

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI
AGRONOMIA, ANIMALI, ALIMENTI, RISORSE NATURALI E AMBIENTE

TESI DI LAUREA IN SCIENZE E TECNOLOGIE ANIMALI

**DOSAGGIO DEL PROGESTERONE NEL LATTE PER LA
DIAGNOSI DI IPOFERTILITA' E GRAVIDANZA PRECOCE
NELLA BOVINA**

**THE USE OF MILK PROGESTERONE PROFILES TO
DETECT SUBFERTILITY AND EARLY PREGNANCY IN DIARY
COWS**

Relatore: Prof. Gianfranco Gabai

Laureanda: Bressan Angela

Matricola n. 1005549

ANNO ACCADEMICO 2013 – 2014

INDICE

1.	RIASSUNTO	5
	SUMMARY	6
2.	IPOFERTILITA'	7
3.	CICLO ESTRALE NELLA BOVINA.....	11
4.	IL PROGESTERONE	15
5.	SAGGIO DEL PROGESTERONE NEL LATTE	17
	PROGESTERONE E LA DIAGNOSI PRECOCE DI GRAVIDANZA	20
	PROGESTERONE E POST-PARTUM	22
	PROGESTERONE ED “EMBRYO SURVIVAL”	24
6.	ALTRI METODI.....	27
	TECNICHE DI RILEVAMENTO DEL CALORE	27
	DIAGNOSI DI GRAVIDANZA	30
7.	CONCLUSIONI.....	31
8.	BIBLIOGRAFIA	33
9.	SITOGRAFIA	37

1. RIASSUNTO

Una delle cause principali di ipofertilità, sotto il profilo manageriale, è rappresentata dal mancato riconoscimento tempestivo dei calori.

Questo fenomeno accade, molto spesso, in allevamenti dove il metodo usato si basa esclusivamente sull'osservazione dei cambiamenti comportamentali delle bovine in estro.

Attualmente, le nuove tecnologie offrono sistemi di identificazione in grado di riconoscere animali in calore, e di conseguenza, quelli con alterata attività ciclica.

Infatti, tra i problemi più comuni nelle bovine da latte, possiamo ricordare:

- Calore silente associato a cisti follicolari;
- Ciclicità alterata associata a corpo luteo persistente o mortalità embrionale.

Attraverso il controllo degli ormoni presenti nel plasma e nel latte, è possibile tracciare un profilo ormonale nel post-partum di ogni bovina e identificare, così, le possibili cause di infertilità.

Nella presente tesi si intende mostrare il dosaggio del progesterone (P4) nel latte come strumento per la determinazione dello stato di ipofertilità, ottimo supporto per l'individuazione del calore e "diagnosi indiretta" dello stato di gravidanza precoce nella bovina.

Nel tentativo di evidenziare i vantaggi di un controllo ormonale durante le fasi essenziali della vita di una bovina da latte, si è partiti a considerare le possibili cause di infertilità nelle aziende.

Si è passati, poi, alla descrizione vera e propria del progesterone arrivando a considerare, la sua determinazione nel latte, valido strumento per monitorare la fertilità bovina; si è cercato, infatti, di confermare la sua efficienza, riportando studi condotti da diversi autori. Viene spiegata, inoltre, la relazione tra il P4 e la sopravvivenza embrionale attraverso il "riconoscimento materno".

Parallelamente si è cercato di illustrare il metodo di analisi ELISA considerando eventuali variazioni di concentrazione del P4 nella composizione del latte e nel luogo di stoccaggio nella ghiandola mammaria.

Vengono, infine, messi a confronto altri metodi di rilevamento del calore e le proteine PAG e PBSP come diagnosi di gravidanza precoce.

SUMMARY

One of the main causes of infertility, is unsuccessful of heat detection and this often happens in herds where the method used is based only on the observation of specific behavioral changes associated with heat.

Currently, new technologies offer identification systems able to recognize animals in heat, and consequently those with impaired cyclic activity. In fact, through the control of hormones in plasma and milk it's possible to draw a hormonal profile in the cow post-partum and identify causes of infertility.

This thesis aims to show the progesterone (P4) assay in milk as a tool for determining the status of infertility, support for heat detection and “indirect diagnosis” of early pregnancy in dairy cows; its efficiency, in fact, is confirmed reporting studies by different authors. The relationship between the P4 and embryonic survival is also explained.

At the same time, the method of ELISA analysis are illustrated taking into account any changes in the concentration of P4 in milk composition and the place of storage in the mammary gland.

Finally, other methods of heat detection are compared and protein PAG and PBSP are shown as the diagnosis of early pregnancy

2. IPOFERTILITA'

“L’infertilità non è una malattia, ma semplicemente un sintomo ...”

Dickey et al (2000)

Negli ultimi anni si sente sempre più parlare di “fertilità” come pilastro portante della zootecnia, rappresentando un fattore di notevole importanza per le scelte manageriali, soprattutto, nell’allevamento della bovina da latte. In Italia si è assistito ad un progressivo e preoccupante peggioramento degli indici riproduttivi arrivando, così, a parlare di ipofertilità.

Possiamo definire l’ipofertilità come una scarsa capacità dell’animale di concepire o portare avanti una gravidanza.

I problemi legati alla fertilità, costituiscono la causa principale di riforma degli animali e il prolungamento del periodo tra un parto e l’altro (interparto) oltre il limite considerato ottimale di circa 365 giorni, si rivela per l’allevatore un costo, in termini di trasformazione degli alimenti in latte e nell’impiego di strutture e manodopera. (Modenesi et al., 1988).

Poiché “... la fertilità deve essere interpretata come attività di lusso, e cioè presente solo se esiste un certo livello di salute” (Ballarini, 1987), si può introdurre il concetto di benessere animale.

Ripetuti trattamenti farmacologici, oltre a rappresentare un costo per allevatore, si trasformano in una situazione di stress per l’animale.

È stato dimostrato, infatti, che lo stress provoca la stimolazione dell’ipotalamo, il quale risponde rilasciando CRH (corticotropina) e AVP (arginina vasopressina). A livello ipofisario viene rilasciato ACTH e, a livello del surrene, cortisolo. La stimolazione prolungata delle ghiandole surrenali provoca:

- Rallentamento sviluppo follicolare;
- Riduzione secrezione di E2;
- Ritardo dell’ovulazione.

Diversi autori considerano l’ipofertilità come effetto di una molteplicità di fattori quali la genetica, l’alimentazione e i cambiamenti metabolici, scelte manageriali e diversi stati di malattia.

Molto più spesso si evidenzia come il miglioramento genetico abbia portato alla “creazione” di bovine molto più produttive a discapito della loro efficienza riproduttiva (Tabella.1). Diversi

lavori hanno descritto questo fenomeno, con un tasso di concepimento che passa dal 65%, nel periodo compreso tra il 1975 e il 1982, al 45% dei giorni nostri (Bach, 2011).

KG DI LATTE	% FERTILITA'
<5900	48.5
6000-6800	45.1
6900-7800	41.0
7900-8700	38.6
>8800	38.5

Tabella.1- Nella tabella sono riportati i kg di latte prodotto per lattazione e la relativa % di funzionalità riproduttiva (da: Bach,2011)

Anche i cambiamenti metabolici che si verificano nel periodo del post-partum contribuiscono al declino delle performance riproduttive.

La perdita di peso nelle prime settimane di lattazione viene strettamente collegata al *deficit* energetico che la bovina si trova a dover affrontare. Il bilancio energetico, di norma, è negativo nelle prime 4 o 7 settimane di lattazione e raggiunge i valori minimi nelle prime due (Formigoni, 2014). Come questo possa compromettere la fertilità è spiegato dal fatto che le riserve corporee dell'animale vengono destinate, oltre in risposta al deficit energetico, alla produzione di latte e al ripristino di una buona condizione corporea.

Le perturbazioni metaboliche caratterizzanti la bovina nell'immediato post-partum sarebbero responsabili sia di un minor numero di follicoli primordiali reclutati, sia della mancata evoluzione di follicoli preantrali che andrebbero incontro più facilmente ad atresia. La mancanza di follicoli ricettivi all'azione delle gonadotropine spiegano il ritardo di pulsazione di LH e ovulazione (Formigoni, 2014).

Per quanto riguarda il profilo manageriale, gli allevamenti intensivi, oggi, richiedono elevata professionalità nell'individuazione dei calori. Spesso e volentieri l'ipofertilità viene collegata al mancato riconoscimento del calore da parte di tecnici o allevatori e, di conseguenza, ad inseminazioni eseguite nei tempi sbagliati. Il 30% delle bovine, infatti, manifesta il calore con una durata inferiore alle 6 ore e l'intensità di espressione è molto debole. In queste circostanze, il tasso di concepimento con un singolo intervento di inseminazione varia dal 50 al 60% (Phillips, 1989).

