



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PERUGIA
DOTTORATO DI RICERCA IN
*“INCREMENTO DELLE PRODUZIONI
ZOOTECNICHE E PATOLOGIA DEGLI ANIMALI
DA REDDITO”*
“XXII” CICLO
“Vet. 10”

"STRATEGIE RIPRODUTTIVE PER
L'INCREMENTO DELLE PRODUZIONI
ZOOTECNICHE NEL CAVALLO E NEL BOVINO"

Dott. MARCO PAOLUCCI

RELATORE:

Chiar. mo Prof. MAURIZIO MONACI

COORDINATORE:

Chiar. mo Prof. GIOVANNI VITELLOZZI

A. A. 2008/09

INDICE

Introduzione generale	pag. 1
<i>Valutazione ultrasonografica del conceptus di mulo e dell'unità feto-placentare in cavalle trottatrici nell'accoppiamento interspecifico con l'asino amiatino</i>pag. 4
Abstract	pag. 6
Introduzione	pag. 8
Allevamento del mulo: cenni storici	pag. 12
Cinetica fetale: reperti ultrasonografici	pag. 15
Valutazione della vescicola embrionale e sviluppo degli annessi placentari	pag. 16
Profilo biofisico fetale	pag. 20
Valutazione ultrasonografica dell'unità feto-placentare della cavalla	pag. 27
Valutazione ecografica della crescita fetale	pag. 29
Determinismo del sesso del feto	pag. 31
Iso-eritrolisi neonatale	pag. 34
PARTE SPERIMENTALE	
Materiali e metodi	pag. 40
Risultati	pag. 54
Discussione e conclusioni	pag. 61
Iconografia	pag. 66
Bibliografia	pag. 80

<i>Ottimizzazione della gestione del parto per il miglioramento delle performance riproduttive nella bovina da latte.....</i>	pag. 92
Abstract.....	pag. 96
Introduzione.....	pag. 101
Il parto eutocico.....	pag. 105
Fasi del parto.....	pag. 106
Il parto distocico.....	pag. 112
Esame clinico ostetrico.....	pag. 114
Valutazione degli annessi e dei liquidi fetali.....	pag. 116
Valutazione del benessere del feto.....	pag. 117
Esame <i>post-partum</i>.....	pag. 120
Distocie da causa materna.....	pag. 120
Distocie da causa fetale.....	pag. 125
Igiene del parto	pag. 127
Le conseguenze del parto sulle performance riproduttive.....	pag. 129
PARTE SPERIMENTALE	
Materiale e metodi.....	pag. 130
Risultati.....	pag. 133
Discussione e conclusioni.....	pag. 135
Iconografia.....	pag. 137
Bibliografia.....	pag. 145
Conclusione.....	pag. 148

INTRODUZIONE GENERALE

Nella specie umana, la valutazione del Profilo Biofisico Fetale e le indagini emato-chimiche e genetiche, rivestono un ruolo fondamentale nella prevenzione, nel follow-up e nella valutazione prognostica, sia per il mantenimento della gravidanza che per le possibili alterazioni del feto e del suo grado d'incompatibilità alla vita extrauterina. Nei soggetti, dove siano diagnosticate condizioni patologiche reali o potenziali per il feto è strettamente necessario che vengano apportate tutte le possibili terapie atte, a compensare la gestante e che il parto sia assistito in una struttura Clinica Ostetrica adeguatamente dotata di un reparto di terapia intensiva neonatale. In Medicina Veterinaria, come nell'ostetricia umana, la valutazione ultrasonografica durante la gestazione, necessita di osservazioni ripetute a intervalli definiti nonché di strumenti specifici e mirati; la laboriosità e l'aspetto economico, nell'attività riproduttiva equina e in particolare nell'industria bovina, delimitano prevalentemente ad oggi questo mezzo di indagine in un numero esiguo di gestazioni. Le moderne tecnologie riproduttive e in particolare l'ultrasonografia hanno rivoluzionato la diagnosi e il monitoraggio degli eventi riproduttivi della cavalla (Ginther, 2005). Le valutazioni del profilo biofisico fetale e degli annessi placentari si sono dimostrate un valido strumento di diagnosi nella specie equina (Ginther, 1995; Reef *et al.*, 1995; Renaudin *et al.*, 2000; Bucca *et al.*, 2005). L'aspetto cruciale che riveste il momento del parto, nella riproduzione equina, per le condizioni patologiche, che possono compromettere il benessere, le performance riproduttive e la vita della gestante o del feto, giustificano l'applicazione di tecniche di riproduzione adeguate all'impresa allevatoria del cavallo sportivo e per la salvaguardia di

linee genetiche in contrazione numerica o a rischio di estinzione. In ippatria l'elevato valore economico dei puledri ha giustificato negli ultimi decenni un articolato studio delle caratteristiche del neonato normale e patologico, finalizzato al riconoscimento e alla corretta gestione delle principali cause di mortalità neonatale. Sono state ampiamente dimostrate le principali caratteristiche fisiologiche del puledro neonato e definiti i ranges di riferimento di parametri ematologici, ematochimici, emogasanalitici, ormonali, nonché comportamentali e di sviluppo (Vaala *et al.*, 2002). Tuttavia, nuove conoscenze riguardo l'eziopatogenesi delle principali patologie neonatali continuano a giustificare l'interesse scientifico per lo studio di nuovi parametri.

