40 to 42	4
Body diameter:outer uterine diameter > 1:2	46 to 48	5
Parturition	63 to 65	5

### **3. SCOPI DEL LAVORO**

Questo lavoro di tesi si prefigge due scopi principali:

1. Determinare quale parametro tra ICC, CRL, BD, BP e DPTV garantisce una maggiore precisione nel calcolo dell'età gestazionale;
2. Valutare se la conoscenza della data d'ovulazione influenza la stima dell'età gestazionale.



## **4. MATERIALI E METODI**

### **4.1. Impianto dello studio**

Lo studio è stato effettuato nel periodo compreso tra agosto 2012 - gennaio 2014 presso gli ambulatori dell'Ospedale Didattico veterinario del Dipartimento di Medicina Animale Produzioni e Salute dell'Università di Padova.

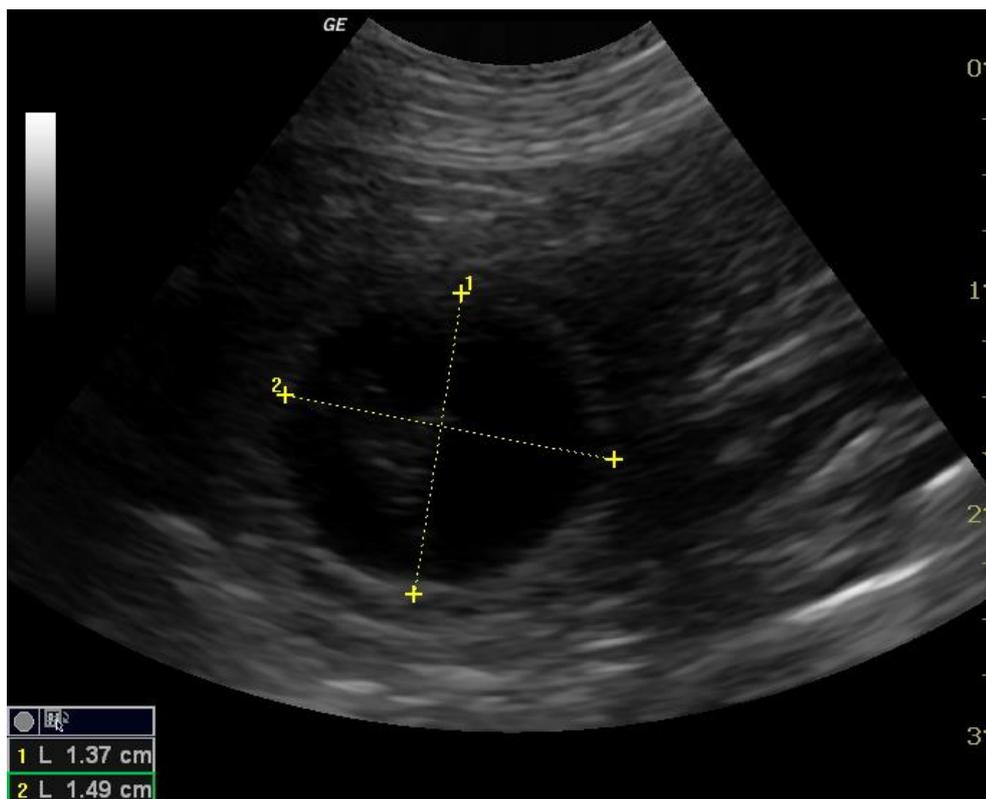
I soggetti inclusi sono dieci fattrici di razza Pastore Tedesco, di età compresa tra i 2 e i 9 anni, tutte almeno al secondo ordine di parto e di peso compreso tra i 34 e i 42 Kg. Tutte le femmine sono state fecondate mediante monta naturale. Gli animali sono stati suddivisi in due gruppi (GRUPPO 1 e GRUPPO 2): le femmine appartenenti al GRUPPO 1 hanno il giorno dell'ovulazione noto (n=7 gravidanze) mentre per quelle appartenenti al GRUPPO 2 (n=6 gravidanze) il giorno dell'ovulazione non è noto. Per le femmine del GRUPPO 1 il giorno dell'ovulazione è stato determinato in base alla progesteronemia. I valori sierici di progesterone sono stati valutati tramite prelievo del sangue dalla vena cefalica dell'avambraccio. Il campione, centrifugato a 3000 rpm per 10 minuti, è stato poi analizzato con la metodica della chemiluminescenza (Kutzler et al., 2003). Il giorno dell'ovulazione è stato considerato il giorno in cui il progesterone raggiungeva livelli di almeno 8 ng/ml. L'accoppiamento è avvenuto sempre entro 2 giorni dopo tale data, in seguito alla quale è stato fissato il primo esame ecografico.

L'ecografo utilizzato [General Electric Medical System LOGIQ P5/A5 (Solingen, Germany)] è dotato di sonda microconvex multifrequenza (6-10 MHz). L'ecografia è stata eseguita in decubito laterale destro o con l'animale in stazione, dopo aver effettuato la tricotomia della regione addominale e inguinale e con l'uso di gel come mezzo di contatto.

Per tutti gli animali del GRUPPO 1 e per 4 animali del GRUPPO 2 sono state eseguite almeno 2 ecografie per cagna, una nella prima e l'altra nella seconda metà della gestazione. I parametri presi in considerazione in questo studio sono di seguito elencati:

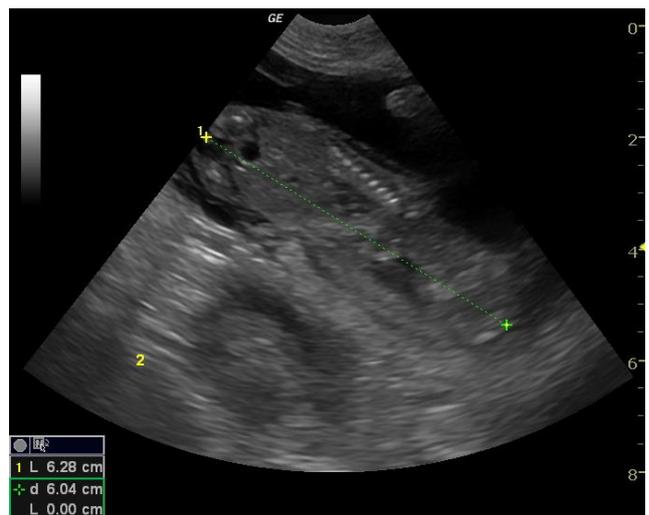
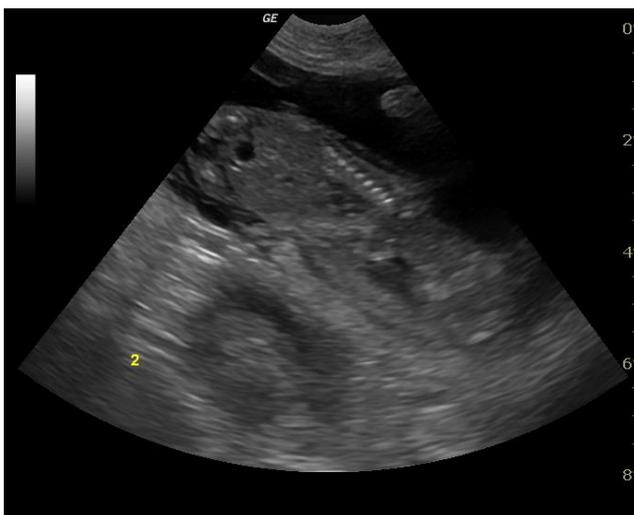
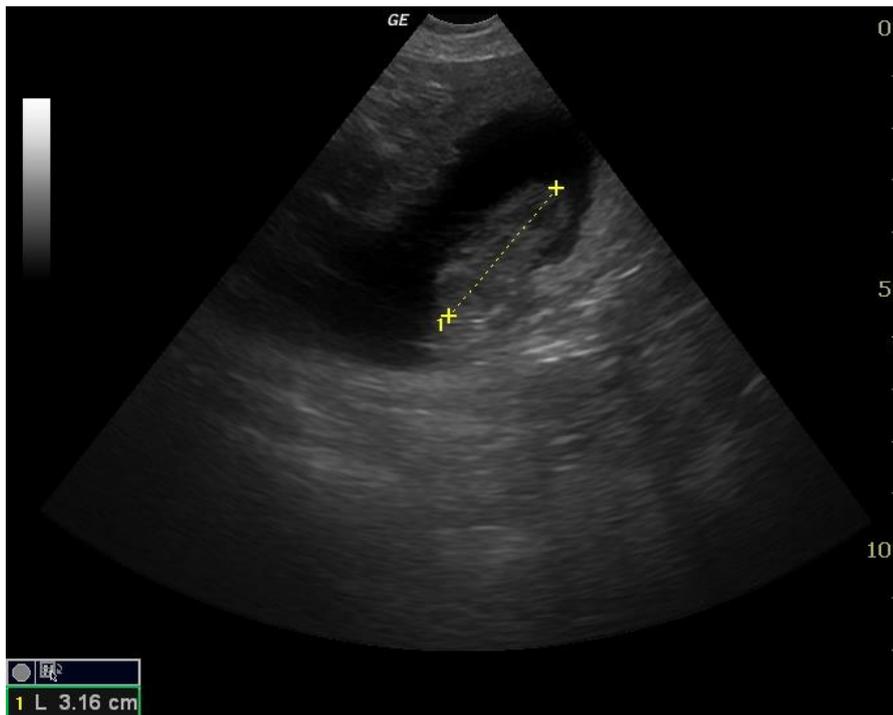
- **Inner Chorionic Cavity (ICC)**, o cavità corionica interna, è stata valutata tra i 21 e i 35 giorni di gestazione. ICC è rilevato visualizzando la vescicola embrionale nel punto di massimo diametro. Sono poi misurati 2 valori di ICC perpendicolari tra loro, dai due margini della reazione decidua del trofoblasto (Fig. 4.1) (Beccaglia e Luvoni, 2006). Il valore finale deriva dalla media delle 2 misure.