Gli errori di origine alimentare, invece, possono essere di diversa natura, spaziando dall'errato apporto energetico, proteico, minerale e vitaminico. La carenza proteica può determinare calori

meno evidenti con formazione di piccoli corpi lutei e conseguente minor produzione di progesterone. Il fosforo, lo zinco ed il manganese intervengono a livello dell'ipofisi anteriore stimolando la produzione di FSH ed LH; la loro carenza provoca anestri o calori silenti. La vitamina A può essere considerata un fattore vitaminico antisterile sia perché agisce come protezione degli epitelii degli organi sessuali sia perché interviene nei processi di sintesi del progesterone (Gambetti e Marasi, 1987).

Di notevole importanza risulta, infine, la relazione tra fertilità e malattie che coinvolgono l'apparato riproduttore. Tra le svariate cause che provocano infertilità rientrano anche circostanze di natura infettiva riconducibili ad aborto, riassorbimento embrionale, metriti e mastite (Cavirani, 2003).

Lo stress da malattia può provocare una limitata ingestione di alimenti determinando una diminuzione dei nutrienti dei quali si ha maggior fabbisogno a causa dello stesso stress (Bertoni, 2003).

Le patologie che si manifestano più frequentemente nella bovina da latte sono:

- Cisti ovariche
- Corpo luteo persistente
- Repeat breeding

Le cisti ovariche rappresentano uno dei principali problemi riproduttivi e sembra che il 10-14% delle bovine, almeno una volta nella loro carriera, ne sia colpito con un'incidenza del 35-45% (Cairolì e Angioletti, 2003). Se non avviene l'ovulazione, il follicolo diventa *cisti follicolare*; se il tessuto luteinico non subisce la luteolisi la struttura viene denominata *cisti luteinica* (Mollo A: appunti di lezione tratti dal corso di Clinica ostetrica bovina del Prof. S. Degl'innocenti, Università di Perugia). Poiché la manifestazione principale è rappresentata per un 85% da anestria, indipendentemente dal tipo di cisti (Cairolì, 2003), la distinzione viene effettuata attraverso il saggio del progesterone.

Il corpo luteo persistente viene associato ad aciclia durante la quale la crescita follicolare continua, ma i follicoli non ovulano a causa della presenza del P4 rilasciato dal CL.

Una bovina, invece, con ciclo estrale regolare, che non risulta gravida dopo tre o più interventi di inseminazione artificiale, viene denominata "Repeat Breeder". Questa condizione potrebbe dipendere da mancato concepimento o riassorbimento embrionale entro i 16 giorni dalla fecondazione (Cairolì, 2003). Tuttavia, non esistono mezzi disponibili in grado di confermare la presenza dell'embrione prima dei 25-30 giorni dalla fecondazione (Fig.1).

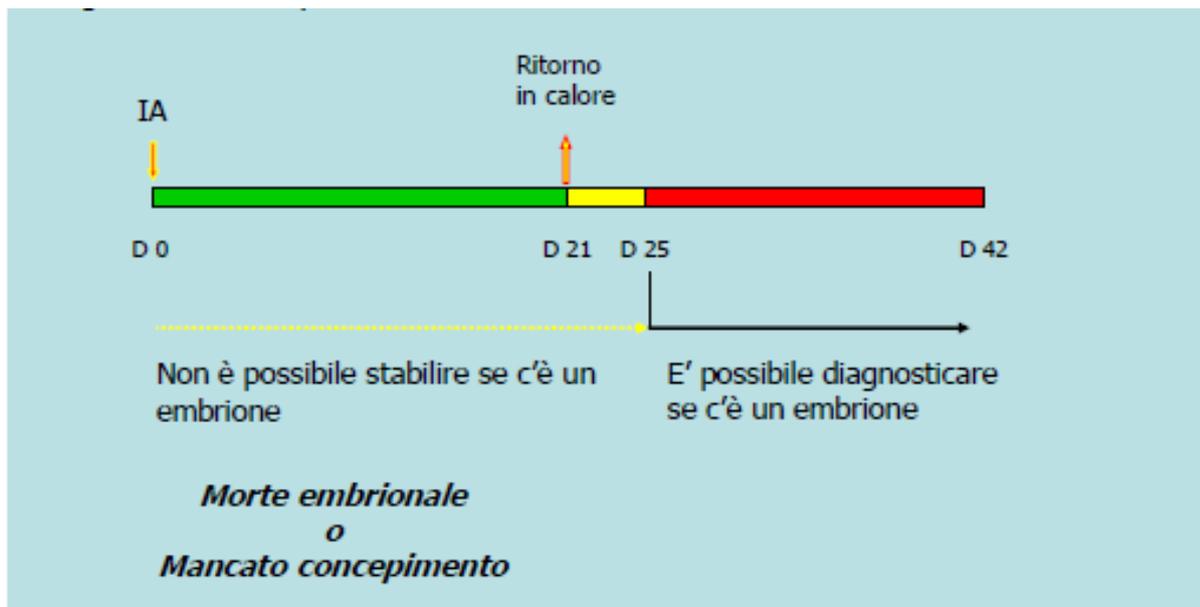


Fig.1- Repeat Breeding.

3. CICLO ESTRALE NELLA BOVINA

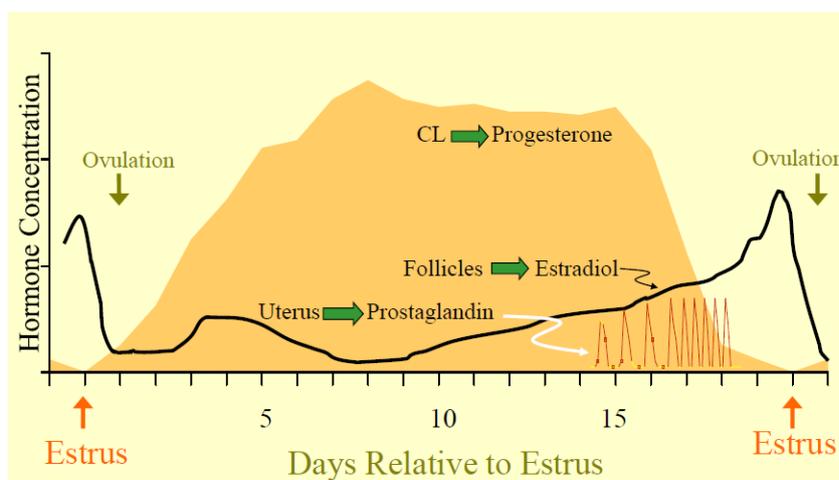


Fig.2- Variazioni dei principali ormoni coinvolti nel ciclo estrale della bovina.

Il ciclo estrale negli animali domestici è la serie di eventi che si ripetono tra un periodo di recettività sessuale e il successivo (Sanger, 2003).

La bovina è un animale poliestrale, ovvero i cicli avvengono uniformemente tutto l'anno e sono interrotti dalla gravidanza.

La durata del ciclo nella bovina si aggira intorno i 21 giorni (dai 19–21) e viene suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, metaestro e diestro.

Durante la fase di **proestro**, i follicoli pre-ovulatori crescono nelle ovaie fino a raggiungere un diametro di circa 2-2.5 cm (Peters e Ball, 1986). Questo accrescimento avviene in risposta al rilascio di gonadotropine (FSH e LH) con conseguente secrezione di estradiolo E2 da parte del follicolo (Fig.2).

Nella fase successiva, detta **estro**, l'aumento di estrogeni e l'assenza di progesterone inducono il comportamento estrale della bovina; in questa fase l'animale è in calore e quindi sessualmente recettivo.

Molti sono i fattori che influiscono sulla durata, di circa 12-18 ore, o l'intensità dell'estro: l'ambiente, l'età e lo stato di benessere generale dell'animale.

L'ambiente gioca un ruolo importante nelle modificazioni comportamentali, infatti, è stato più volte dimostrato come diverse pavimentazioni e tipologie di allevamenti influenzano l'intensità del calore. Allevamenti a stabulazione libera permettono una maggiore interazione tra animali

della stessa mandria garantendo più segnali comportamentali associati al calore. Bovine dello stesso gruppo in fase tardo luteale o gravide, rispetto a quelle in fase follicolare o inizio luteale, dimostrano meno interesse nel montare le compagne in estro (Phillips, 1989). La monta, inoltre, si riduce notevolmente in ambienti molto freddi o con temperature al di sopra dei 30°C. In Nigeria si è osservato come la durata dell'estro sia passata da 3.9 h a 4.7 h, rispettivamente nella stagione secca e umida (Orihuela, 2000).