Situazione analoga, può essere osservata nella realtà dell'allevamento bovino, dove gli obiettivi della qualità e quantità delle produzioni, obbligano gli allevatori a onerosi investimenti imprenditoriali. Laddove il valore economico del vitello e/o della bovina risultino particolarmente elevati come nell'incremento genetico, madri e figli di tori, figli e donatrici di embrioni è strettamente necessaria la valutazione della gestazione e l'assistenza al momento del parto. Al fine di aumentare la produttività della bovina, come dimostrato dal rapporto dell'Osservatorio del latte ISMEA e dai Bollettini AIA del 2004, gli allevatori hanno adottato nuove strategie manageriali e tecniche riproduttive. Diverse Associazioni di Razza hanno proposto l'inserimento, negli indici genetici da selezionare, della "facilità al parto", come effetto delle sostanziali ripercussioni economiche, che tale momento ricopre nella vita riproduttiva della bovina. La distocia è uno degli aspetti economicamente più rilevanti che influiscono sulle produzioni (Lombard *et al.* 2007). Un controllo insufficiente potrebbe determinare un prolungamento nello svolgimento del parto, aumentando così i rischi di perimortalità neonatale e di patologie

riproduttive (Gundelach *et al.* 2009). Molti studi condotti su bovine di razza Frisona hanno dimostrato che, le difficoltà al parto, pregiudicano le performance riproduttive con conseguente allungamento del periodo d'interparto, del parto-concepimento e con l'aumento degli interventi fecondativi per concepimento (Mangurkar *et al.* 1984; Dematawewa and Berger 1997). Djemali *et al.* (1987) hanno dimostrato che l'allungamento del periodo d'interparto è correlato alla gravità della distocia.

L'obiettivo del presente studio è stato quello di validare le correnti tecniche, applicate per la riproduzione equina dal concepimento al *post-partum*, in un modello sperimentale di gestazioni a "rischio" quali le gravidanze interspecifiche ottenute da cavalle trottatrici e asino Amiatino. Inoltre, l'ottimizzazione del management nelle bovine da latte, nella fase di transizione, al parto e nel *post-partum*, mediante un adeguato intervento ostetrico, all'ottimizzazione delle immunità e dell'igiene del parto, è stato oggetto di questo studio con l'obbiettivo di ridurre le patologie del post-partum e per incrementare le performance riproduttive in questa specie.

VALUTAZIONE ULTRASONOGRAFICA DEL CONCEPTUS DI MULO E DELL'UNITA' FETO-PLACENTARE IN CAVALLE TROTTATRICI NELL'ACCOPIAMENTO INTERSPECIFICO CON L'ASINO AMIATINO

L'obiettivo del presente studio è stato quello di descrivere la metodica ultrasonografica per la valutazione dello sviluppo del *conceptus* di mulo, nel corso della gravidanza. Otto cavalle trottatrici multipare sono state inseminate artificialmente con seme refrigerato di asino Amiatino. Gli esami ultrasonografici trans-rettali sono stati condotti giornalmente dall'ovulazione al parto, utilizzando una sonda lineare (5 MHz). Sono stati registrati: il diametro uterino, la localizzazione della vescicola embrionale (VE), il diametro della VE, il giorno della fissazione, i cambiamenti della forma della VE, il giorno della regressione del sacco vitellino e la misura dell'asse longitudinale dell'embrione. Nelle cavalle risultate gravide sono state osservate 27 VE; è stata descritta due gravidanze gemellari; al 23° giorno, è stata registrata la riduzione spontanea della VE di diametro minore. In due fattrici si è verificata una riduzione spontanea della VE al 23° e al 26° giorno di gestazione. La diagnosi di gravidanza è risultata più precoce (37% all'8° giorno) rispetto a quanto riportato da Ginther (1995) nella specie equina (5% al 9° giorno). Il diametro della VE, nel giorno della diagnosi, è risultato pari a 4.6 ± 1.1 mm. Il 75% delle VE sono state osservate al 10° giorno (Ginther 68%). Il diametro della VE era significativamente più elevato rispetto alla specie equina. Le VE, nella fissazione a sinistra, erano localizzate principalmente nei segmenti 2sx e 3 dell'utero (37.69 ± 23.25 e $30.70 \pm 9.61\%$, rispettivamente), mentre nella fissazione a destra, erano localizzate nei segmenti 3 e 2dx (39.48 ± 20.43 e $34.33 \pm 26.14\%$, rispettivamente). La fissazione della VE (63% nella giunzione corpo-cornuale di sinistra) si è verificata in media al 17.1 ± 1.1 giorno, con un diametro di 2.5 ± 0.2 cm.