Figura 4.1 - Immagini ecografiche della misurazione di ICC



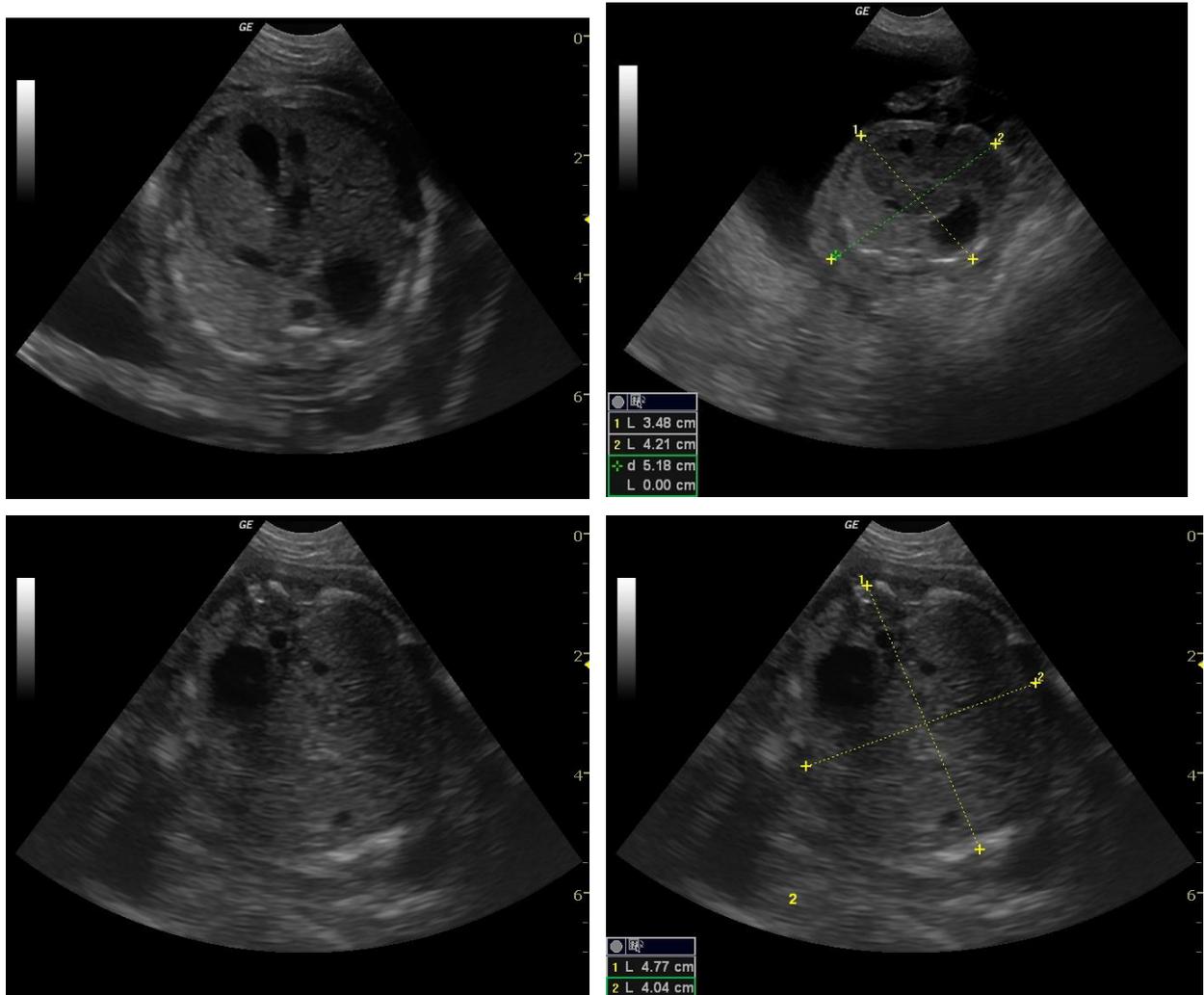
- **Crown-Rump Length (CRL)**, o lunghezza cranio-bacino, è stata rilevata tra i 22 e i 35 giorni di gestazione. Questo parametro prende in considerazione la lunghezza del feto dalla testa fino al bacino: si visualizza il feto in sezione longitudinale e la misura si ottiene tracciando una linea dall'apice della testa fino alla base della coda (Fig. 4.2). Questo parametro non può essere valutato fino a fine gravidanza, perché col progredire dell'età gestazionale il feto s'incurva e la testa non risulta più sullo stesso asse del bacino.

Figura 4.2 - Immagini ecografiche della misura di CRL



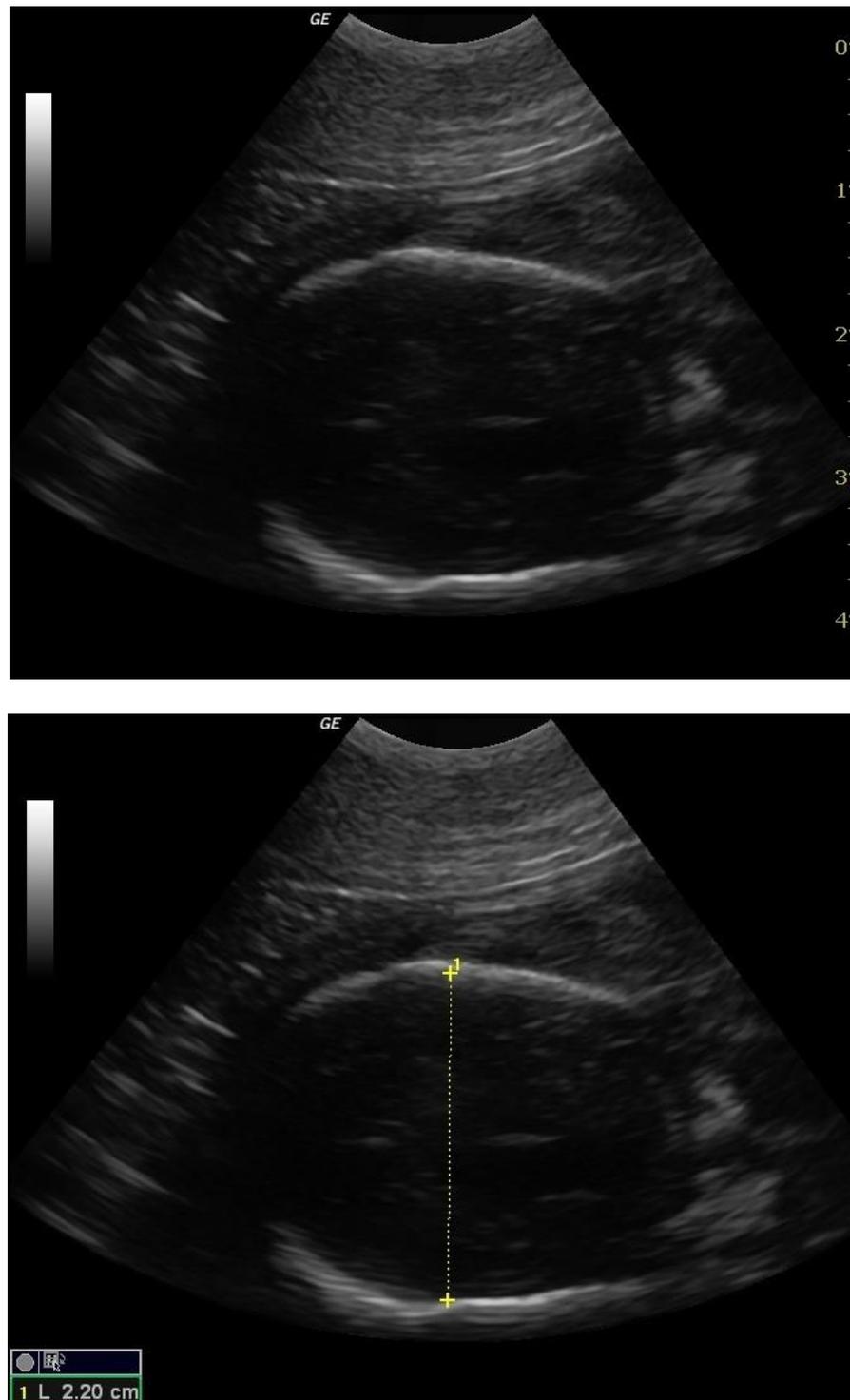
- **Body Diameter (BD)**, o diametro corporeo, è stato misurato tra i 31 e i 53 giorni di gestazione. È ottenuto visualizzando il feto in sezione trasversale a livello della bolla gastrica e del fegato; il valore finale deriva dalla media di 2 misurazioni eseguite lungo assi perpendicolari tra loro (Fig. 4.3).

Figura 4.3 - Immagini ecografiche del feto in sezione trasversale con bolla gastrica evidente (a sinistra) e della misura di BD (a destra)



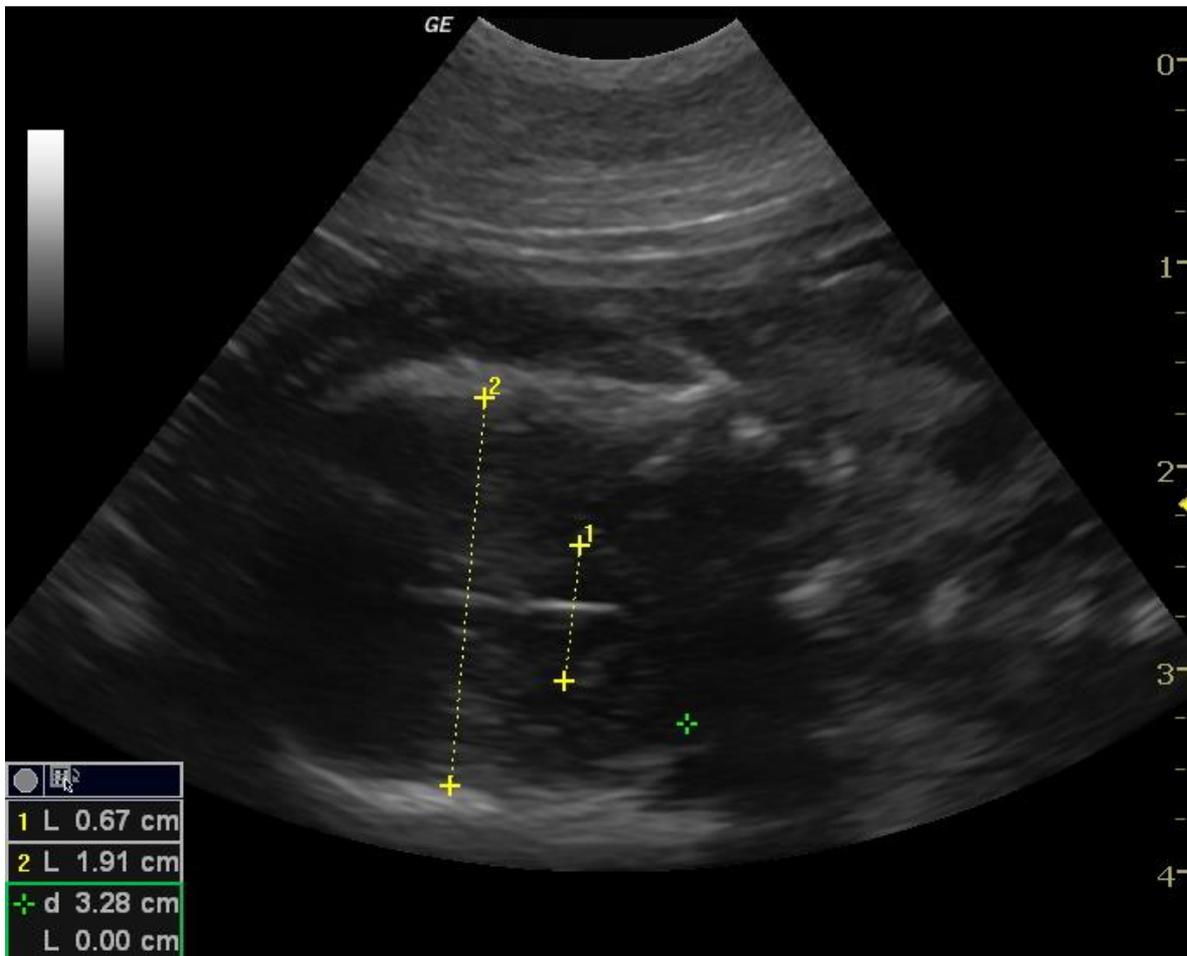
- **Biparietal Diameter (BP)**, o diametro biparietale, è stato valutato tra i 31 e i 53 giorni di gestazione. BP è la distanza tra le ossa parietali del cranio del feto. È stato misurato ottenendo una visualizzazione del cranio fetale in sezione coronale, in modo che le ossa parietali siano parallele tra loro, e la misurazione è stata tracciata nel loro punto centrale (Fig. 4.4).