Variazioni nel calore si notano anche in animali di diversa età; sebbene le pluripare mostrino un intensità di monta maggiore rispetto alle primipare, una prova sperimentale condotta su 22 animali maturi e 11 giovani, ha rilevato una minima differenza nella durata dell'estro (15.1 ± 4.4 h contro 14.6 ± 5.5 h).

Ovulazione e fase luteinica

L'ovulazione nella bovina avviene dalle 10 alle 14 ore dopo la fine dell'estro. Si tratta della rottura del follicolo antrale maturo (Peters e Ball, 1986), o follicolo di Graaf, e rilascio della cellula uovo (ovocita secondario) in risposta ad un picco di LH, dovuto alla stimolazione dell'ipofisi anteriore (Fig.3).

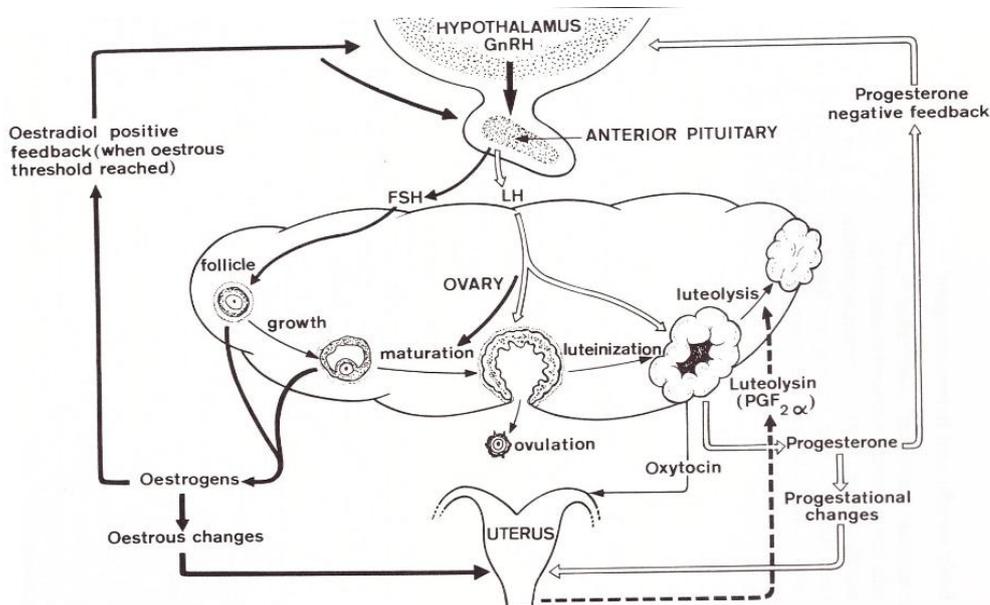


Fig.3- Controllo ormonale nel ciclo estrale (da: Peters e Ball, 1986). Nell'ovulazione, il rilascio della cellula uovo avviene in risposta alla secrezione di LH da parte dell'ipofisi.

Successivamente all'ovulazione, le cellule della granulosa e cellule della teca formano il corpo luteo attraverso un processo chiamato luteinizzazione. Questa fase viene denominata fase luteinica e comprende le fasi di **metaestro** e **diestro**.

Il corpo luteo è una ghiandola endocrina transitoria responsabile del rilascio del progesterone, il quale inibisce il rilascio di LH; solamente il CL è attivo e l'alto livello di progesterone nel plasma impedisce la maturazione di altri follicoli, che andranno incontro ad atresia (Fig.4). Dall'ovulazione al terzo/quinto giorno del ciclo estrale, il CL viene denominato *corpo emorragico*; solo dopo l'aumento delle sue dimensioni (2-2.5 cm), la produzione di P4 comincia essere rilevabile nel sangue.

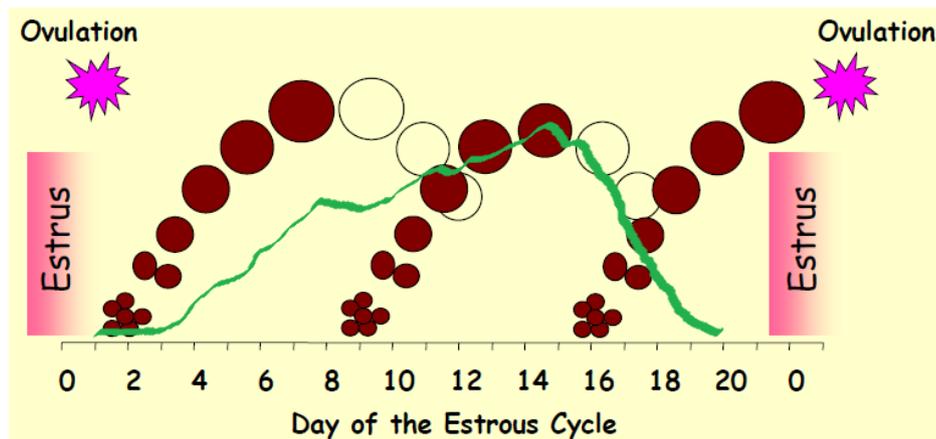


Fig.4- Andamento P4 (verde) e onde follicolari. Il progesterone impedisce la maturazione di altri follicoli che, di conseguenza, vanno incontro ad atresia.

Nelle fasi finali del ciclo estrale, l'aumentare della secrezione di prostaglandine $PGF2\alpha$, il corpo luteo degenera e va incontro a luteolisi. La sua regressione provoca la diminuzione dei livelli ematici di P4 e, di conseguenza, l'arresto del processo a feedback negativo sulla secrezione dell'ormone LH.

Le cellule luteiniche vengono eliminate e il tessuto connettivo si trasforma in una massa fibrosa, *corpus albicans* (Sanger, 2003). In questo modo la fase luteinica si conclude e il ciclo può riprendere con la fase follicolare.

4. IL PROGESTERONE

Il progesterone è un ormone steroideo prodotto a partire dal colesterolo. La sua sintesi avviene, inizialmente, nella membrana mitocondriale interna dove viene convertito in pregnenolone. Quest'ultimo, nel reticolo endoplasmatico liscio, viene poi ossidato dall'enzima 3 β -idrossisteroide deidrogenasi e trasformato in P4.

Ciò che rende così importante il progesterone, è la sua presenza in più fasi essenziali della vita di una bovina da latte. Il P4, infatti:

- viene prodotto in grandi quantità dal corpo luteo durante il ciclo estrale;
- è l'ormone responsabile del mantenimento della gravidanza;
- agisce a livello della mammella.

Durante il ciclo estrale, metaestro e diestro vengono anche indicati come *fase progestativa*, poiché caratterizzati dall'attività di corpi lutei secernenti l'ormone progesterone.

Nella fase luteinica, o progestativa, il P4 agisce sull'ipotalamo bloccando il rilascio di gonadotropine FSH ed LH da parte dell'ipofisi. Questo meccanismo a feedback negativo impedisce la maturazione di ulteriori follicoli.

Se l'animale al momento opportuno non è stato fecondato o l'intervento di IA non è andato a buon fine, l'utero secreta Prostaglandina F2 α , che provoca la regressione dei corpi lutei e un arresto immediato della secrezione del P4. Il tasso plasmatico del progesterone scenderà a livelli minimi dando inizio ad un nuovo ciclo (Bortolami et al, 2009).

In caso contrario, con esito positivo di fecondazione, il corpo luteo rimarrà attivo per tutta la gravidanza trasformandosi in *corpo luteo gravidico*. Nella bovina, il CL continuerà a rilasciare P4 almeno per i primi due terzi della durata della gravidanza. In questa situazione, l'elevato tasso di P4 nel sangue dell'animale gravido agisce al livello dell'utero, rilassandone la muscolatura e garantendo l'annidamento della blastocisti¹.

Durante la gravidanza il progesterone, inoltre, stimola le ghiandole dell'endometrio a produrre il *latte uterino o istotrofo*, una sostanza densa utilizzata come materiale nutritivo durante lo sviluppo embrionale e prima dello sviluppo placentare (Sanger, 2003).

Nell'ultimo terzo della gravidanza, il progesterone viene rilasciato anche dalla placenta, organo

¹ **Stadio dello sviluppo embrionale.** Fecondazione, ovvero la fusione dei pronuclei dello spermatozoo e dell'uovo, lo *zigote* va incontro a diverse divisioni mitotiche, diventando *morula*. La morula, una volta giunta nell'utero, aumenta di dimensione e si trasforma in *blastocisti*.

endocrino di notevole importanza. La placenta esercita un'elevata azione progestativa confermato, per altro, da studi condotti su animali gravidi, i quali, nonostante l'asportazione delle ovaie, presentavano proliferazione endometriale e sviluppo mammario. Nella bovina, però, la placenta non è sufficiente a sostituire il corpo luteo gravidico nella produzione di P4 ed una possibile castrazione potrebbe causare aborto (Sanger, 2003).