La VE è apparsa di forma sferica fino al 16.2 ± 1.3 giorno, triangolare al giorno 17.8 ± 0.8 , per poi prendere una forma irregolare dopo il 20.2 ± 1.1 giorno di gestazione. L'accrescimento medio giornaliero della VE è stato di 4.04 mm/die, dall'11° al 16° giorno, di 0.4 mm/die dal 16° al 28° giorno post ovulazione (fase di plateau) e di 1.78 mm/die fino al 45° giorno di gestazione. Il nodo embrionale è stato osservato in media al 19.9 ± 1.9 giorno con un diametro medio di 2.4 ± 1.4 mm. L'accrescimento medio embrionale, dal 20° al 45° giorno, è stato di 0.5 mm/die. La presenza del battito cardiaco è stata osservata in media al 24 ± 2.4 giorno post-ovulazione. L'accrescimento dell'asse longitudinale del feto è risultato pari a 0.5 mm/die dal 20° al 45° giorno di gestazione. L'emergenza del sacco allantoideo è stata registrata in media al 23.3 ± 1.9 giorno ed il suo sviluppo si è completato al 34 ± 3.4 giorno. La regressione del sacco vitellino è risultata completa al 39.8 ± 1.5 giorno ed il feto è stato osservato al polo ventrale della VE al 46.4 ± 2.7 giorno di gravidanza. L'embrione era presente nel polo dorsale della VE al giorno medio 28.3 ± 1.4 . La discesa dell'embrione verso il polo ventrale è stata osservata dal giorno 34 ± 3.4 , insieme alla formazione del cordone ombelicale. Il feto era visibile nel polo ventrale al giorno 46.4 ± 2.7 di gestazione. I parametri considerati per valutare lo sviluppo fetale comprendevano: spessore dell'Unità Feto Placentare (UFP), volume e diametri cardiaci, diametri del cranio e dell'orbita fetale, misurazioni dello stomaco e della sezione dell'addome. Il profilo biofisico dell'embrione comprendeva: determinazione del sesso fetale, attività fetale e presentazione, ecogenicità dei fluidi fetali. La crescita della VE, la mobilità, i cambiamenti della forma, la formazione e lo sviluppo del sacco allantoideo, la regressione del sacco vitellino, non differivano significativamente tra i *concepta* di asino, cavallo e mulo. L'osservazione delle VE di mulo è risultata più precoce rispetto alle altre due specie.

ULTRASONOGRAPHIC ASSESSMENT OF THE CONCEPTUS AND FETO-PLACENTAL UNIT IN THE TROTTER MARE INTERBRED WITH THE AMIATINO JACK DONKEY

The objective of this study was to establish baseline ultrasound informations for mule *conceptus* during the gestation. Eight multiparous Trotter mares were artificially inseminated with chilled semen from an Amiatino Jack donkey. Daily transrectal ultrasonography was carried out from ovulation until delivery using a 5-MHz linear array transducer. Uterine diameter, location of the embryonic vesicle (EV), EV diameter, day of EV fixation, changes in EV shape, date of yolk sac regression and embryo crown-rump length were recorded. All the mares conceived and 27 EV were detected; early embryonic death of one EV occurred in a mare carrying twins at day 23 of pregnancy, although the co-twin survived. Embryonic death also occurred in two mare carrying a singleton EV at day 23 and 26 of pregnancy. Mule EV first detection was earlier (37% at day 8) than mare EV, as also reported by Ginther (5% at day 9) (1995). EV diameter at first detection was 4.6 ± 1.1 mm. At day 10, 75% of EVs were detected, whereas Ginther (1995) reported 68%. Mule EV diameter were fairly higher than the equine ones. EVs were located mainly in the 2sx and 3 segments (37.69 ± 23.25 and $30.70 \pm 9.61\%$, respectively), in left fixation, whereas in right fixation, in the 3 and 2dx segments (39.48 ± 20.43 and $34.33 \pm 26.14\%$, respectively). EV fixation (63% left corpus-cornual junction) occurred on day 17.3 ± 1.3 , with mean EV diameter of 2.5 ± 0.2 cm. EV shape appeared spherical from first day of detection to day 16.2 ± 1.3 , triangular at day 17.8 ± 0.8 , and irregular at day 20.2 ± 1.1 of gestation. EV growth rate was 4.04mm/day from day 11 to 16, 0.4mm/day from day 16 to 28 (plateau), 1.78mm/day from day 28 to 45 of pregnancy. The embryo

proper was first detected on day 19.9 ± 1.9 (average length 2.4 ± 1.4 mm) and the embryonic heartbeat was first detected on day 24 ± 2.4 . Embryonic crown-rump length increased at an average rate of 0.5mm/day from day 20 to day 45 of gestation. Allantoic sac was first detected on day 23.3 ± 1.9 and was completed on day 34 ± 3.4 .Yolk sac regression was completed at day 39.8 ± 1.5 and the fetus was observed at the EV ventral pole, at day 46.4 ± 2.7 of pregnancy. The parameters consistently examined for assessment of well-being and fetal-growth were as follows : combined thickness of the uterine-placental unit, fetal heart-rate and heart diameter, fetal orbit and cranium diameters, abdomen and stomach measurements. Biophysical profile included: fetal gender, fetal activity and presentation, and the echogeniticy of fetal fluid, was assessed as outlined by (Adams-Brendemuehl and Pipers, 1987; Renaudin *et al.*, 1997). EV growth, mobility, change in shape, formation and development of allantoic sac, yolk sac regression, patterns do not differ significantly between donkey, horse and mule *concepta*. However mule EVs are detected earlier in gestation than in the other two types of equine pregnancy.