Figura 4.4 - Immagine ecografica della sezione coronale del cranio fetale e misura di BP



- **Deep Portion of Telencephalic Vesicle (DPTV)**, o porzione profonda della vescicola telencefalica, è stata rilevata tra i giorni 35 e 52 di gestazione. Questo parametro è rappresentato dal talamo e dai nuclei basali primordiali. DPTV si valuta visualizzando il feto in modo analogo al BP, quindi il parametro è misurato sulla stessa immagine ecografica. Si traccia una linea tra i due margini opposti della vescicola telencefalica, nel punto centrale del cranio, vicino alla linea tracciata per misurare BP (Fig. 4.5).

Figura 4.5 - Immagine ecografica della misurazione di BP (traccia più lunga) e DPTV (traccia più corta)



Ciascun parametro è stato misurato su almeno 2 feti. Inoltre per ciascun feto preso in esame è stata calcolata la frequenza cardiaca per assicurarsi che il cucciolo fosse vivo e vitale. È stata anche valutata l'eventuale presenza di feti morti e di riassorbimenti. In una cagna è stata rilevata la presenza di perdite vulvari e l'ecografia mostrava un feto morto in fase di riassorbimento. Questo animale è stato escluso dallo studio.

Al momento dello studio ecografico l'esaminatore non conosceva l'età gestazionale né il giorno in cui si era verificato l'accoppiamento, eseguiva l'esame ecografico e le diverse misure erano rilevate. Successivamente sono state riportate dall'allevatore le effettive date di parto dei soggetti, il numero di cuccioli nati vivi e morti e, per le cagne appartenenti al GRUPPO 1, il giorno dell'ovulazione.

Per calcolare l'età gestazionale (Y) a partire dalle misure ecografiche, sono state utilizzate le rette di regressione elaborate da Milani et al. (2011) per i vari parametri:

- Per ICC  $Y = 16,879 + (5,237 \times ICC)$  con  $r = 0,954$
- Per CRL  $Y = 28,308 + (1,799 \times CRL)$  con  $r = 0,899$
- Per BD  $Y = 26,617 + (5,810 \times BD)$  con  $r = 0,954$
- Per BP  $Y = 22,155 + (14,247 \times BP)$  con  $r = 0,965$
- Per DPTV  $Y = 26,637 + (35,213 \times DPTV)$  con  $r = 0,871$

Per ogni età gestazionale stimata (Y) si è determinato l'errore, che deriva dallo scarto con l'età gestazionale reale. Quest'ultima corrisponde al numero di giorni trascorsi tra la data di ovulazione e quella in cui è stato eseguito l'esame ecografico. Per le cagne del GRUPPO 1 la data dell'ovulazione è nota, mentre per il GRUPPO 2 l'evento è stato stimato 63 giorni prima la data del parto.

## 4.2. Analisi statistica

Per l'analisi statistica è stata utilizzata la procedura GLM del software Sigmasat 2.03.

L'errore nel calcolo dell'età gestazionale per ciascuno dei parametri presi in considerazione è stato analizzato mediante ANOVA a una via in cui è stata considerata come variabile indipendente il parametro misurato e come variabile dipendente l'errore di ciascuna misura.

Le differenze nel calcolo dell'età gestazionale con ovulazione nota o non nota sono state analizzate mediante ANOVA a una via in cui è stata considerata come variabile indipendente l'ovulazione nota o non nota e come variabile dipendente l'errore nel calcolo dell'età gestazionale.

In entrambi i casi sono stati considerati significativi valori con  $P < 0,05$ .



## 5. RISULTATI

Per le cagne del GRUPPO 1, la durata media della gravidanza dal giorno dell'ovulazione al giorno del parto è di  $61,6 \pm 1,13$  giorni (media  $\pm$  DS, intervallo da 60 a 63 giorni), mentre per le cagne appartenenti al GRUPPO 2 la durata della gravidanza dal giorno dell'accoppiamento al giorno del parto è di  $60,5 \pm 2,07$  giorni (media  $\pm$  DS, intervallo 59-64 giorni).

Nella tabella 5.1 e 5.2 sono elencati, rispettivamente per il GRUPPO 1 e GRUPPO 2, l'età gestazionale reale al momento dell'esame ecografico, le misure medie dei parametri valutati e l'età gestazionale calcolata per ciascun parametro con le rette di riferimento (Milani et al., 2011).

**Tabella 5.1 – Età gestazionale reale (cerchio giallo) e calcolata (cerchio rosso) per i singoli parametri (ICC, CRL, BD, BP, DPTV) misurati nei soggetti appartenenti al GRUPPO 1.**

NOME CAGNA	ETÀ GESTAZIONALE REALE (giorni)	MISURA ICC (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON ICC (giorni)	MISURA CRL (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON CRL (giorni)	MISURA BD (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON BD (giorni)	MISURA BP (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON BP (giorni)	MISURA DPTV (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON DPTV (giorni)
<b>Betty</b>	22	1,1225	22,76	0,54	29,28						
	29	2,515	30,05	1,67	31,31						
	43					3,2	45,21	1,52	43,81		
<b>Xandy 1</b>	24	1,585	25,18								
	31	3,0275	32,73	2,26	32,37	1,05	32,72				
	46					3,515	47,04	1,79	47,66	0,75	53,05
	52					5,13	56,42	2,31	55,07	0,815	55,34
<b>Nera</b>	29	2,535	30,15	1,84	31,62						
	35	3,8	36,78	3,945	35,41	1,6025	35,93				
	42					2,965	43,84	1,56	44,38	0,545	45,83
<b>Ondra</b>	32	3,4125	34,75	2,55	32,9	1,145	33,27				
	38					2,255	39,72	1,19	39,11	0,47	43,19
	45					3,48	46,84	1,75	47,09	0,665	50,05
<b>Truxi</b>	24	1,56	25,05								
	45					3,7325	48,30	1,705	46,45	0,635	49
	52					4,8075	54,55	2,21	53,64		
<b>Xandy 2</b>	31	2,9575	32,37	1,99	31,89						
	47					3,7975	48,68	1,68	46,09		
	53					4,4825	52,66	2,55	58,48		
<b>Tammi</b>	24	1,48	24,63								
	31	3,125	33,24	2,2	32,27						

**Tabella 5.2 - Età gestazionale reale (cerchio giallo) e calcolata (cerchio rosso) per i singoli parametri (ICC, CRL, BD, BP, DPTV) misurati nei soggetti appartenenti al GRUPPO 2.**

NOME CAGNA	ETÀ GESTAZIONALE REALE (giorni)	MISURA ICC (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON ICC (giorni)	MISURA CRL (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON CRL (giorni)	MISURA BD (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON BD (giorni)	MISURA BP (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON BP (giorni)	MISURA DPTV (cm)	ETÀ GESTAZIONALE CALCOLATA CON DPTV (giorni)
Gilda	22	0,645	20,26								
	29			1,29	30,36						
	36			3,52	34,64	1,37	34,58	0,935	35,48	0,45	42,48
	50	1,585				3,3075	45,83	2,065	51,58	0,61	48,12
Zora	28	1,6875	25,72	1,13	30,34						
	44					2,7675	42,7	1,475	43,17		
	50					3,9825	49,76	1,955	50,01		
Truxi	26	1,6475	25,51	0,9	29,93						
	42					2,47	40,97	1,365	42,6		
	48					3,86	49,04	1,86	48,65		
Ola	42					2,16	39,17	1,285	40,46		
Betty	25	1,425	24,34	0,645	29,47						
Pola	44					2,73	42,48	1,48	43,24	0,6	47,76
	53					4,47	52,59	2,18	53,21	0,76	53,4

La tabella 5.3 riporta la differenza dell'accuratezza nel calcolo dell'età gestazionale tra i diversi parametri considerati. ICC risulta più correlato all'età gestazionale di CRL, BD, BP e di DPTV ( $P < 0,05$ ). Tra gli altri parametri presi in considerazione invece non sono emerse differenze significative.

**Tabella 5.3 - Significatività (P-value) della differenza di errore di calcolo dell'età gestazionale tra le diverse misure prese in considerazione**

	ICC	CRL	BD	BP	DPTV
ICC	-	<0.05	<0.05	<0.05	<0.001
CRL		-	nd	nd	nd
BD			-	nd	Nd
BP				-	Nd
DPTV					-

Nella tabella 5.4 è riportato l'errore di calcolo dell'età gestazionale per i diversi parametri considerati, per GRUPPO 1 e GRUPPO 2. Per ICC l'errore è inferiore a un giorno sia per le cagne del GRUPPO 1 che per quelle del GRUPPO 2 ( $0,27 \pm 0,47$  giorni e  $0,72 \pm 0,41$  giorni, rispettivamente). Per BD e BP l'errore è di 1-2 giorni circa (BP: per GRUPPO 1 =  $2,06 \pm 1,39$  giorni e per GRUPPO 2 =  $0,94 \pm 0,77$  giorni; BD: per GRUPPO 1 =  $1,92 \pm 0,59$  giorni e per GRUPPO 2 =  $1,07 \pm 0,40$  giorni). Il parametro con l'errore maggiore ( $>3$  giorni) per entrambi i gruppi è DPTV ( $4,67 \pm 1,36$  giorni per GRUPPO 1 e  $3,59 \pm 3,13$  giorni per GRUPPO 2). Anche il parametro CRL presenta un errore elevato di circa 2-3 giorni (GRUPPO 1 =  $1,85 \pm 1,49$  giorni e

per GRUPPO 2 =  $3,34 \pm 2,02$  giorni). Inoltre è stata confrontata l'accuratezza dei diversi parametri tra GRUPPO 1 e 2. Non sono state messe in evidenza differenze significative nell'accuratezza della predizione dell'età gestazionale tra il primo e il secondo gruppo. Fa eccezione BD, dal quale risulta più accurata la determinazione dell'età gestazionale nel GRUPPO 2 rispetto al GRUPPO 1 ( $P < 0,001$ ).