Anche al momento del parto, che conclude il periodo della gravidanza e porta all'espulsione del feto, il progesterone ha un ruolo fondamentale. Estrogeni e progesterone avendo effetti opposti, l'aumento del loro rapporto comporta uno stimolo di rilascio di Prostaglandine F₂ α e di contrattilità del miometrio, reso più sensibile all'ossitocina (Sanger, 2003).

Diversi ormoni partecipano allo sviluppo mammario che, per la maggior parte, avviene durante la gravidanza. Il P4 partecipa solo in parte alla crescita tubolo-alveolare della ghiandola mammaria, ma influisce pienamente sulla capacità secernente di questa.

Il motivo per cui la lattazione e quindi la fuoriuscita del latte avviene solo dopo il parto, sembra associato alle elevate concentrazioni di progesterone che inibiscono la liberazione di prolattina (ormone stimolante la secrezione di latte, secreto dall'ipofisi anteriore). Non appena i livelli ematici di P4 si abbassano, dopo l'espulsione della placenta, prolattina e ossitocina mantengono la lattazione (Sherwood et al, 2006).

5. SAGGIO DEL PROGESTERONE NEL LATTE

Molti autori concordano nel considerare il progesterone “ormone chiave” nella vita riproduttiva di una bovina e che il suo monitoraggio sia di notevole aiuto contro la sub-fertilità in allevamento.

Inizialmente erano state messe a punto solo tecniche radioimmunologiche (RIA: Radio Immuno Assay) e immunoenzimatiche (EIA: Enzimeimmuno Assay) capaci di determinare il P4 nei fluidi corporei (Gordon, 2000), ma che comportavano strumenti sofisticati e costosi, nonché, laboratori idonei all’impiego di sostanze radioattive.

Oggi, i traccianti radioattivi sono stati sostituiti con quelli enzimatici e l’introduzione del metodo ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) ha permesso di effettuare le analisi con più semplicità e la lettura dei risultati, avviene attraverso un colorimetro.

Le principali fasi del metodo ELISA vengono spiegate di seguito (Fig.5):

- Nella prima fase vengono prodotti due anticorpi: l’“anticorpo anti-ormone” che si legherà solamente al progesterone e l’ “anticorpo enzima” che si legherà al complesso ormone-anticorpo;
- Successivamente l’ “anticorpo anti-ormone” viene fatto assorbire da una placca o substrato solido;
- a questo punto, si aggiunge l’ormone (P4) che verrà catturato dal suo anticorpo, formando il complesso ormone-anticorpo ormone.
- Nell’ultima fase, l’ “anticorpo enzima” si legherà al complesso formatosi precedentemente. L’aggiunta di un altro substrato colorimetrico e il blocco della reazione, infine provocherà la colorazione (Sanger, 2003).

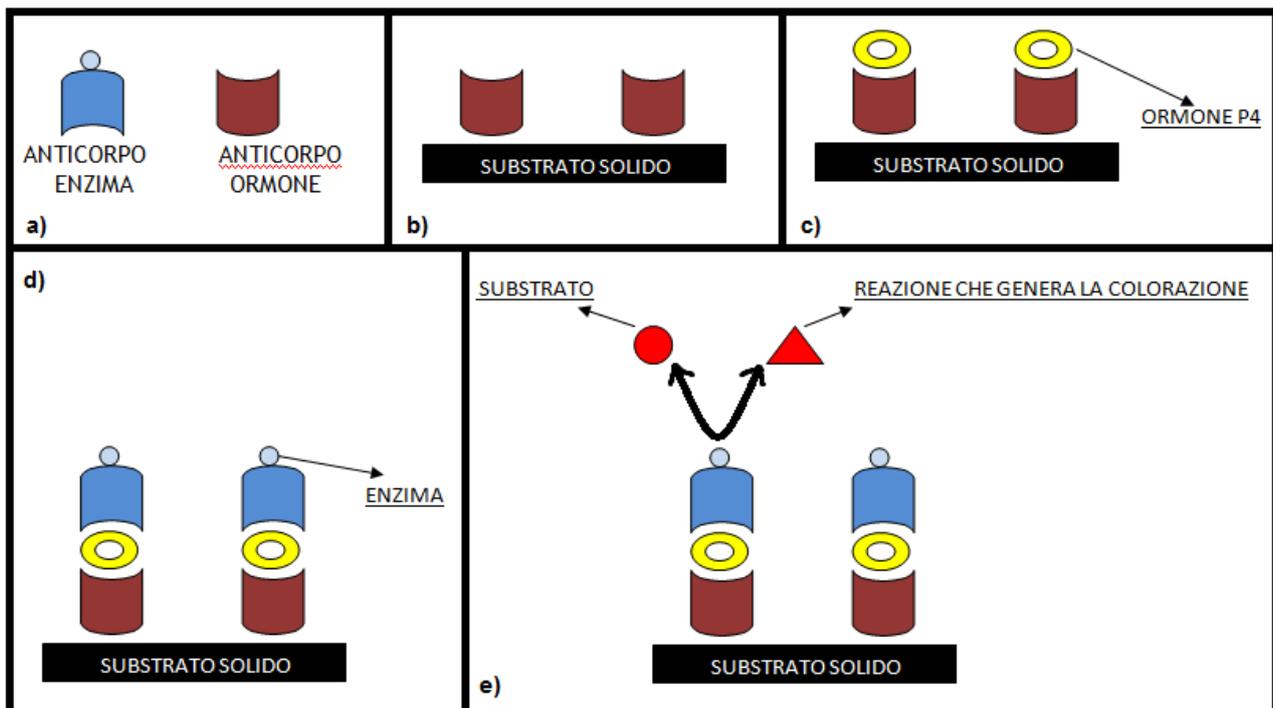


Fig.5- Principali fasi del metodo di analisi ELISA:

a) marcatura di due anticorpi; b) attacco dell' anticorpo anti-ormone su una placca; c) aggiunta dell'ormone da esaminare che si legherà al suo anticorpo, formando il complesso ormone-anticorpo; d) l' anticorpo enzima si lega al complesso ormone-anticorpo ormone; e) l'aggiunta di un substrato provocherà una reazione, responsabile della comparsa della colorazione.

Tutti gli steroidi, essendo liposolubili, si diffondono passivamente dal plasma al latte; per questo motivo, esiste una stretta correlazione tra i livelli di progesterone nei due fluidi (Sanger, 2003).

Il prelievo del campione di latte risulta decisamente meno invasivo rispetto a quello di sangue, tuttavia, se si considerano gli studi effettuati in allevamenti diversi, si notano livelli di progesterone differenti; questo sta a dimostrare che i sistemi di analisi dell'ormone devono essere tarati correttamente in base ai dati aziendali, inoltre, si deve tener conto del metodo di campionamento.

Per una corretta determinazione del P4 "in line", ovvero in mungitura, la misurazione deve essere fatta sul campione di latte totale; il progesterone, infatti, si distribuisce nella frazione lipidica e la sua concentrazione è strettamente correlata al contenuto di grasso. A questo proposito, si è osservato che, nella fase iniziale della mungitura, il contenuto di grasso si aggira intorno al 0,5% e il contenuto di P4 è di 2,8 ng/ml; nella fase finale, invece, il grasso è presente per un 5,20% e il tasso di progesterone è di 21 ng/ml (Novazzi, 1987). Se l'analisi viene effettuata su un campione di latte con elevato contenuto di grasso, risulta difficile stabilire se i livelli di P4 elevati dipendano effettivamente dai livelli ematici.

Uno studio condotto nel 1999 ha, inoltre, confermato la relazione tra la concentrazione di P4 e la localizzazione anatomica dalla quale veniva prelevato il latte all'interno della mammella; i risultati ottenuti hanno evidenziato una minore presenza dell'ormone steroideo nel campione di latte prelevato dalla cisterna della mammella rispetto a quello prelevato dagli alveoli (Waldmann et al, 1999).

Generalmente la determinazione del progesterone viene effettuata subito dopo il prelievo. Se questo non è possibile, il campione di latte deve essere conservato in frigorifero, con l'aggiunta di un conservante specifico che non ne altera la composizione, o congelato.

Per un'analisi di routine capace di determinare i livelli di progesterone, l'azienda svedese DeLaval propone il sistema robotico "Herd Navigator". Grazie a dei campionatori installati, il latte viene prelevato, dosato e trattato automaticamente ad ogni mungitura (Fig.6).



Fig.6- Sistema di mungitura automatizzato ed equipaggiato con Herd Navigator.

Ciò nonostante, anche strutture automatizzate come "Herd Navigator", necessitano di informazioni inserite manualmente nel sistema dall'allevatore: tipo di razza, giorno del parto, rilevamento estro, disordini riproduttivi, giorno dell'IA e conferma di gravidanza.