INTRODUZIONE

Le moderne tecnologie riproduttive e in particolare l'ultrasonografia hanno rivoluzionato la diagnosi e il monitoraggio degli eventi riproduttivi della cavalla (Ginther, 2005). Le valutazioni del profilo biofisico fetale e degli annessi placentari si sono dimostrate un valido strumento di diagnosi nella specie equina (Ginther, 1995; Reef *et al.*, 1995; Renaudin *et al.*, 2000; Bucca *et al.*, 2005). Le valutazioni ecografiche dell'embrione e dello sviluppo degli annessi sono state condotte anche nella specie asinina (Bessent *et al.*, 1988; Gastal *et al.*, 1993; Meira *et al.* 1998). L'accoppiamento interspecifico tra le differenti specie appartenenti al genere *Equus* porta alla nascita d'ibridi non fertili (Allen, 1986).

Woodsdalek J.E. (1916) ha osservato che nei maschi di mulo la spermatogenesi viene a bloccata durante la meiosi, per l'incompatibilità cromosomica dei donatori. Taylor e Short (1973) hanno osservato istologicamente la presenza di ovocellule in femmine di mulo e bardotto alla nascita, dimostrando che il blocco dell'oogenesi può essere solo parziale. Sono stati documentati casi eccezionali di mule che hanno partorito prole vitale (McKinnon, 1988). Le recenti bio-tecnologie, hanno permesso il trasferimento di embrioni provenienti da gestazioni equine e asinine su mule riceventi cicliche ottenendo prole viva e vitale (Camillo *et al.*, 2003). Successive ricerche hanno portato al conseguimento della prima clonazione con ibridi (Woods, 2003). Le gravidanze interspecifiche frequentemente non vengono portate a termine. È stato osservato che nella gravidanza interspecifica, nell'intervallo tra il 40° e il 120° giorno, l'incidenza di aborto è di 36.8%, rispetto alla gravidanza equina (21.4%) (Boeta e Zarco, 2005).

Le gestazioni interspecifiche tra le differenti specie appartenenti al genere *Equus* per la produzione del mulo, hanno profonde radici nelle attività umane del passato e trovano nelle odierne applicazioni nuovi e importanti segnali per la tutela e l'incremento dell'allevamento del mulo. Gli animali da reddito hanno svolto, nei secoli, un ruolo fondamentale nell'economia di diversi settori, fornendo energia sotto forma di lavoro, alimenti, materiale per la tessitura e l'artigianato, fertilizzante; con l'industrializzazione dell'agricoltura, dalla seconda metà del secolo scorso, la zootecnia ha privilegiato le specie e le razze più redditizie avviando lentamente le altre, prive di questa caratteristica all'estinzione (Gandini *et al.*, 2003). Pertanto, il patrimonio genetico di specie ritenute minori, ma ognuna con particolari caratteristiche di fertilità, robustezza e resistenza alle malattie, dovrebbe essere preservato. La conservazione del mulo è importante sia da un punto di vista socio-economico, se si considerano come gli allevamenti supportino le economie locali di aree marginali, sia ecologico (Maijala *et al.*, 1984) poiché contribuisce a una gestione più rispettosa degli habitat seminaturali (Ostermann, 1998), che culturale, per il mantenimento di attività e tradizioni del passato e come attività sportive e palii tradizionali. Il protocollo di Kyoto (1997) promuove per la tutela dell'ambiente, nell'ambito della produzione delle biomasse, la sostituzione dei mezzi meccanici inquinanti con l'alternativa della trazione animale.

Questo progetto s'inserisce in una linea di ricerca volta a valorizzare/recuperare il patrimonio genetico di soggetti d'interesse economico e/o appartenenti a popolazioni a rischio d'estinzione, con l'implementazione di tecniche innovative di riproduzione assistita, con il monitoraggio della gestazione e con la valutazione dei puledri. Negli ultimi anni, per una maggiore attenzione sulle biodiversità, si è assistito a un progressivo interesse per la specie asinina, destinata,

nel nostro paese, al declino per il passaggio da un'economia di tipo agro-pastorale a un'industriale. La popolazione asinina di razza Martina Franca ha subito, nel secolo scorso, un progressivo ridimensionamento numerico a causa del rapido processo d'industrializzazione e, attualmente, la sua consistenza, censita nel Registro Anagrafico delle razze equine e asinine a limitata diffusione, è di 347 soggetti. Negli ultimi anni, tuttavia, si sta assistendo a un ritorno d'interesse per l'allevamento dell'asino, che per le sue peculiari doti di docilità, rendono questa specie particolarmente indicata per il recupero di persone diversamente abili.