**Tabella 5.4 - Errore nel calcolo dell'età gestazionale (media  $\pm$  DS) per i diversi parametri considerati, con data di ovulazione nota e non nota.**

	<b>Data ovulazione nota (gruppo 1)</b>	<b>Data ovulazione non nota (gruppo 2)</b>	<b>P</b>
<b>ICC</b>	0,27 $\pm$ 0,47	0,72 $\pm$ 0,41	0,394
<b>CRL</b>	1,85 $\pm$ 1,49	3,34 $\pm$ 2,02	0,221
<b>BD</b>	1,92 $\pm$ 0,59	1,07 $\pm$ 0,40	<0,001
<b>BP</b>	2,06 $\pm$ 1,39	0,94 $\pm$ 0,77	0,109
<b>DPTV</b>	4,67 $\pm$ 1,36	3,59 $\pm$ 3,13	0,376

Nella tabella 5.5 sono riportati i dati inerenti alla la predizione della data di parto: è stata valutata la percentuale di animali per i quali il giorno di parto calcolato confrontato con la data effettiva di parto rientra nei seguenti intervalli:  $\pm 1$  giorno,  $\pm 2$  giorni,  $\pm 3$  giorni. Sono stati tenuti in considerazione sia i dati ottenuti per gli animali appartenenti al GRUPPO 1 che quelli del GRUPPO 2, senza distinzioni. Per ICC e BP la percentuale di animali dei quali è stato predetto il parto con un intervallo di  $\pm 1$  giorno è superiore al 70%. Questo vuol dire che calcolando la data di parto di una cagna utilizzando ICC o BP si ha una probabilità maggiore del 70% di avere il parto a  $\pm 1$  giorno dalla data prevista. Anche il parametro BD ha una buona accuratezza, con una probabilità del 90,9% di predizione della data di parto a  $\pm 2$  giorni. Invece due parametri che non sono molto accurati nel predire il parto sono CRL e, soprattutto, DPTV. Per queste misure l'accuratezza nel determinare il giorno del parto con una variabilità di  $\pm 3$  giorni non supera rispettivamente il 77% e il 70%.

**Tabella 5.5 - Percentuali di predizioni della data di parto per ciascun parametro che rientrano negli intervalli scelti**

	<b>ICC</b>	<b>CRL</b>	<b>BD</b>	<b>BP</b>	<b>DPTV</b>
<b><math>\pm 1</math> giorno</b>	73,3%	53,8%	63,6%	84,2%	30%
<b><math>\pm 2</math> giorni</b>	100%	69,2%	90,9%	94,7%	40%
<b><math>\pm 3</math> giorni</b>	100%	76,9%	95,5%	94,7%	70%

Le figure 5.6-5.10 rappresentano l'errore delle diverse misurazioni per i singoli parametri considerati rispetto alla retta di regressione da noi utilizzata per calcolare l'età gestazionale (Milani et al., 2011). Sull'asse delle ordinate è inserita l'età gestazionale reale mentre sull'asse delle ascisse la misura del parametro in questione. Nella maggior parte dei grafici i dati sono sotto alla retta di riferimento e questo è particolarmente evidente nel grafico riguardante DPTV (Fig. 5.10) e CRL (Fig. 5.7). Ciò significa che l'età gestazionale reale è inferiore rispetto a quella calcolata con la funzione di riferimento e quindi la maggior parte delle età gestazionali, entro i *range* dell'errore del parametro, sono sovrastimate rispetto alla retta di regressione. Di conseguenza la data di parto calcolata con un'età gestazionale maggiore del dovuto è precedente rispetto alla data di parto reale.

**Figura 5.6 – Rappresentazione grafica dei valori di ICC in relazione alla retta di riferimento (Milani et al., 2011)**

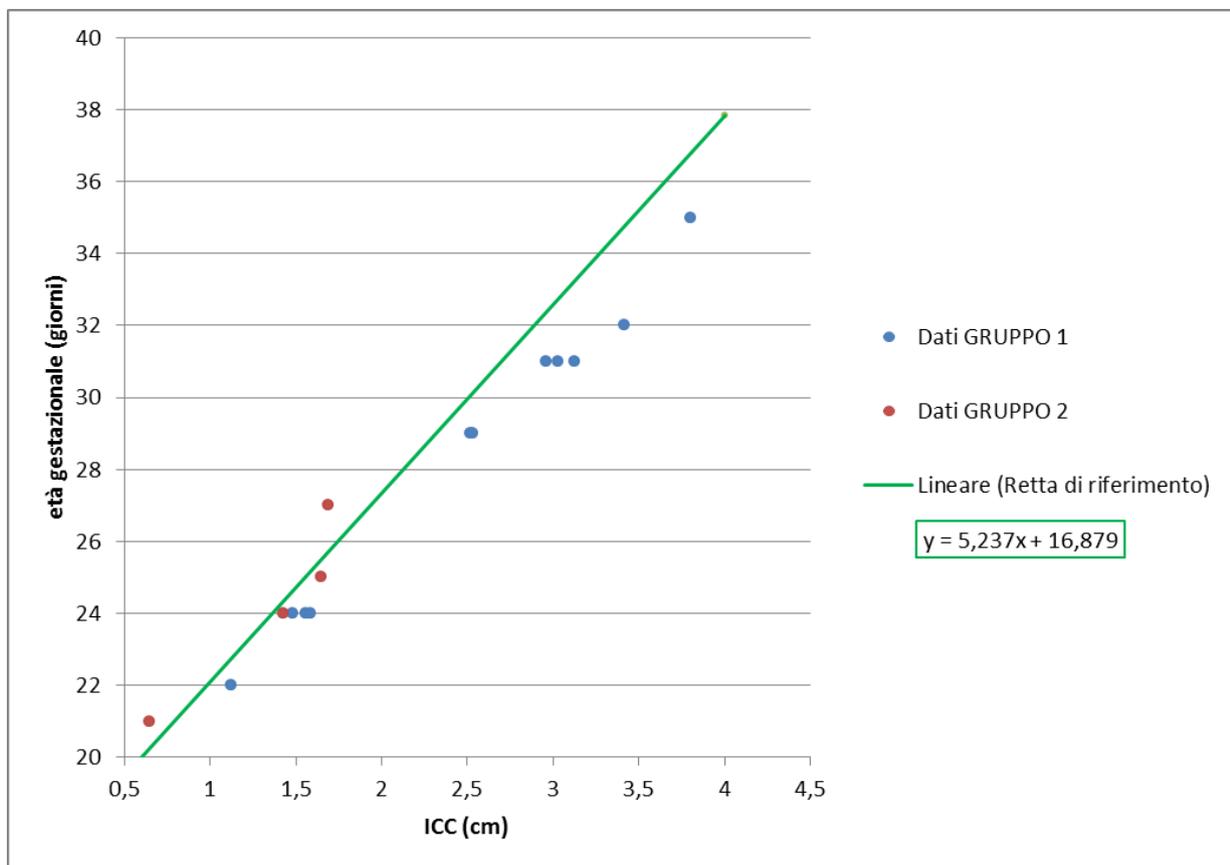


Figura 5.7 - Rappresentazione grafica dei valori di CRL in relazione alla retta di riferimento (Milani et al., 2011)

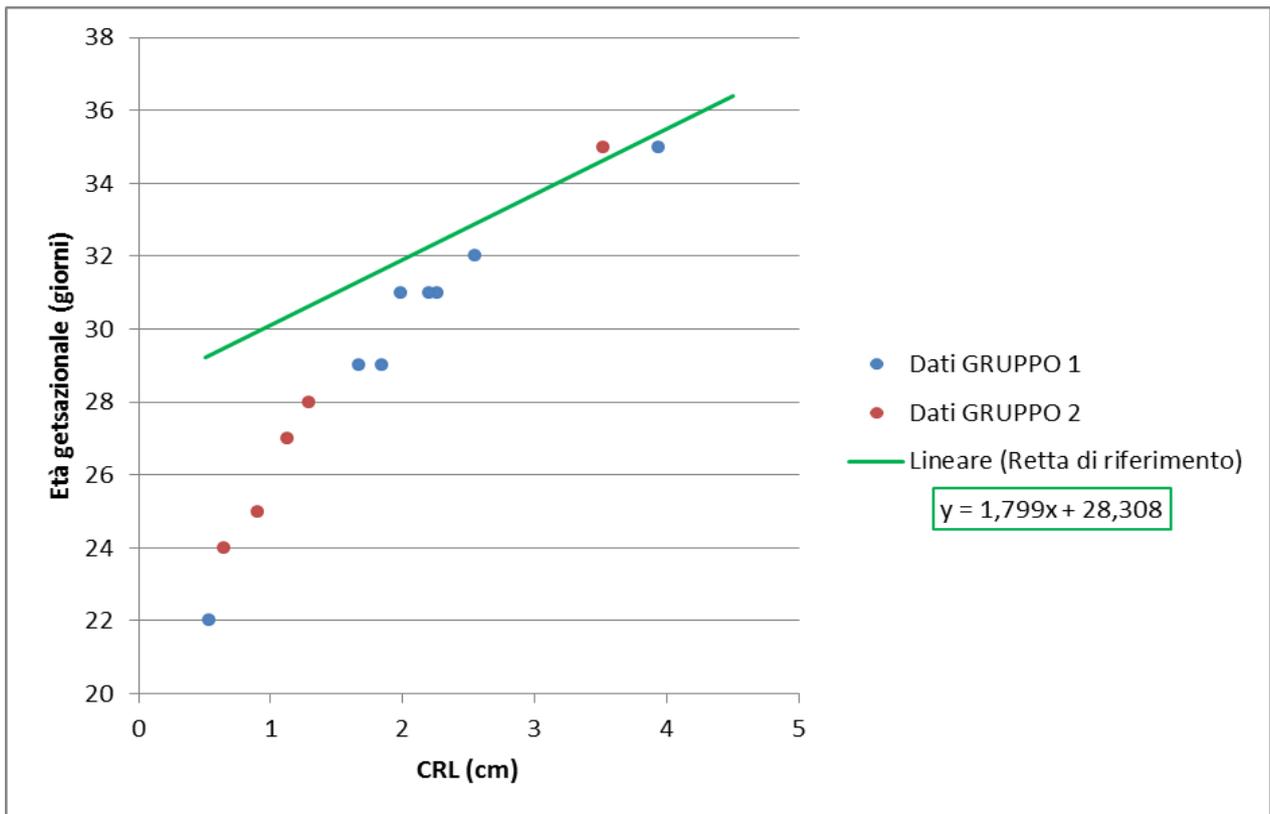


Figura 5.8 - Rappresentazione grafica dei valori di BD in relazione alla retta di riferimento (Milani et al., 2011)