Un software, poi, incrocerà i dati dell'analisi dei campioni di latte con quelli immessi dall'allevatore e li renderà disponibili per la consultazione; infatti, tramite dei segnali acustici, tabelle e grafici è in grado di segnalare il calore e il momento ottimale per la fecondazione (Fig.7), nonché la presenza di cicli estrali irregolari (Setti, 2014).

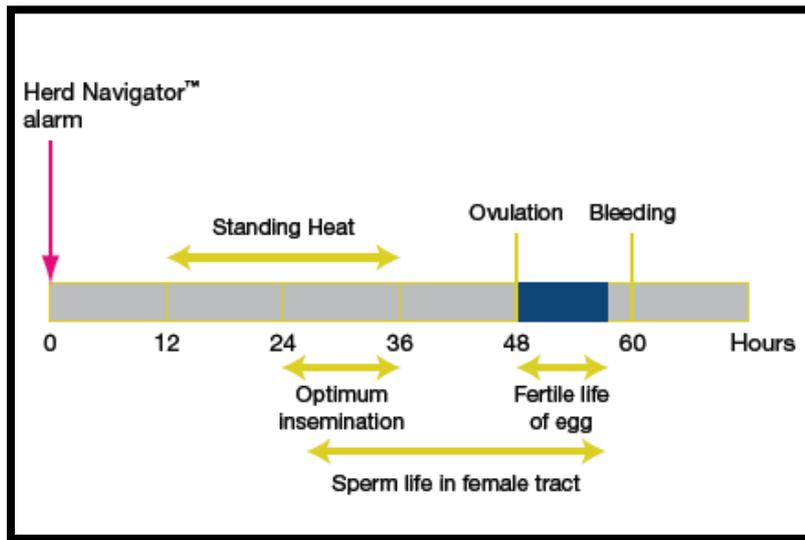


Fig.7- L'allarme di Herd Navigator suona all'incirca 12 ore prima del rilevamento del calore (Standing Heat) e l'intervallo ottimale per l'inseminazione è 24-36 ore dopo il segnale.

PROGESTERONE E LA DIAGNOSI PRECOCE DI GRAVIDANZA

Il sistema di misurazione del P4 nel latte viene utilizzato come diagnosi indiretta di gravidanza; infatti, dopo 21 giorni dall'intervento di IA, è possibile identificare la presenza di un corpo luteo. Tuttavia, è stato dimostrato che, il metodo del dosaggio del P4 nel latte, ha una notevole attendibilità in caso di risultato negativo; ovvero, si rivela un test efficace nell'individuare le bovine non gravide.

Il prodotto del concepimento, viene, invece, confermato attraverso indagini ecografiche eseguite, però, tra i 24 e i 36 giorni dopo inseminazione (Modenesi et al.,1988).

Di seguito, vengono riportate le percentuali di attendibilità del dosaggio immunoenzimatico del progesterone, raccolte su circa 108 vacche di razza Frisona (Tabella.2):

	NON GRAVIDANZA	GRAVIDANZA PROBABILE	CONDIZIONE DUBBIA
N ° BOVINE	25	69	14
% TOTALE BOVINE	23,1	63,9	13
BOVINE GRAVIDE	1	40	4
% ATTENDIBILITA'	96	67,8	--

Tabella.2- Nella tabella vengono riportati il numero totale di bovine esaminate con dosaggio immunoenzimatico del P4, il numero di queste espresso in percentuale, le bovine confermate gravide mediante palpazione rettale e il valore percentuale di attendibilità del test nel latte (da: Modenesi et al., 1988)

Per 25 delle bovine, i bassi livelli di progesterone nel latte vengono associati ad uno stato di “non gravidanza” e la percentuale di attendibilità è del 96%, rispetto al 67,8% della diagnosi probabile di gravidanza. Tra queste 69, sono stati esclusi 10 casi di bovine con livelli di P4 già elevati al momento dell’IA, e quindi non idonee al concepimento (Modenesi et al., 1988).

Interessante risulta riportare una tabella di autori americani riguardanti il tasso di P4 nel latte (ng/ml) ed i giudizi nel giorno dell’inseminazione e 21-24 giorni dopo (Novazzi, 1987) (Tabella.3):

P4 NEL LATTE (ng/ml)	GIORNO DELLA IA	21-24 GIORNI DOPO
<1	Bovina in calore o prossima	Non gravida
1-3	Probabilmente in calore	Probabilmente non gravida
>3	Non in calore	Probabilmente gravida

Tabella.3- Relazioni tra le concentrazioni del P4 nel latte e la risposta diagnostica (da: Novazzi, 1987)

Nel confrontare più studi, ci si rende conto della variabilità dei risultati relativi ai livelli di progesterone misurabili nel latte; durante la fase luteinica o di gravidanza, i valori di P4 possono, infatti, variare da 3,5 fino a 20 ng/ml (Novazzi, 1987). Per una corretta diagnosi, si deve, dunque, tener conto dei diversi metodi e strumenti utilizzati ed, inoltre, far riferimento ai dati relativi alla propria mandria.

Per quanto riguarda i kit diagnostici in commercio, il risultato dei test si basa sul confronto

visivo tra la colorazione del campione in esame e quella dei campioni standard; in questo caso l'interpretazione del risultato si basa per lo più sull'esperienza.

PROGESTERONE E POST-PARTUM

Il post-partum è caratterizzato da un periodo di inattività ovarica e quiescenza sessuale con una durata ≥ 30 giorni circa, nel quale le energie della bovina vengono spese per il puerperio e la lattazione. La gestione ottimale del periodo dopo il parto è fondamentale affinché la ripresa dei cicli avvenga nei tempi giusti e garantisca l'instaurarsi di un'altra gestazione. Grazie al monitoraggio dei profili di progesterone nel latte è possibile avere un'accurata indicazione sull'inizio dell'attività ovarica.

Nel primo ciclo dopo il parto, la bovina può mostrare segnali precoci legati al calore, ma non sempre sono seguiti da un'ovulazione. Con una maggiore frequenza, invece, si manifesta il calore silente. In questa situazione, difficilmente l'ovulazione viene riconosciuta; tuttavia può essere rilevata attraverso il P4 in campioni di latte.

Tale situazione venne confermata da più autori, fra i quali Novazzi (1987) che fece monitorare i livelli di progesterone di undici bovine primipare con assenza di calore da almeno due mesi dal parto e riscontrò una ciclicità normale in cinque di queste, nonostante l'assenza di segni esterni dell'estro.

Nel modello proposto dall'azienda DeLaval, l'attività riproduttiva della bovina viene collocata su tre stadi (Fig.8).

Dopo il parto, la bovina si trova nello "stato 0", ovvero in anestro; una volta avvenuta la prima ovulazione, la concentrazione di P4 aumenta e la bovina viene collocata allo "stato 1". Dopo il secondo estro, la bovina passa allo "stato 2"; se 5 giorni dopo l'estro non viene segnalata l'inseminazione, il modello torna al precedente stadio. Con l'inserimento della data di IA, il modello segnala la "possibile gravidanza" (Fig.8).

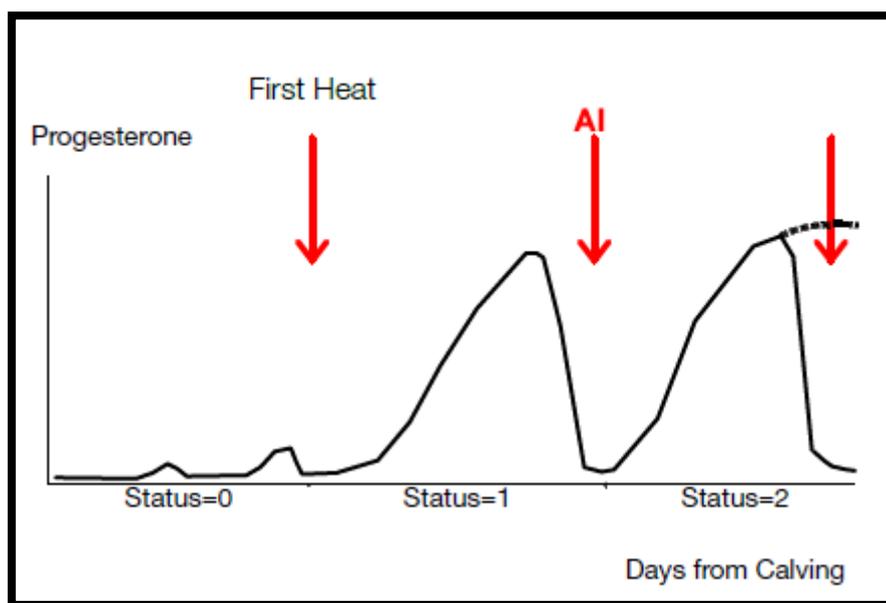


Fig.8- Nella figura vengono rappresentati i tre stadi dell'attività riproduttiva di una bovina.
Secondo il modello Herd Navigator (DeLaval)

Tra le diverse cause che interferiscono sul regolare andamento dei cicli sicuramente troviamo le cisti ovariche.