L'obiettivo che questo progetto si propone, tuttavia, non è solamente quello di preservare le gestazioni interspecifiche dal rischio di estinzione, ma anche quella di rispondere alle nuove esigenze dell'allevamento equino e asinino. L'onoterapia impiega alcune caratteristiche proprie della specie asinina (indole mansueta, pazienza, morbidezza al tatto, lentezza di movimento e tendenza ad andature monotone) per le attività assistite con animali, per comunicare/interagire con il paziente diversamente abile, attraverso il sistema asino-utente-operatore. Le attività assistite con animali hanno lo scopo di superare le difficoltà di comunicazione che molto spesso persone con tali problemi possono avere nella comunicazione con altri individui. Un ulteriore impiego dell'asino, in particolare per quelle razze caratterizzate da grande mole, è rappresentato dalla produzione di muli, da adibire ai lavori pesanti in aree protette. Infatti, in alcune realtà rurali localizzate all'interno di Parchi Nazionali o aree protette e marginali, dove non è consentito l'impiego di mezzi meccanici, stanno nascendo realtà imprenditoriali basate sull'utilizzo della forza lavoro animale. Per questo motivo, in alcune aree del Paese è elevata la richiesta d'ibridi dell'asino, i muli, particolarmente adatti per tali finalità. L'obiettivo del presente studio

è stato quello di contribuire a salvaguardare il patrimonio genetico del mulo, ottimizzando gestione e allevamento in vista di possibili e auspicabili utilizzazioni future, introducendo e convalidando le correnti tecniche applicate per la riproduzione equina, dal concepimento al post-parto, in cavalle trottatrici inseminate con seme di asino Amiatino.

ALLEVAMENTO DEL MULO: CENNI STORICI

Il Mulo è un ibrido interspecifico fra stallone asinino e la cavalla. Al contrario, il prodotto del concepimento dello stallone equino con l'asina è chiamato Bardotto, quest'ultimo meno apprezzato. Già nell'antichità il mulo era prodotto nell'Illiria e il bardotto in Mesopotamia. Fino a pochi decenni fa il mulo era molto diffuso nel Bacino del Mediterraneo, in Africa, in Asia e nelle Americhe. Le ragioni della sua diffusione sono la robusta costituzione, la rusticità, la resistenza alle malattie, l'adattabilità alle zone meno favorevoli e meno agevoli. Se il mulo non esistesse, scrisse Jacques Baujault, bisognerebbe inventarlo (Demarchi, 1883). "Nessun lavoro stanca i suoi muscoli nervosi, nessuna strada è troppo lunga per le sue membra leggere, e il suo piede solido non ha mai incontrato montagne troppo erte e scoscese da non salire senza inciampare. Se preferisce i climi caldi, si conserva però vispo e vigoroso nei paesi settentrionali. Paziente e tenace, il mulo era all'aratro altrettanto solido quanto il bue. Nei lunghi percorsi sopporta facilmente la fame e la sete. Il mulo, analogamente al bardotto, assomma, in misura diversa e con una certa variabilità anche individuale, le caratteristiche, morfologiche e funzionali delle specie progenitrici. Formato da due differenti specie, tolse una parte della grazia e dell'ampiezza di forme della madre, con l'energia e la sobrietà del padre" (Demarchi, 1883). Nel suo sviluppo il mulo non raggiunge le dimensioni materne, queste sono comparabili maggiormente a quelle paterne, come osservabile anche nell'indole e nelle abitudini. La sua voce non è né il raglio dell'asino, né il nitrire del cavallo, ma un misto ben conosciuto da tutti (Brehm, 1881). E' stata osservata una longevità superiore. Comincia l'attività lavorativa a due anni e questa si estende fino a 25 o 30 anni di vita. "Il suo piede piccolo e la solidità dell'unghia lo rendono immune dalla maggioranza dei traumi

di questa; la sua ferratura è più leggera e quindi meno dispendiosa; la pelle resistente è meno frequentemente ferita dallo sfregamento degli arnesi" (Demarchi, 1883). Malgrado queste caratteristiche, sorprende ancora che il suo impiego, anche nel passato, non sia stato pienamente approvato. Ciò ha radici nell'ambizione storica, di presentare in mostra cavalli di mole e attitudine considerevole e inoltre alla controversa reputazione di testardaggine e di cattiveria conferita al mulo. Nel passato è stata sottolineata la loro caparbità, la poca obbedienza al morso, la sensibilità della bocca, un'istintiva prudenza; verosimilmente, oggi, sono addestrati con estrema semplicità evidenziando la necessità di un addestramento differente e peculiare rispetto al cavallo. Il mulo, ancora puledro, era applicato nell'agricoltura per piccoli trasporti nell'interesse del podere, mentre all'età di tre, quattro anni era applicato all'aratura dei campi. Il mulo impara ben presto a sottomettersi ai comandi, adatta il passo alle esigenze del lavoro e all'impervietà del terreno; non ha nelle attività telluriche altro rivale che il bovino, che tuttavia supera nei terreni leggeri in celerità e spigliatezza. Nel suo utilizzo come animale da tiro, il mulo, percorreva lunghe distanze, mantenendo un passo sia più costante sia celere. La ragione di questa celerità risiede nella peculiarità dell'andatura; mentre il cavallo pone il piede posteriore sull'impronta dell'anteriore, il mulo invece lo pone sempre almeno un decimetro più in avanti del piede anteriore, ottenendo così un guadagno di tanti decimetri quanti sono i passi dell'animale (Longo, 1882). Utilizzato come animale da sella per la sicurezza del loro passo anche in sentieri impervi soprattutto nelle regioni montuose d'Italia, il mulo ha prestato prezioso servizio nelle campagne militari in sito poco praticabile. Portare il basto era considerato il servizio per eccellenza. La brevità del dorso e dei lombi, l'altezza dell'apofisi spinose, la disposizione orizzontale di queste regioni dà loro una particolare resistenza. Le differenze fenotipiche nei muli sono