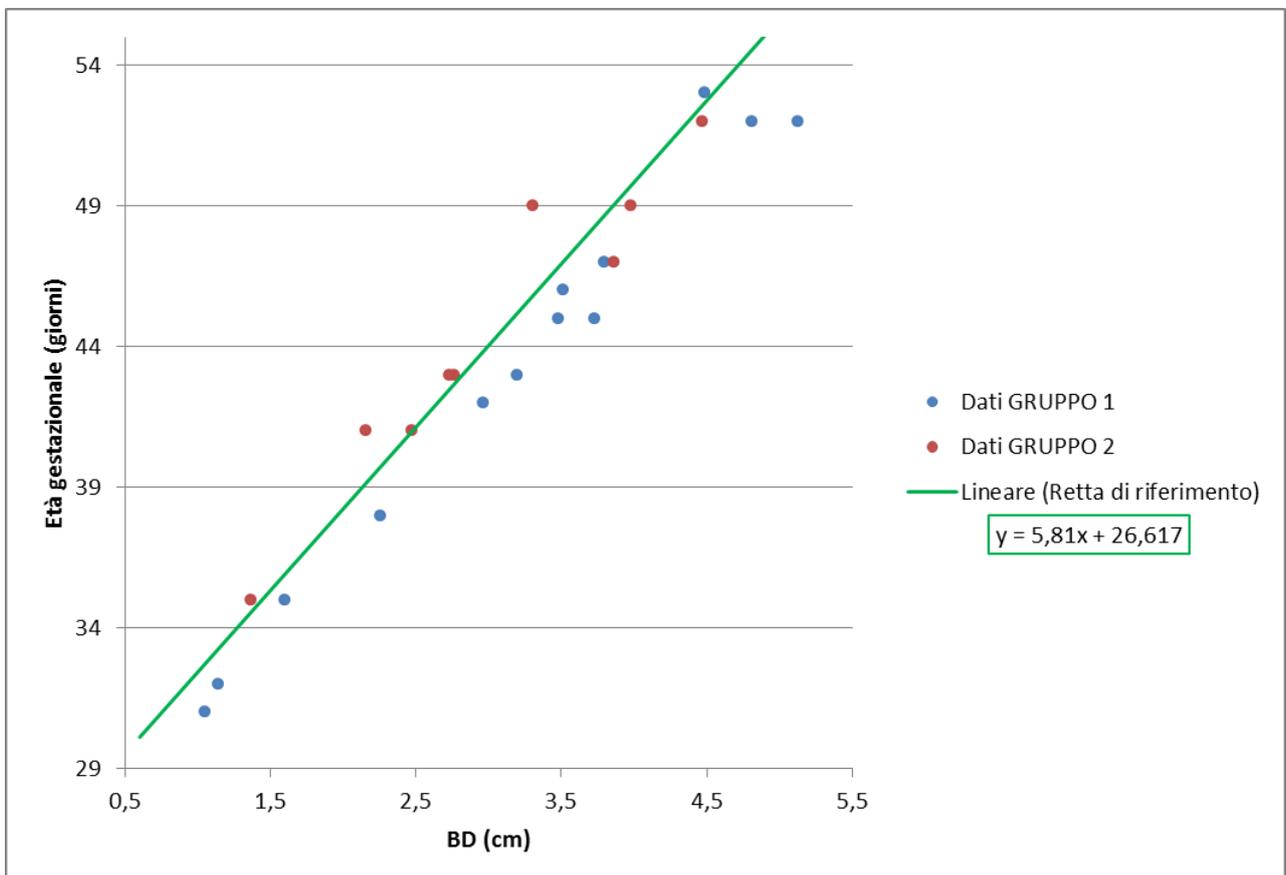


Figura 5.9 - Rappresentazione grafica dei valori di BP in relazione alla retta di riferimento (Milani et al., 2011)

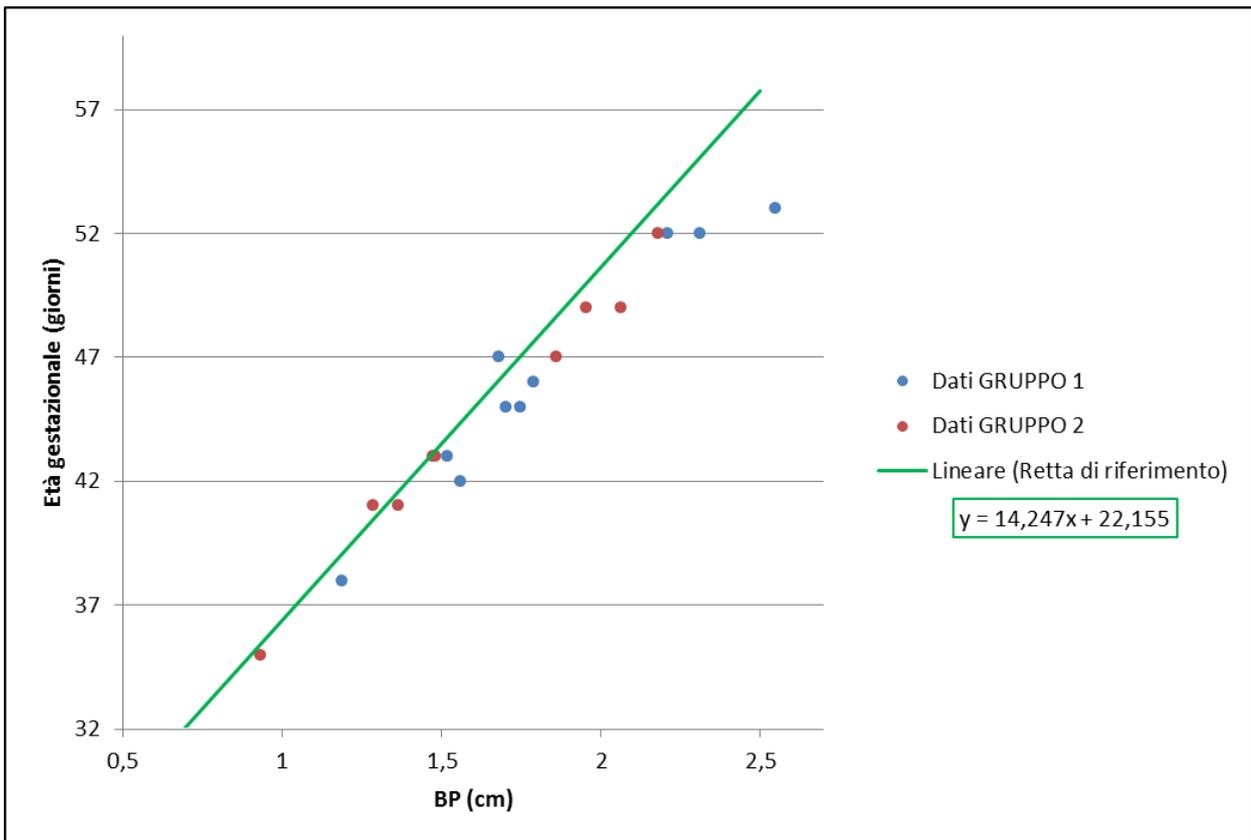
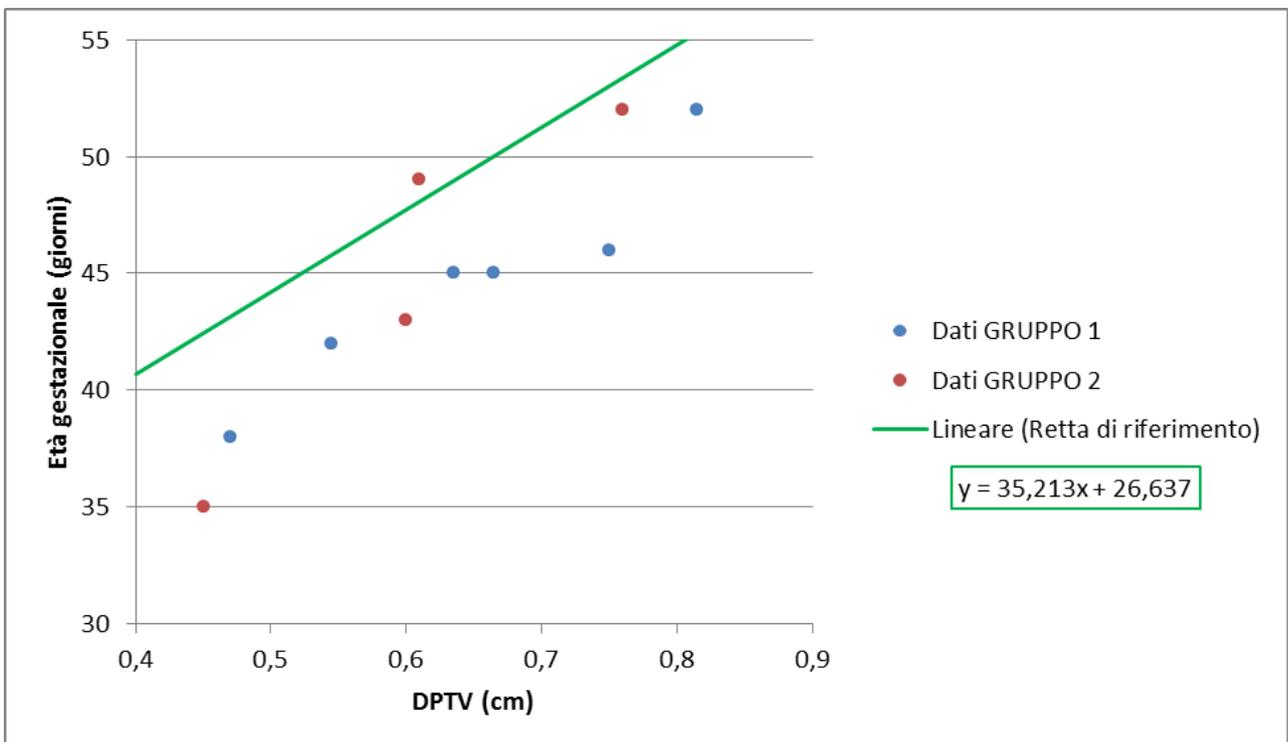