Sebbene eseguite in maniera accurata, le diagnosi di funzionalità ovarica mediante la palpazione presentano, comunque, una percentuale di errore. Ad esempio, in bovine adulte o a fine carriera, nelle quali il succedersi di continui cicli estrali provoca un accumulo di corpi albicanti con conseguente aumento di tessuto connettivo fibroso, è possibile identificare erroneamente la presenza di un corpo luteo; in questa situazione, il dosaggio del progesterone costituisce un valido supporto alla diagnosi (Romagnoli, 2003), inoltre, permette di classificare le cisti ovariche in cisti follicolari e cisti luteiniche.

Ciò è stato confermato da uno studio condotto su 106 bovine e attraverso la lettura di kit diagnostici ad uso diretto in campo. Nella tabella vengono riportati i risultati dell'esperimento (Tabella.4):

N ° BOVINE	DIAGNOSI CLINICA	PROGESTERONE
93	Repeated Breeders	0-0.5 ng/ml
21	Atresia ovarica	<5 ng/ml
18	Cisti follicolare	0-3 ng/ml
7	Cisti luteinica	>5 ng/ml

Tabella.4- Nella tabella vengono riportate le concentrazioni di P4 nel latte relative alle diagnosi cliniche (da: Marusi et al., 1988)

Il test del progesterone non sostituisce la diagnosi clinica, ma va ad integrarla; la tabella, infatti, mostra la distinzione tra cisti follicolare con livelli di P4 pari a 0-3 ng/ml e cisti luteinica con concentrazione superiore a 5 ng/ml (Marusi et al., 1988).

Di seguito viene riportato un esempio di cisti luteinica rilevato dal sistema “Herd Navigator” (Fig.9).

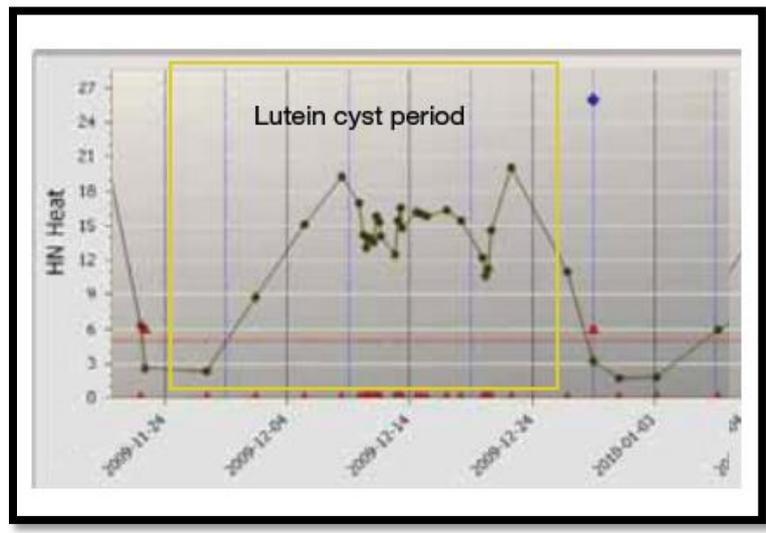


Fig.9- La curva del progesterone mostra la presenza di una cisti luteinica dopo il calore.

PROGESTERONE ED “EMBRYO SURVIVAL”

Nelle bovine gravide, esiste una stretta correlazione tra saggio del progesterone e presenza dell’embrione. Infatti, l’embrione stesso, tramite il riconoscimento materno che avviene con il rilascio di interferon-tau (IFN- τ), inibisce la secrezione di PG2 α e mantiene alti i livelli di progesterone (Roberts, 2007). Inoltre, il P4 è responsabile della secrezione dell’istotrofo o “latte uterino”, principale sostanza nutritiva dell’embrione prima dell’attacco nell’utero.

La maggiore incidenza di mortalità embrionale si registra nei primi giorni di gestazione, quasi l’80% tra gli 8 e 18 giorni dopo l’inseminazione (Gordon, 1996).

I risultati di uno studio (Stronge et al, 2004) hanno evidenziato una stretta relazione tra P4 nel latte dopo l’IA (Days 0) e la sopravvivenza embrionale; la prova sperimentale, consisteva nello studio della correlazione tra la determinazione dei livelli di P4 in campioni di latte, prelevati da 1 a 7 giorni dopo l’intervento di inseminazione, e la presenza dell’embrione, confermata

successivamente attraverso ecografia (Tabella.5).

GIORNO DEL PRELIEVO (giorni dopo la I.A)	STIMA DEI LIVELLI OTTIMALI DI P4 (ng/ml)
Day 5	7.4
Day 6	13.2
Day 7	16.8

Tabella.5- la tabella mostra i livelli ottimali di P4 misurati in campioni di latte prelevati in giorni differenti e dopo l'intervento di inseminazione artificiale (da: Stronge et al, 2004)

I livelli ottimali di progesterone nei campioni di latte, mostrati nella tabella 5, corrispondono alla percentuale più alta di sopravvivenza embrionale; concentrazioni inferiori o maggiori sono state, invece, associate a ridotta fertilità, espressa in termini di sopravvivenza embrionale (Stronge et al, 2004).

Nel grafico seguente viene mostrata la % di concepimento e il livello di P4 nel latte, 5 giorni dopo l'inseminazione (Fig.10).

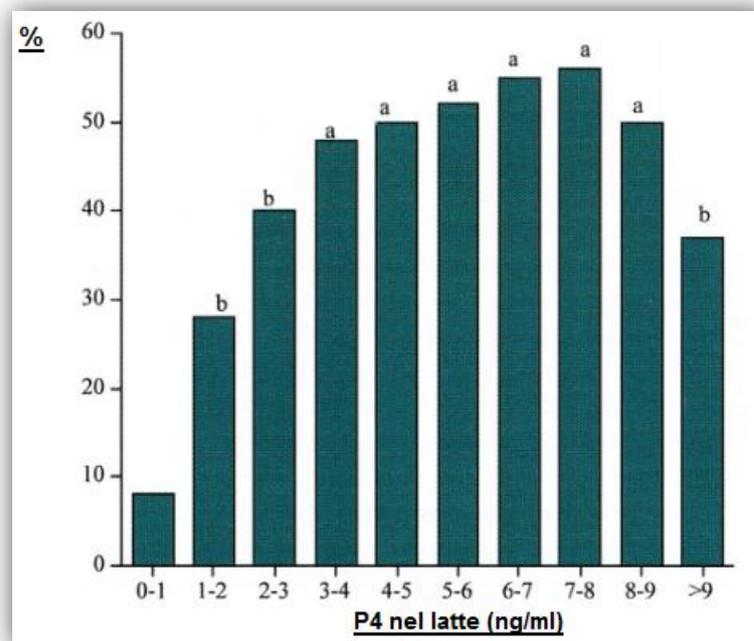


Fig.10- Correlazione tra livelli di progesterone nel latte e % tasso di concepimento (da: Bach, 2011)

Concentrazioni sub-ottimali o sovra-ottimali di P4 pochi giorni dopo l'IA vengono associate ad una bassa probabilità di concepimento, e questo fenomeno sembra confermare l'influenza

dell'ormone steroideo sul processo di sincronizzazione utero-embrione (Fig.11).

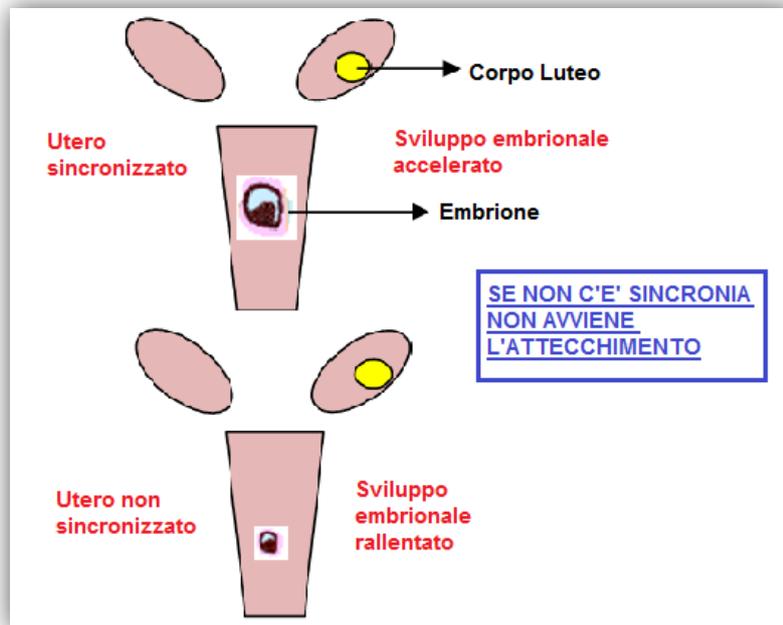


Fig.11- Sincronizzazione utero-embrione

La sincronia temporale tra ambiente uterino e sviluppo embrionale è essenziale affinché possa avvenire l'attecchimento dell'embrione; basse concentrazioni di P4 sono state identificate come la causa più comune di fallimento riproduttivo (Bach, 2011).