riconducibili alle razze di animali scelti per l'accoppiamento interspecifico.

CINETICA FETALE:

REPERTI ULTRASONOGRAFICI UTERO-FETALI

Dal 60° giorno di gestazione e per pochi mesi successivi, il corpo e le corna dell'utero sono dilatati dai fluidi fetali. Il feto sviluppa e inizia a esercitare la coordinazione neuromuscolare; i movimenti degli arti e della testa allontanano frequentemente il feto dal pavimento della placenta. Dal 2° al 5° mese di gravidanza, il feto è con la stessa frequenza in presentazione anteriore e posteriore, per l'elevata motilità che presenta in tale periodo. La massima motilità fetale, durante il 3° e il 4° mese, è correlata alla distensione delle corna uterine ripiene di fluido e al basso rapporto tra dimensione fetale e profondità dei liquidi fetali (Figura 2).

La motilità intrauterina del feto subisce una graduale riduzione tra il 4° e il 9° mese: tale condizione è correlata alla diminuzione del volume dei fluidi placentari e all'aumento delle dimensioni del feto. In tale periodo, è invece elevata l'attività fetale intrinseca. Dopo il 5° mese, il feto assume prevalentemente la presentazione anteriore. A metà gravidanza, entrambe le corna uterine, dopo essere state dilatate dal conceptus, si restringono nuovamente fino a chiudersi per tutta la loro lunghezza e i fluidi fetali confluiscono nel corpo dell'utero. Gli arti posteriori del feto iniziano a occupare il corno uterino ipsilaterale all'inserzione del cordone ombelicale, mentre l'altro corno si mantiene chiuso. La loro progressione nel corno uterino avviene in modo graduale e gli zoccoli raggiungono l'apice intorno al 9° mese. La parete del corno si addossa agli arti e ne è talvolta scostata da scarsi fluidi. Dopo una parziale contrazione degli

arti, i garretti scorrono lungo la parete del corpo uterino, in prossimità della base corno.

Il decubito dorsale e il contenimento degli arti posteriori nel corno uterino, sottraggono il cordone ombelicale dalle trazioni esercitate dal feto.

L'orientamento delle corna rispetto al corpo dell'utero, si modifica dal 6° - 11° mese di gestazione. Durante il 6° e il 7° mese, le corna sono perpendicolari alla porzione craniale superiore del corpo dell'utero. Con la crescita fetale, il corpo dell'utero si sposta cranialmente e la porzione dorsale delle corna ripiega sulla parte dorsale del corpo; le corna sono così adagiate sulla superficie del corpo con gli apici in direzione della cervice (Ginther, 1995).

VALUTAZIONE DELLA VESCICOLA EMBRIONALE E SVILUPPO DEGLI ANNESSI PLACENTARI

Al 5° giorno post ovulazione, l'ovocellula fertilizzata abbandona l'ovidotto ed è presente in utero come morula. La visualizzazione ecografica della vescicola embrionale (VE) non risulta tuttavia possibile prima dell'8° giorno di gestazione. La variazione delle dimensioni della VE allo stadio della formazione del sacco vitellino può essere apprezzata mediante ultrasonografica dal 10° fino al 21° giorno (Ginther, 1992).

Formazione dell'endoderma. La blastocela viene rivestita internamente da uno strato di cellule dell'endoderma, iniziando così la formazione del sacco vitellino. Il sacco vitellino è in comunicazione diretta con il lume dell'intestino primitivo (precursore dell'apparato

digerente dell'embrione), quindi le sostanze che vengono assorbite dall'utero, attraverso il sacco vitellino, divengono disponibili per l'embrione. Le cellule dell'endoderma sono cubiche, mentre quelle del trofoblasto sono cilindriche con le caratteristiche delle cellule che presentano un'attività assorbente (Ginther, 1992).