Figura 5.10 - Rappresentazione grafica dei valori di DPTV in relazione alla retta di riferimento (Milani et al., 2011)



## 6. DISCUSSIONE

L'esame ecografico è un metodo poco invasivo e ben tollerato dai pazienti. Permette di fare diagnosi di gravidanza precoce e di monitorare lo stato di salute dei feti. Nel nostro studio ogni ecografia durava in media 20 minuti, perché per ciascun animale abbiamo cercato di misurare tutti i parametri che si potevano visualizzare in base all'età gestazionale su almeno 2 feti. Scegliendo uno o due parametri l'esame ecografico risulta una metodica più rapida. Il parametro ICC è facilmente individuabile anche per un veterinario con poca esperienza, poiché i margini della vescicola embrionale anecogena sono netti. Anche BD è di facile visualizzazione e individuare la bolla gastrica in sezione trasversale è semplice anche in feti di piccole dimensioni. CRL è misurabile solo in un intervallo ben preciso, ovvero fino a quando cranio e bacino sono sullo stesso piano longitudinale. Secondo England et al. (1990) CRL non dovrebbe essere misurato oltre i 45 giorni di gestazione. Non è facile capire con l'ecografia se il feto ha cominciato a incurvarsi, soprattutto nei primi stadi, e quindi si rischia di misurare comunque il parametro con un peggioramento della sua accuratezza. Comunque nel nostro studio abbiamo rispettato questo limite, valutando il parametro tra i 22-35 giorni di gestazione. BP è un parametro facilmente valutabile e sempre più comodo da misurare man a mano che il feto cresce. Tuttavia talvolta può essere difficile visualizzare le ossa biparietali perfettamente parallele. DPTV nel nostro lavoro risulta il parametro più difficile da misurare e per questo motivo abbiamo ottenuto un numero di dati inferiore rispetto agli altri parametri. Infatti, non sempre è stato possibile visualizzare le strutture interne del cranio, mentre le ossa della testa sono sempre state ben evidenti.

In letteratura sono descritti diversi parametri ecografici fetali ed extra-fetali per predire la data di parto nella cagna. Il nostro studio si basa sul lavoro di Milani et al. (2011), che ha preso in considerazione ICC, OUD, PT, PL, CRL, BD, BP e DPTV. I parametri risultati più correlati con l'età gestazionale sono ICC e OUD nella prima metà della gravidanza, mentre CRL, BD, BP e DPTV nella seconda (Milani et al., 2011). Questi sono anche i parametri inclusi nel nostro studio, ad eccezione di OUD, che secondo Luvoni e Grioni (2000) è meno correlato all'età gestazionale rispetto a ICC, poiché i margini dell'utero non sono ben definiti come quello della vescicola corionica e come conseguenza si ha un peggioramento dell'accuratezza.

Dai nostri risultati emerge che ICC è significativamente più accurato nel calcolo dell'età gestazionale rispetto a tutti gli altri parametri presi in considerazione, mentre tra BD, BP, CRL e DPTV non sono emerse differenze. Molti autori sono concordi nell'affermare che ICC è uno dei parametri più accurati, ma sono in contrasto su quanto da noi riportato per BP (Beccaglia e Luvoni, 2006; Son et al., 2001; Luvoni e Grioni, 2000). Tali autori affermano che BP e ICC hanno la stessa

accuratezza nella determinazione della data di parto e che entrambi sono più accurati degli altri parametri da loro presi in considerazione. In particolare ICC risulta il parametro più correlato con l'età gestazionale in una fase precoce della gravidanza, mentre BP in una fase di gestazione più tardiva (Son et al., 2001; Luvoni e Beccaglia, 2006). Nel lavoro di Son et al. (2001) ICC e BP sono risultati più affidabili di OUD, PL, BD e CRL, mentre Beccaglia e Luvoni (2004) asseriscono che ICC e BP sono più accurati di DPTV nel calcolo della data di parto con un intervallo di  $\pm 1$  giorno. In effetti, anche dai nostri risultati emerge che BP ha un'ottima accuratezza nella predizione della data di parto, avendo un basso errore. Aumentando la nostra casistica è possibile che non ci sia una differenza significativa tra ICC e BP nella datazione del parto.

Non sono state rilevate differenze significative nell'errore di stima dell'età gestazionale per gli animali appartenenti al GRUPPO 1 e al GRUPPO 2. Ciò indica che è possibile predire la data di parto anche su animali di cui non si conosce il giorno dell'ovulazione, senza che questo influenzi l'accuratezza del calcolo. Questo risultato è molto importante da un punto di vista ambulatoriale, perché permette al veterinario di predire il giorno del parto con una buona accuratezza anche senza disporre di altri elementi (data di ovulazione o di accoppiamento).

ICC ha un errore inferiore a un giorno per entrambi i gruppi (GRUPPO 1 =  $0,27 \pm 0,47$  giorni e GRUPPO 2 =  $0,72 \pm 0,41$  giorni, rispettivamente) e il calcolo della data di parto è del 73% con un intervallo di  $\pm 1$  giorno, del 100% con  $\pm 2$  giorni. Diversi autori concordano nell'affermare che ICC è fortemente correlato all'età gestazionale e quindi è un buon parametro per la predizione della data di parto (Beccaglia e Luvoni, 2006; Luvoni e Beccaglia, 2006; Son et al., 2001; Luvoni e Grioni, 2000; Davidson e Baker, 2009; Beccaglia e Luvoni, 2004; Milani et al., 2011). ICC è un buon parametro per la facilità con cui è misurato e per la precocità con cui si può rilevare. Quando si fa diagnosi di gravidanza tramite l'ecografia questo parametro può già essere misurato, permettendo al proprietario dell'animale di conoscere sia se la cagna è gravida, sia il giorno previsto di parto con una sola visita in ambulatorio. Il fatto che il parametro sia valutato precocemente non ne diminuisce l'accuratezza, ma anzi la aumenta. Questo probabilmente è dovuto al fatto che, in un'epoca gestazionale precoce, i fattori che influenzano la durata della gravidanza, come la numerosità della nidiata o la razza, non hanno ancora svolto un ruolo rilevante (Yeager e Concannon, 1995). Anche nella donna, infatti, il metodo più accurato per determinare l'età gestazionale è l'esame ecografico eseguito nel primo trimestre di gravidanza (Hunter, 2009; Jehan et al., 2010).

Il parametro BP ha un errore nel calcolo dell'età gestazionale per GRUPPO 1 =  $2,06 \pm 1,39$  giorni e per GRUPPO 2 =  $0,94 \pm 0,77$  giorni. La predizione della data di parto ha un'accuratezza dell'84% con un intervallo di  $\pm 1$  giorno e del 95% con un intervallo di  $\pm 2$  giorni.

Per il parametro BD l'errore nel calcolo dell'età gestazionale è per GRUPPO 1 =  $1,92 \pm 0,59$  giorni e per GRUPPO 2 =  $1,07 \pm 0,40$  giorni. La predizione della data di parto è del 63,6% con un intervallo di  $\pm 1$  giorno e del 90% con un intervallo di tolleranza di  $\pm 2$  giorni.

CRL e DPTV sono i parametri che mostrano un errore maggiore degli altri. L'equazione da noi utilizzata per calcolare la data di parto con CRL ha un errore per GRUPPO 1 =  $1,85 \pm 1,49$  giorni e per GRUPPO 2 =  $3,34 \pm 2,02$  giorni. La percentuale di parti stimati a  $\pm 1$  giorno da quello reale è del 53%, mentre a  $\pm 2$  giorni è del 69,2%. Diversi studi prendono in considerazione CRL per stimare la data di parto (Luvoni e Beccaglia, 2006; Lenard et al., 2007; Son et al., 2001; Kutzler et al., 2003; Milani et al., 2011). Dallo studio di Son et al. (2001) emerge che CRL è linearmente correlato all'età gestazionale tra il 35°-49° giorno di gestazione, mentre prima del 35° giorno non ha una relazione lineare con l'età gestazionale. Anche dai nostri dati è emerso che i valori misurati di CRL non hanno sempre un andamento rettilineo: mostrano un aumento esponenziale tra i 22 e i 30 giorni di gestazione circa, dopo di che si dispongono più equamente attorno alla retta di riferimento (Fig. 4.7). È possibile che nel nostro lavoro questo parametro sia stato misurato troppo precocemente, quando non mostra ancora una relazione lineare con l'età gestazionale, e per questo motivo il suo errore è tra i più elevati.

Infine valutiamo DPTV: l'errore nel calcolo dell'età gestazionale è maggiore di tutti gli altri parametri considerati ( $4,67 \pm 1,36$  giorni per GRUPPO 1 e  $3,59 \pm 3,13$  giorni per GRUPPO 2) e l'accuratezza della previsione della data del parto è del 30% con un intervallo di  $\pm 1$  giorno, arriva al 40% con un intervallo di  $\pm 2$  giorni. Beccaglia et al. (2008) riportano che DPTV è un parametro significativamente e linearmente correlato con l'età gestazionale e ha un'accuratezza del 43% con un intervallo di  $\pm 1$  giorno e del 62% con un intervallo di  $\pm 2$  giorni. Asseriscono inoltre che valutare DPTV comporta un risparmio di tempo e può migliorare l'accuratezza del calcolo dell'età gestazionale, poiché è misurato sulla stessa immagine ecografica di BP. Beccaglia e Luvoni (2004) affermano che DPTV non è un parametro ottimale per predire il giorno del parto, ma che potrebbe essere utile quando associato a BP per aumentarne l'accuratezza.

Per stabilire l'affidabilità delle rette di riferimento da noi utilizzate (Milani et al., 2011), abbiamo preso in considerazione l'errore nella stima dell'età gestazionale e l'accuratezza nel calcolo della data di parto per ciascun parametro. Possiamo asserire che le rette di regressione usate per i parametri ICC, BP e BD sono accurate, mentre le rette riferite a CRL e DPTV andrebbero ricalcolare inserendo nuovi dati.

Dalle Figure 4.6-4.10 si evidenzia come la maggior parte dei valori siano sotto la retta di riferimento. Questo indica che, all'interno del *range* di errore di ciascun parametro, l'età gestazionale calcolata grazie alle equazioni di riferimento (Milani et al. 2011) è sovrastimata rispetto al suo valore reale. Questo è particolarmente evidente in quei parametri che presentano un elevato errore, come DPTV e CRL. Per questo motivo è necessario ridefinire le equazioni per il calcolo dell'età gestazionale inserendo i nuovi dati da noi acquisiti in questo studio, al fine di migliorarne l'accuratezza.