Livelli bassi di progesterone, rispetto ai valori sovra-ottimali, si prestano meglio ad essere spiegati; essi, infatti, vengono attribuiti al bilancio energetico negativo e all'aumento dell'attività metabolica del fegato in bovine ad elevata produzione (Stronge et al, 2004).

Il fegato è responsabile del metabolismo degli ormoni steroidei, pertanto, un aumento del suo flusso sanguigno induce una diminuzione del P4 nel plasma e, di conseguenza, nel latte; ovvero l'eliminazione dell'ormone, sotto forma di metaboliti, avviene più velocemente rispetto la sua produzione da parte del corpo luteo.

6. ALTRI METODI

TECNICHE DI RILEVAMENTO DEL CALORE

RILEVAMENTO VISIVO

L'allevatore deve saper riconoscere le principali modificazioni comportamentali associate all'estro; fondamentale, inoltre, è la frequenza con cui i controlli vengono effettuati.

Negli anni '60, non esistendo in commercio strumenti tecnologici per il rilevamento del calore, gli allevatori concentravano la loro attenzione sulla mandria 1 ora per tre volte al giorno, più precisamente alle 7:00 del mattino, alle 15:00 e alle 23:00 di sera (Gordon, 1996).

Il principale segnale è determinato dal *riflesso di immobilità*; ovvero la bovina in estro rimane immobile mentre viene montata da una compagna (Fig.12). Durante tutto l'intervallo di tempo del calore, il numero di monte varia da 1 a 150 (Orihuela, 2000); tuttavia, se l'individuazione dell'estro si basa solamente su questo specifico comportamento, solo il 12-19% delle bovine vengono classificate in calore (Firk et al., 2002).

Altri segni secondari sono:

- fianchi e groppa sporchi, pelo arruffato alla base della coda e segni di saliva sui fianchi;
- il tipico muco vaginale trasparente o di colore bianco;
- Diminuzione della quantità di latte prodotto e dell'ingestione di alimenti. Si è osservato, infatti, che la bovina in calore tende a cambiare l'ordine di entrata in sala mungitura (da prima ad ultima, o viceversa).
- La vulva appare arrossata;
- Muggiti frequenti e riflesso di "Flehmen Lip Curl" (Fig.12).

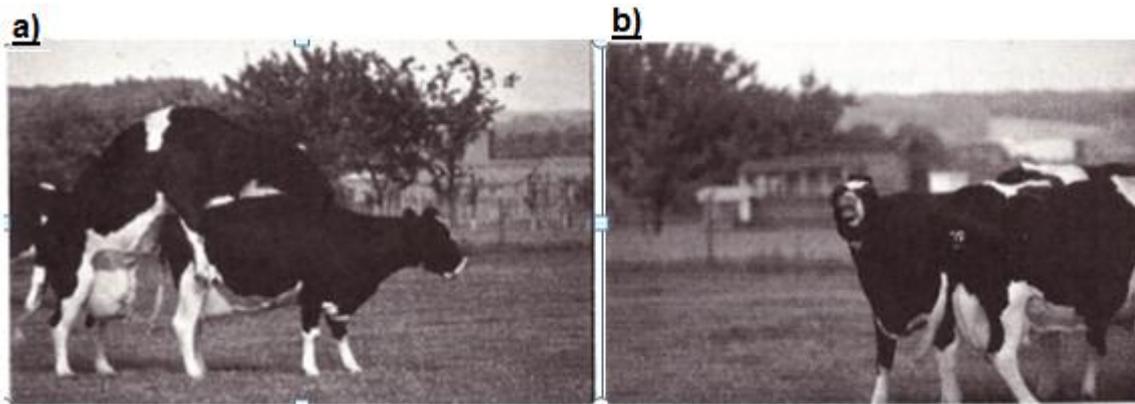


Fig.12– (a) La bovina in estro rimane ferma mentre viene montata da una compagna; (b) Riflesso di “Flehmen Lip Curl”, l’animale solleva il labbro superiore per rilevare meglio gli odori (da: Peters e Ball,1986)

RILIEVO AUTOMATICO DEL CALORE

Come affermato nel paragrafo precedente, il principale segno di calore è il riflesso di immobilità e il sistema HeatWatch® (CowChips) si basa proprio su questo. Esso consiste in un piccolo radio-trasmittitore sensibile alla pressione esercitata dal peso della bovina sulla compagna in estro.

I dispositivi, racchiusi in una resistente custodia in plastica ed applicati nella regione sacrale dell’animale, trasmettono le informazioni ad un computer(Fig.13).

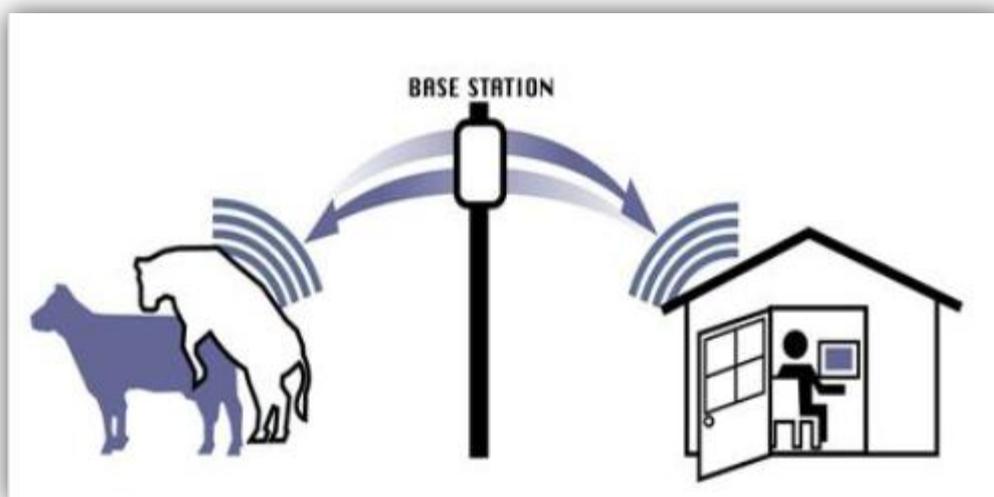


Fig.13- HeatWatch®, attraverso dei sensori sensibili applicati sulla groppa della bovina in calore, rileva il momento del riflesso di immobilità.

L'efficienza di questo strumento è di circa l'85%, tuttavia, sono da considerare alcuni svantaggi:

- Il tempo richiesto per attivare i sensori di pressione è di 2 secondi circa, ma il 40% delle monte avviene in un tempo inferiore (MSD e SCM, 2012);
- L'attacco dei sensori, dovendo essere applicati direttamente al pelo dell'animale, risulta difficile, soprattutto, durante la muta.

MONITORAGGIO DELL'ATTIVITA' FISICA E I PODOMETRI

Un altro aspetto importante, associato al calore nella bovina, è l'aumento dell'attività motoria.

Attualmente in commercio si possono trovare:

- I podometri (Crysta-Heat©), applicati su una zampa, contano il numero di passi per unità di tempo (Fig.14). Uno studio (Arney et al., 1994) ha registrato un incremento lineare di passi in un intervallo tra le 72 e le 16 ore prima dell'estro;
- “ activity-metres” (DeLaval), applicati attorno al collo, registrano i movimenti delle bovine.



Fig.14- Podometro Crysta-Heat©

L'attività motoria della bovina viene registrata continuamente e i dati vengono trasmessi, ad un computer, via segnali all'infrarosso ad intervalli regolari (l'intervallo varia da ditta a ditta). L'ovulazione avviene dalle 17-19 h dopo il rilevamento dell'estro tramite il podometro (MSD e SCM, 2012). L'efficienza di questi strumenti si aggira intorno al 90%, ma la loro accuratezza dipende anche dal tipo di software che si utilizza per la lettura dei dati.

Sebbene la loro precisione sia molto alta, i podometri non vengono utilizzati in particolari condizioni ambientali o tipo di gestione come, ad esempio, il pascolo; in questa situazione, infatti, le bovine sono costrette a percorrere diverse distanze giorno per giorno (pascolo a

rotazione).