Formazione del mesoderma. Un terzo strato cellulare, il mesoderma, dal 14° giorno inizia ad invadere lo spazio tra l'ectoderma e il sacco vitellino. Il mesoderma forma delle isole ematiche che emergono e si compattano a costituire una rete continua all'interno della parete del sacco vitellino. Questa rete afferisce in canali simili presenti nell'embrione. Si stabilisce così la formazione della circolazione embrionario-vitellina. Il sacco vitellino, in seguito alla vascolarizzazione, diviene un efficiente organo che fornisce nutrienti all'embrione in accrescimento. Il margine principale del mesoderma vascolarizzato è demarcato da una vena che prende il nome di *sinus terminalis*. Il confine tra il *sinus terminalis* e l'embrione è delimitato dai tre strati cellulari (ectoderma, mesoderma ed endoderma) che costituiscono l'onfalopleura trilaminare. La restante parte, delimitata da uno strato bicellulare (ectoderma ed endoderma) è detta onfalopleura bilaminare. L'onfalopleura bilaminare con il *sinus terminalis* rappresenta un'importante struttura anatomica, poiché è riconoscibile nel corso dell'intera gestazione. Essa contraddistingue il polo opposto all'embrione e successivamente delimita il sito di attacco del cordone ombelicale del feto. Relativamente all'aspetto istologico del sacco vitellino, le cellule trofoblastiche da cilindriche divengono progressivamente più alte. L'incremento nella funzione assorbente dell'onfalopleura trilaminare è testimoniato dai cambiamenti delle cellule trofoblastiche, che sono in contatto con il latte uterino, e dallo sviluppo del sistema vascolare del sacco vitellino (Ginther, 1992).

Cambiamenti della forma. La VE equina mantiene una forma sferica distinta fino alla fine della fase di motilità (16° giorno). Prima della fissazione la VE è turgida, come testimoniato dalla sua capacità di mantenere una forma sferica anche quando rimossa dal lume uterino; dopo la fissazione diviene irregolare. I cambiamenti di forma possono essere considerati un adattamento della VE al corno uterino. La VE, tra il 16° e il 26° giorno, non incrementa nel suo diametro orizzontale, poiché continua ad allungarsi lievemente, in risposta alla resistenza uterina all'espansione trasversale. I cambiamenti nella forma della VE sono associati alla sua rotazione; l'orientamento della VE avviene durante le ultime fasi della mobilità all'interno dell'utero e consegue, come la fissazione, al risultato di un accrescimento sostanziale della VE in diametro e dell'aumento del tono uterino. Le forze esercitate dalle contrazioni del miometrio giustificano la perdita di sfericità della VE, concorrono all'arresto della sua mobilità e permettono la rotazione del nodo embrionale all'interno della VE. L'embrione si localizza così ventralmente rispetto al sacco vitellino, al lato opposto rispetto all'attacco mesometriale (Ginther, 1986).

Membrane placentari. L'allantoide, l'annesso embrionario che principalmente provvede agli scambi fisiologici, emerge dall'intestino posteriore circa al 21° giorno (Figura 1,5,6,7). L'allantoide si sviluppa all'interno di una cavità piena di liquido, l'esoceloma. L'esoceloma è localizzato tra la somatopleura esterna e la splancnopleura superiore. Le pareti sono costituite dal mesoderma e da uno strato di cellule del trofoblasto (somatopleura) oppure dal mesoderma e da uno strato di endoderma (splancnopleura). Dal 24°-25° giorno il sacco allantoideo è già vascolarizzato e abbastanza largo in confronto all'embrione. L'unione dell'allantoide al corion (somatopleura) costituisce la placenta allantocorionica. A questo stadio, attorno al *conceptus*, si forma il circolo corionico, costituito da un importante gruppo cellulare

di circa 1 mm di spessore. L'area del corion tra il sacco allantoideo e il sacco vitellino rappresenta il sito di sviluppo del circolo corionico; il mesoderma in quest' area rimane avascolarizzato. Dal 40° giorno (fine della fase embrionale), l'embrione e l'amnios vengono sospinti al lato opposto dal crescente allantoide ed è quasi completa la regressione del sacco vitellino. In seguito allo sviluppo del sacco allantoideo, le membrane che separano il sacco vitellino e allantoideo si uniscono in corrispondenza del polo dorsale della VE, formando il cordone ombelicale; per questo motivo il cordone ombelicale si attacca dorsalmente rispetto all'utero (Figura 1,6,7). Le cellule del circolo corionico invadono l'endometrio, formando così le coppe endometriali (Ginther, 1992).

Anatomia dell'embrione. La flessura pontina è un'area translucida che forma un triangolo equilatero nella regione cefalica. La flessura pontina rappresenta un utile punto di riferimento per stimare l'età dell'embrione, poiché è apprezzabile dal 25° giorno al 36° giorno. L'età dell'embrione può, infatti, essere stimata misurando l'angolo di chiusura e la larghezza alla base del triangolo. L'embrione equino, a un mese di età (12,5 mm lunghezza), presenta una forma a spirale, con la testa rivolta a sinistra e la coda a destra. La regione caudale dell'ombelico è corta e fortemente curvata in direzione ventrale. Gli abbozzi degli arti toracici e pelvici presentano una lunghezza di circa 2,8 mm e 3,2 mm, rispettivamente. Risultano distinguibili orecchi, occhi, naso e bocca rudimentali. L'area della cloaca dà origine alle strutture urogenitali e anali. Sono visibili alcune delle caratteristiche del sistema riproduttivo quali il tubercolo genitale, il dotto di Wolff e le gonadi (Ginther, 1992).