La durata media della gravidanza dall'ovulazione al parto nel nostro studio (GRUPPO 1) è più corta rispetto a quanto riportato in letteratura, cioè  $61,6 \pm 1,13$  giorni invece di 63. Questo potrebbe essere spiegato analizzando il metodo col quale abbiamo identificato l'ovulazione. Diversi autori riportano che il giorno dell'ovulazione è associato ad un intervallo della progesteronemia compreso tra 4-10 ng/ml (Vannozzi et al., 2001; Root Kustritz, 2001; Payan-Carreira et al., 2011). Basandoci su questi risultati, abbiamo stimato l'ovulazione come il giorno in cui la progesteronemia superava 8 ng/ml, escludendo la possibilità che avvenisse a valori inferiori di progesterone. In realtà, secondo altri studi l'ovulazione avviene a livelli di progesterone minori. Nel lavoro di Tsutsui et al. (2006) è stato preso in considerazione come giorno dell'ovulazione il giorno in cui il livello di P4 supera 2 ng/ml ed è stata ottenuta così una gravidanza media della durata di  $63,9 \pm 0,2$  giorni (media  $\pm$  DS). Secondo Luvoni e Beccaglia (2006) i valori di progesterone nel giorno dell'ovulazione sono compresi tra 3-6,6 ng/ml, mentre Son et al. (2001) stabiliscono tale giorno quando i valori di P4 superano 4 ng/ml. Questa grande variabilità è spiegata da Kutzler et al. (2003), che hanno mostrato come, dopo l'ovulazione, i valori di P4 varino molto tra animali di mole diversa. Per questo motivo tali autori affermano che per una determinazione più precisa del giorno del parto è preferibile valutare i valori del progesterone prima dell'ovulazione. La nostra assunzione del valore della progesteronemia associata all'ovulazione potrebbe spiegare l'accorciamento della durata media della gravidanza nei nostri dati rispetto a quanto riportato in letteratura.

Un'altra spiegazione alla durata di gravidanza inferiore rispetto al normale potrebbe anche essere ricercata nella razza degli animali inclusi nel nostro studio. Infatti, secondo Mir et al. (2011) la gravidanza del Pastore Tedesco è più breve rispetto ad altre razze. Al contrario Linde-Forsberg et al. (1999) non condividono l'ipotesi che la razza influenzi la durata della gravidanza. Tuttavia per quest'analisi sono state utilizzate una media di 3,6 cagne per ciascuna razza, mentre negli studi F. Mir et al. (2011) è stato messo a confronto un minimo di 24 individui per razza. Per questo motivo risultano più attendibili e si può presumere che la razza dell'animale influenzi la durata della gravidanza. Tutti questi studi sono stati eseguiti determinando la durata della gravidanza dal momento dell'ovulazione, che è stata stimata grazie ai valori del progesterone. Per una maggior

completezza bisognerebbe determinare se effettivamente c'è una differenza tra le varie razze nel periodo compreso tra l'ovulazione e il parto, oppure se semplicemente è diverso il momento dell'ovulazione rispetto ai valori di progesterone presi in considerazione. È possibile, infatti, che l'effettiva durata della gravidanza sia identica o molto simile tra le varie razze, ma che il giorno effettivo dell'ovulazione avvenga a valori di progesterone diversi (Mir et al., 2011).

Infine diversi autori concordano sulla necessità di differenziare il calcolo dell'età gestazionale in base alla taglia dell'animale (Kutzler et al., 2003; Kim et al., 2007) e, infatti, sono state sviluppate diverse equazioni che possono essere applicate a femmine di taglia diversa. Nel nostro caso non è stato necessario tener conto della razza dell'animale, perché le rette di riferimento da noi utilizzate derivano da un lavoro svolto interamente su cagne di razza Pastore Tedesco (Milani et al., 2011). Riteniamo che per una più accurata predizione della data di parto sia auspicabile sviluppare delle equazioni riferite a ciascuna razza.



## 7. CONCLUSIONI

L'esame ecografico è un metodo accurato e pratico per predire la data di parto nella cagna. È un esame poco invasivo per il paziente e permette di monitorare lo stato di salute dei feti. Il parametro più correlato all'età gestazionale tra quelli valutati è ICC, poiché facilmente individuabile e misurabile. BD e BP presentano un basso errore, anche se non sono significativamente più accurati di CRL e DPTV, che hanno l'errore maggiore.

È possibile calcolare l'età gestazionale di una cagna della quale non si conosce il giorno dell'ovulazione senza che questo porti a una diminuzione dell'accuratezza.

In futuro sarebbe auspicabile correggere le rette riferite a DPTV e CRL e definire nuove equazioni specifiche per altre razze canine.



## 8. BIBLIOGRAFIA

- Ari Jutkowitz L. (2005). Reproductive emergencies. *Vet Clin Small Anim* **35**, 397-420.
- Beccaglia M., Luvoni C.G. (2004). Ultrasonographic study during pregnancy of the growth of an encephalic portion in the canine foetus. *Vet Res Commun* **28**, 161-164.
- Beccaglia M., Luvoni C.G. (2006). Comparison of the accuracy of two ultrasonographic measurements in predicting the parturition date in the bitch. *J Small Anim Pract* **47**, 670-673.
- Beccaglia M., Faustini M., Luvoni C.G. (2008). Ultrasonographic study of deep portion of diencephalo-telencephalic vesicle for the determination of gestational age of the canine foetus. *Reprod Dom Anim* **43**, 367-370.
- Bouchard G.F., Solorzano N., Concannon P.W., Youngquist R.S., Bierschwal C.J. (1991). Determination of ovulation time in bitches based on teasing, vaginal cytology and Elisa for progesterone. *Theriogenology* **35**, 603-611.
- Cartee R.E., Rowles T. (1984). Preliminary study of the ultrasonographic diagnosis of pregnancy and fetal development in the dog. *Am J Vet Res* **45**, 1259-1265.
- Concannon P. W. (2011). Reproductive cycles of the domestic bitch. *Anim Reprod Scie* **124**, 200–210.
- Concannon P. W., McCann J.P., Temple M. (1989). Biology and endocrinology of ovulation, pregnancy and parturition in the dog. *J Reprod Fertil Suppl* **39**, 3-25.
- Concannon P. W., Whaley S., Lein D., Wissler R. (1983). Canine gestation length: variation related to time of mating and fertile life of sperm. *Am J Vet Res* **44**, 1819-1821.
- Concannon P.W. (2009). Endocrinologic control of normal canine ovarian function. *Reprod Dom Anim* **44**, 3-15.

Concannon P.W., Hansel W. (1977). Prostaglandins F<sub>2α</sub> induced luteolysis, hypothermia and abortion in Beagle bitches. *Prostaglandins* **13**, 533-542.

Concannon P.W., Powers M.E., Holder W., Hansel W. (1977). Pregnancy and parturition in the bitch. *Biol Reprod* **16**, 517-526.

Concannon P.W., Hansel W., McEntee K. (1997). Changes in LH, progesterone and sexual behavior associated with preovulatory luteinization in the bitch. *Biol Reprod* **17**, 604-613.

Concannon P.W., Hansel W., Visek W.J. (1975). The ovarian cycle of the bitch: plasma estrogen, LH and progesterone. *Biol Reprod* **13**, 112-121.

Davidson A.P., Baker T.W. (2009). Reproductive ultrasound of the bitch and queen. *Top Companion Anim M* **24**, 55-63.

De Gier J., Kooistra H.S., Djajadiningrat-Laanen S.C., Dieleman S.J., Okkens A.C. (2006). Temporal relations between plasma concentrations of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, estradiol-17 $\beta$ , progesterone, prolactin, and  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone during the follicular, ovulatory and early luteal phase in the bitch. *Theriogenology* **65**, 1346-1359.

Doak R. L., Hall A., Dale H. E. (1967). Longevity of spermatozoa in the reproductive tract of the bitch. *J Reprod Fert* **13**, 51-58.

Eilts B. E., Davidson A.P., Hosgood G., Paccamonti D. L., Baker D. G. (2005). Factors affecting gestation duration in the bitch. *Theriogenology* **64**, 242–251.

England G.C.W., Russo M. (2006). Ultrasonographic characteristic of early pregnancy failure in bitches. *Theriogenology* **66**, 1694-1698.

England G.C.W., Yeager A. (1993). Ultrasonographic appearance of the ovary and uterus of the bitch during oestrus, ovulation and early pregnancy. *J Reprod Fertil Suppl* **47**, 107-117.

England G.C.W., Edward Allen W., Porter D.J. (1990). Studies on canine pregnancy using B-mode ultrasound: development of the conceptus and determination of gestational age. *J Small Anim Pract* **31**, 324-329.

Gavrilovic B. B., Andersson K., Forsberg C. L. (2008). Reproductive patterns in the domestic dog – A retrospective study of the Drever breed. *Theriogenology* **70**, 783-794.

Hase M., Hori T., Kawakami E., Tsutsui T. (2000). Plasma LH and progesterone levels before and after ovulation and observation of ovarian follicles by ultrasonographic diagnosis system in dogs. *J. Vet Med Sci* **62**, 243-248.

Holst P.A., Plemister R.D. (1974). Onset of diestrus in the Beagle bitch: definition and significance. *Am J Vet Res* **35**, 401-406.

Hunter L.A. (2009). Issues in Pregnancy Dating: Revisiting the Evidence. *J Midwifery Wom Heal* **54**,184–190.

Jehan I., Zaidi S., Rizvi S., Mobeen N., McClure E.M., Munoz B., Pasha O., Wright L.L., Goldenberg R.L. (2010). Dating gestational age by last menstrual period, symphysis-fundal height, and ultrasound in urban Pakistan. *Int J Gynecol Obstet* **110**, 231–234.

Johnson C.A (2008). Pregnancy management in the bitch. *Theriogenology* **70**, 1412-1417.

Kim B., Son C. (2007). Time of initial detection of fetal and extra-fetal structures by ultrasonographic examination in Miniature Schnauzer bitches. *J Vet Sci* **8**, 289-293.

Kim Y., Travis A.J., Meyers-Wallen V.N. (2007). Parturition prediction and timing of canine pregnancy. *Theriogenology* **68**, 1177-1182.

Kutzler M. A., Mohammed H. O., Labm S. V., Meyers-Wallen V. N. (2003). Accuracy of canine parturition date prediction from the initial rise in preovulatory progesterone concentration. *Theriogenology* **60**, 1187-1196.

Lenard Z.M., Hopper B.J., Lester N.V., Richardson J.L., Robertson I.D. (2007). Accuracy of prediction of canine litter size and gestational age with ultrasound. *Aust Vet J* **85**, 222-225.