Il costo di questi strumenti si aggira sui 120 euro a bovina (MSD e SCM, 2012).

MONITORAGGIO DELLA TEMPERATURA CORPOREA

Alcuni dispositivi per l'individuazione del calore possono essere ingeriti dalla bovina, misurando così la temperatura nel reticolo, o possono essere inseriti nella vagina. Diversi autori (Fisher et al, 2008) hanno evidenziato che la temperatura corporea si abbassa leggermente 2 giorni prima dell'estro ed aumenta in coincidenza con il picco di LH.

Tuttavia, sbalzi di temperatura associati a stati infiammatori della bovina possono alterare i risultati con un incidenza del 10-20% e, per tale motivo, questo tipo di metodo è utilizzato meno rispetto a quelli descritti precedentemente.

DIAGNOSI DI GRAVIDANZA

PAG E PSBP

Le PAG (Pregnancy-associated glycoprotein) e le PSBP (Pregnancy-specific protein B) sono delle glicoproteine associate alla gravidanza e misurabili nel circolo sanguigno materno dopo la fecondazione (Barbato et al, 2013); esse , infatti, vengono sintetizzate dalle cellule binucleate del trofoblasto già dalle prime settimane di gravidanza.

Le concentrazioni di queste glicoproteine vengono misurate nel siero materno e l'efficienza dei kit in commercio si aggira intorno il 99,3% per le PSPB e il 97,8% per le PAG (Han, 2012).

Per entrambe esiste la possibilità di determinarne i livelli nel latte, ma diversi studi hanno confermato la scarsa attendibilità dei risultati nel diagnosticare la gravidanza (Han, 2012); di fatto, il tessuto mammario crea una barriera (barriera emato-mammaria) selettiva per le grosse cellule e, in assenza di trasportatori cellulari, solo poche molecole passano dal sangue al latte. Inoltre, poiché le PAG e le PSPB appartengono alla famiglia delle proteine, è probabile che passino la barriera solo alcuni componenti, ovvero quelli poco riconosciuti dagli anticorpi.

7. CONCLUSIONI

Molti autori hanno confermato l'efficacia del controllo del P4 nel latte come rilevamento dell'attività ovarica nel periodo post-partum, diagnosi "indiretta" di gravidanza precoce e strumento di identificazione di cicli estrali anomali con presenza di cisti ovariche.

La possibilità di quantificare i livelli di progesterone nel latte riveste, quindi, un ruolo di notevole importanza in quanto permette all'allevatore un controllo maggiore della mandria e senza costi elevati; inoltre, la rapida lettura dei risultati dei test, dà la possibilità di intervenire tempestivamente sulla riproduzione.

Ciò nonostante, il fatto di aver messo a confronto diverse prove sperimentali, ha portato alla luce la notevole variabilità dei dati evidenziando che il monitoraggio dell'attività riproduttiva, tramite i livelli di P4 nel latte, necessita di essere supportato dalla puntuale rilevazione di altre informazioni registrate dall'allevatore (tipo di razza, giorno del parto, rilevamento estro, disordini riproduttivi, giorno dell'IA e conferma di gravidanza). Inoltre, si devono tener conto dei diversi metodi di analisi e i problemi legati al campionamento del latte.

8. BIBLIOGRAFIA

Arney D.R., Kitwood S.E., Phillips.C.J.C. The increase in activity during oestrus in dairy cows. *App. Anim. Behav.Sci.* 40 (1994), 211-218.

Bach A. Nutrizione, riproduzione e indice “cow value”. In “Strategie per migliorare la disponibilità economica dell’allevamento del bovino da latte”, Convegno Nazionale SIVAR. Fiera Internazionale del Bovino da Latte (2011), 209-216.

Ballarini G. Malattie della bovina da latte ad alta produzione BLAP. 1987. Edagricole, Bologna.

Barbato O., Merlo M., Celi P., Sousa M.N., Guarnieri L., Beckers J.F., Gabai G. Relationship between plasma progesterone and pregnancy-associated glycoprotein concentrations during early pregnancy in dairy cows. *The Veterinary Journal* 195 (2013), 385-387.

Bertoni G. Dismetabolie puerperali e rapporti con il sistema immunitario, attività epatica e la riproduzione. “La ipofertilità della bovina da latte”. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 2003, 67-91.

Bortolami R., Callegari E., Clavenzani P., Beghelli V. Anatomia e fisiologia degli animali domestici. Edagricole, Bologna, 2009.

Cairolì F., Angioletti A. Cisti ovariche nella bovina da latte. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, vol. XXXV (2003), 415-426.

Cairolì F. Trattamenti ormonali dei disturbi della fertilità della bovina da latte. “La ipofertilità della bovina da latte”. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 2003, 101-112.

Cavirani S. Infezioni causa di infertilità nella bovina: recenti acquisizioni e riflessi nella gestione. “La ipofertilità della bovina da latte”. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e

Zootecniche, Brescia, 2003, 49-66.

Firk R., Stamer E., Junge W., Krieter J. Automation of oestrus detection in dairy cows: a review. *Livest Prod Sci* 75 (2002), 219-232.

Fisher A.D., Morton R., Dempsey J.M., Henshall J.M., Hill J.R. Evaluation of a new approach for the estimation of the time of the LH surge in dairy cows using vaginal temperature and electrodeless conductivity measurements. *Theriogenology* 70 (2008), 1065-1074.

Formigoni A. Rapporti fra alimentazione e fertilità della bovina da latte. Nutrizione ed Alimentazione Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna, 2014.
<http://www.assolac.it/ita/>

Gambetti C., Marasi G. Trattamento dell'ipoplasia ovarica con progesterone in bovine ad alta produzione latte. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, vol. XIX (1987), 317-329.

Gordon I. Controlled reproduction in cattle and buffaloes, vol.1. ©CAB INTERNATIONAL, Wallingford (UK), 1996.

Han X.R., Kim R.H., Diao F.Y., Lee M.G., Jin D. Detection of early pregnancy-specific proteins in Holstein milk. *Journal of proteomics* 75 (2012), 3221-3229.

Marusi A., Ubaldi A., Ferrari P. Saggio del progesterone nel latte e indirizzi terapeutici: i veterinari e le applicazioni della determinazione rapida del progesterone. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, vol. XX (1988), 371-376.

Modenesi R., Stefanini L., Parmigiani E., Davoli R., Fornaciari D.S., Calderoni P.L. Indagine su tre differenti metodiche per la diagnosi precoce di gravidanza nella bovina: ecografia, dosaggio immunoenzimatico del progesterone, early pregnancy factor. *Atti della Società Italiana di Buiatria*, vol. XX (1988), 223-236.

Novazzi F. Determinazione immunoenzimatica del progesterone nel latte, in campo. *Atti della Società di Buiatria*, vol. XIX (1987), 227-238.

Orihuela Augustin Some factors affecting the behavioural manifestation of oestrus in cattle: a review. *Applied Animal Behaviour Science* 70 (2000), 1-16.

Peters A.R., Ball P.J.H. *Reproduction in Cattle*. Butterworth & Co, 1986.

Phillips C.J.C. *New techniques in Cattle Production*. Butterworth & Co, 1989.

Roberts R.M., 2007 Inteferon-Tau, a type 1 Interferon Involved in Maternal Recognition of Pregnancy, 2007. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2000448/>

Romagnoli S. Controlli clinici nel post-partum e gestione dei dati in bovine da latte. “La ipofertilità della bovina da latte” Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 2003, 93-100.

Saint-Dizier M., Chastant-Maillard S. Towards an Automated Detection of Oestrus in Dairy Cattle: a review. *Reprod Dom Anim* 47 (2012), 1056-1061.

Sanger P.L. *Pathways to pregnancy and parturition* (2nd revised edition). Current Conceptions, Inc. Washington, 2003USA. ISBN 0-9657648-2-6.

Setti G. La zootecnia di precisione. Le proposte delle aziende. *Informatore zootecnico* n.1, 2014. http://www.agricoltura24.com/01NET/Card_Library/Zootecnia_precision.pdf

Sherwood L., Klandorf H., Yancey P. *Fisiologia degli animali -dai geni agli organismi*. Zanichelli editore S.p.A., Bologna, 2006.

Stronge A.J.H., Sreenan J.M., Diskin M.G., Mee J.F., Kenny D.A., Morris D.G. Post-insemination milk progesterone concentration and embryo survival in dairy cows. *Theriogenology* 64 (2004), 1212-1224.

Waldmann A., Ropstad E., Landsverk K., Sørensen K., Sølvørød L., Dahl E. Level and distribution of progesterone in bovine milk in relation to storage in the mammary gland. *Applied Animal Behaviour Science* 56 (1999), 79-91.

9. SITOGRAFIA

DeLaval

<http://www.delaval.com/>

Cowchips

<http://www.cowchips.net/>