Linde-Forsberg C., Ström- Holst B., Govette G. (1999). Comparison of fertility data from vaginal vs intrauterine insemination of frozen-thawed dog semen: a retrospective study. *Theriogenology* **52**, 11-23.

Lopate C. (2008). Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: a review. *Theriogenology* **70**, 397-402.

Luvoni C.G., Beccaglia M. (2006). The prediction of parturition date in canine pregnancy. *Reprod Dom Anim* **41**, 27-32.

Luvoni C.G., Grioni A. (2000). Determination of gestational age in medium and small size bitches using ultrasonographic fetal measurements. *J Small Anim Pract* **41**, 292-294.

Milani C., Eccel A., Sontas B.H., Mollo A., Romagnoli S. (2011). Correlation of foetal and extra-foetal parameters with gestational age in estimation of parturition date in German Shepherd Bitches. Proceedings of 14th Evssar Congress- Advances in Feline Reproduction. Milano, 11th March, pag. 77.

Mir F., Billault C., Fontaine E., Sendra J., Fontbonne A. (2011). Estimated pregnancy length from ovulation to parturition in the bitch and its influencing factors: a retrospective study in 162 pregnancies. *Reprod Dom Anim* **46**, 994-998.

Moxon R., Batty H., Irons G., Engalnd G.C.W. (2012). Preovulatory changes in the endoscopic appearance of the reproductive tract and teasing behavior in the bitch. *Theriogenology* **78**, 1907-1916.

Okkens A.C., Hekerman T.W.M., De Vogel J.W.A., Van Haaften B. (1993). Influence of litter size and breed on variation in length of gestation in the dog. *Vet Quart* **15**, 160-161.

Payan-Carreira R., Miranda S., Nizanski W. (2011). Artificial Insemination in Dogs, Artificial Insemination in Farm Animals, Dr. Milad Manafi (Ed.), ISBN: 978-953-307-312-5, InTech,

Available from:<http://www.intechopen.com/books/artificial-insemination-in-farm-animals/artificial-insemination-in-dogs>.

Phemister R.D., Holst P.A., Spano J.S., Hopwood M.L. (1973). Time of ovulation in the beagle bitch. *Biol Reprod* **8**, 74-82.

Poli A., Ciorba A., Manuali E. (2007). Apparato riproduttore femminile. In *Citologia del cane e del gatto*, pp. 174-176. Ed. Appicciuttuli V. Città di Castello: Polletto Editore srl.

Post K. (1985). Canine vaginal cytology during the estrous cycle. *Can Vet J* **26**, 101-104.

Renton J.P., Boyd J.S., Ecklersall P.D., Ferguson J.M., Harvey M.J.A., Mullaney J., Perry B. (1991). Ovulation, fertilization and early embryonic development in the bitch (*Canis familiaris*). *J Reprod Fert* **93**, 221-231.

Root Kustritz M.V. (2001). Use of commercial luteinizing hormone and progesterone sssay kits in canine breeding management. Eds. Concannon P.W., England G., Verstegen III J., Linde Forsberg C. Ithaca: International Veterinary Information Service.

Root Kustritz M.V. (2005). Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog. *Theriogenology* **64**, 755-765.

Seki M., Watanabe N., Ishii K., Kinoshita Y., Aihara T., Takeiri S., Otoi T. (2010). Influence of parity and litter size on gestation length in beagle dogs. *Can J Vet Res* **74**, 78-80.

Sherwood L., Klandorf H. e Yancey P. (2006). Il Sistema riproduttore. In *Fisiologia degli animali dai geni agli organismi*, pp. 730-759. Bologna: Zanichelli editore S.p.A.

Silva L.D.M., Onclin K., Verstegen J.P. (1996). Assessment of ovarian changes around ovulation in bitches by ultrasonography, laparoscopy and hormonal assays. *Vet Radiol Ultrasound* **37**, 313-320.

Smith F.O. (2007). Challenges in small animal parturition – timing elective and emergency cesarean sections. *Theriogenology* **68**, 348-353.

Son C., Jeong K., Kim J., Park I., Kim S., Lee C. (2001). Establishment of the prediction table of parturition day with ultrasonography in small pet dogs. *J Vet Med Sci* **63**, 715-721.

Vannozzi I., Benetti C., Rota A., Pregliasco M. (2001). Monitoraggio ecografico dell'ovulazione nella cagna: risultati preliminari. *Annali della Facoltà di Medicina veterinaria* **20**, 257-264.

Veronesi M.C., Battocchio M., Marinelli L., Faustini M., Kindahl H., Cairoli F. (2002). Correlations among body temperature, plasma progesterone, cortisol and prostaglandin F<sub>2α</sub> of the periparturient bitch. *J Vet Med* **49**, 264-268.

Wildt D.E., Chakraborty P. K., Panko W. B., Seager S. W. J. (1978). Relationship of Reproductive Behavior, Serum Luteinizing Hormone and Time of Ovulation in the Bitch. *Biol Reprod* **18**, 561-570.

Yeager A.E., Concannon P.W. (1995). Ultrasonography of the reproductive tract of the female dog and cat. In *Kirk's current veterinary therapy: XII small animal practice*, pp. 1040-1052. Eds. Bonagura, J.D. e Kirk, R.W. Philadelphia: Saunders.

Yeager A.E., Mohammed H.O., Meyers-Wallen V., Vannerson L., Concannon P.W. (1992). Ultrasonographic appearance of the uterus, placenta, fetus and fetal membranes throughout accurately timed pregnancy in Beagles. *Am J Vet Res* **53**, 342-351.





## RINGRAZIAMENTI

Per prima vorrei ringraziare Chiara, per essere sempre allegra e positiva e così coinvolta dalla materia da trasmettere il suo entusiasmo. Sei sempre stata disponibile e paziente con me fino alla fine. Vorrei anche ringraziare Juri e Marta per avermi fornito un aiuto indispensabile.

DOVEROSO ringraziare mamma e papà. Mi avete permesso di realizzare il mio sogno, mi avete sempre cercato di capire e sostenere in tutto. Siete dei genitori meravigliosi, mi avete trasmesso dei valori forti e mi avete dato la fiducia in me stessa che mi ha aiutata ad arrivare fino a qui.

Marco, il mio fratellino. Se devo trovare un aspetto che davvero rimpiango di questa università è che ho vissuto tanti anni lontana da te, mentre tu crescevi. Adesso sei grande e io sono (quasi sempre :P) orgogliosa di te. Grazie per aver tante volte preso le mie parti a prescindere e, nonostante tutte le litigate, grazie per la nostra complicità.

Grazie a Paolo. Grazie per questi 2 anni magici e per tutte le cose dolcine, per essere rimasto qui per me, per farmi sempre ridere e per farmi sentire bella, per prepararmi e portarmi la cena a letto, grazie per il gattino arancio, grazie per avermi sopportata in periodo di esami e per quello che immagino tu abbia fatto in questa occasione e grazie per mille altre cose che non posso elencare <3.

Grazie al Cala. Cosa dire. Lo sai che per me sei come un fratello che non ho potuto scegliere, ma del quale purtroppo non posso fare a meno. Grazie perché sei una delle persone che mi conosce meglio, in tutti questi anni siamo cresciuti insieme, grazie perché hai un segreto per ogni capello, grazie perché qualsiasi cosa io faccia, anche la più orribile, so di poter contare su di te.

Grazie al mio cuore Fede Chiù, in arte Fray. Sei la persona più gentile e carina che conosco. Grazie per la passione che abbiamo condiviso per molti anni, grazie per aver cantato con me per delle ore in gita, grazie per le giornate "donna" che passiamo insieme, grazie per poterti dire tutto quello che mi passa in testa, grazie per essere così svampita e adorabile.

Grazie ai compagni dell'università che mi hanno accompagnato in questo viaggio e coi quali ho passato dei momenti indimenticabili. Grazie a Elia, Freddy, Lavi, Greta, Alessia, Teo, Greta, Matteo... Grazie per il Texas, per la giornate passate a studiare e per quelle passate a giocare a pallavolo, grazie per le numerose serate stupende e per gli Agriparty, grazie per i passaggi in macchina (Elaia), grazie per aver sopportato i miei soprannomi (Freddinino), grazie per aver smesso insieme con la radiologia (Lavi..) un sentito ringraziamento alla Isina, senza la quale nessuno di noi sarebbe arrivato a questo felice giorno.

Grazie anche a Miki e Alessio, perché le vere amicizie non finiscono neanche quando uno vive a Padova, uno a Venezia e uno a Firenze. Anche se non ci sentiamo molto spesso, quando vi vedo mi sembra di avere ancora 18 anni.

Grazie ai vecchi amici Legnaresi Fabritz, Mattia e Manuel, coi quali ho condiviso cene squisite e serate felici. Grazie per aver sopportato la mia fissa per "Paradise", grazie per aver sempre cantato con me le canzoni di Natale, grazie per gli gnocchi alla zucca, grazie per il presepe vivente, grazie per la sambuca sul muro.

Grazie ai nuovi amici Legnaresi Giulietta Rossa, Daniele, Alice e Jack per i numerosi spritz e per le lucubrazioni più impensabili! Un ringraziamento particolare a Giulia, per le torte bellissime che riesci a preparare, per la festa di Halloween più bella mai organizzata, per aver condiviso l'orrore di un esame impossibile, per la nostra comune adorazione per i gattini.

Grazie anche alle mie vecchie care coinquiline Arianna, Franci, Sabri ed Elisa (ma sì dai), per aver condiviso così tanti anni sotto quelle mura cadenti e quel tetto che perdeva. Grazie per aver sempre ascoltato e dato consigli, grazie per le feste che mi avete permesso di organizzare e a cui non mancavate mai di partecipare. Grazie per le lotte con Roberto, per i video stupidi, per i poster e per le mille altre cose che abbiamo condiviso.

Grazie a tutti gli zii, i nonni, i parenti che hanno partecipato oggi e che non mancavano mai di chiedermi come andavano i miei studi e che oggi finalmente mi vedranno Dottoressa.

Grazie a Paolo e Mauro, per essere sempre carini con me, per difendermi quando la mamma mi stuzzica (e grazie anche un po' per portare la mamma fuori di casa).

Grazie ai veterinari Andre, Michela e Silvia, sempre gentili e disponibili a insegnarmi cose nuove.

In ultimo, ma non certo per importanza, grazie a Minù, una delle principali ragioni per cui ho scelto questo corso di laurea. Grazie a Lily e Robin, che mi fanno una compagnia incredibile. Grazie a Tobia, perché 3 prrrr sono meglio di 2. Grazie anche a Maggie e Jack, che mi fanno sempre sentire a casa.