Organi riproduttivi embrionali. La descrizione più precoce degli organi riproduttivi equini è riportata attorno al 30° giorno di età dell'embrione. Il sesso non è determinabile sulla base dell'esame dei

genitali esterni fino allo stadio fetale (>40 giorni). La struttura esterna rilevabile nella regione genitale al 30° giorno è rappresentata da un tubercolo genitale di circa 1 mm di lunghezza, localizzato tra gli arti posteriori. Il tubercolo genitale, che si differenzia nel pene nel maschio e nel clitoride nella femmina, risulta molto prominente a partire dal 36° giorno di gestazione. Approssimativamente fino al 50° giorno post-ovulazione, il tubercolo genitale è in posizione centrale tra gli arti posteriori; ha quindi inizio la differenziazione con l'aumento della distanza ano-genitale nel maschio. Infatti, nel maschio il tubercolo genitale si sposta in prossimità del cordone ombelicale mentre nella femmina è vicino alla coda per raggiungere la sua localizzazione finale relativa, circa al 70° giorno di gestazione (Ginther, 1992).

PROFILO BIOFISICO FETALE

Sono denominate a rischio quelle gravidanze nelle quali esistono condizioni patologiche reali o potenziali (fattori di rischio) che possono compromettere la salute o la vita della gestante, del feto o di entrambi. Queste condizioni patologiche sono alla base della morbilità e della mortalità materna, fetale e neonatale (Manning *et al.*, 1991). Per mortalità perinatale si intende il decesso del feto o del neonato dall'ultimo terzo di gestazione a sette giorni di vita extrauterina. I fattori di rischio sono distinti in primari e secondari. I primari sono quelli che sussistono prima ancora della fecondazione, e vengono suddivisi a loro volta in locali, correlati all'apparato genitale e alle gravidanze pregresse, e generali, ovvero dell'organismo nel suo complesso (Sindrome anticorpi antifosfolipidi, Lupus eritematoso e pat. autoimmuni, Ipertiroidismo, Emoglobinopatie, Cardiopatie

cianogene, Nefropatie croniche, Diabete). I fattori secondari o condizioni indotte dalla gravidanza sono: ipertensione gestazionale, preeclampsia, oligoamnios, ploidramnios, iposviluppo fetale. Nella specie umana, la valutazione del Profilo Biofisico Fetale (PBF) e le indagini ematochimiche e genetiche, rivestono un ruolo fondamentale nella prevenzione, nel follow-up e nella valutazione prognostica sia per il mantenimento della gravidanza che per le possibili alterazioni del feto e del suo grado di incompatibilità alla vita extrauterina. Il PBF valuta la tonicità, l'attività, i movimenti respiratori, la reattività della frequenza cardiaca e l'ecogenicità del liquido amniotico. In condizioni d'ipossia acuta diminuisce o scompare la reattività della frequenza cardiaca, seguita dai movimenti respiratori, dall'attività e dalla tonicità del feto (Manning *et al.*, 1991; Vintzileos *et al.*, 1991). Tali parametri dipendono da un differente livello di funzione del sistema nervoso centrale in relazione all'insufficiente apporto metabolico; la sequenza della loro riduzione o scomparsa è direttamente correlata al grado dell'ipossia e dell'acidosi metabolica fetale. E' stato dimostrato che il feto ha la capacità di centralizzare il circolo ematico, apportando maggiori flussi di sangue ossigenato destinati al sistema nervoso centrale e al cuore, con la finalità di compensare, solo temporaneamente, la condizione di ipossia. Recentemente quindi sono state proposte ulteriori indagini atte all'individuare stati subclinici di ipossia e di stress fetale:

-Dopplerflussometria (DF) dell'arteria ombelicale: riduzioni, assenza o inversione del flusso diastolico dell'arteria ombelicale sono correlati significativamente con un aumento della mortalità perinatale o della comparsa di danni feto-neonatali permanenti.

-PBF modificato: prevede l'esecuzione di un PBF associato alla valutazione ecografica della quantità di liquido amniotico attraverso la determinazione dell'AFI (Amniotic Fluid Index).la valutazione nei

quadranti placentari, della quantità di liquido amniotico presente unitamente al PBF conferisce informazioni più attendibili rispetto al solo PBF.

-monitoraggio cardiotocografico fetale (CTG) o (CST): inducendo farmacologicamente delle contrazioni del miometrio, >3 ogni 10 min. e registrando simultaneamente la frequenza cardiaca fetale e l'intensità delle contrazioni, possono essere svelate condizioni di ridotta ossigenazione fetale attraverso decelerazioni tardive associate ad una ridotta variabilità della frequenza cardiaca fetale.

Il PBF,AFI,DF,CST attribuiscono un valore in accordo ad una scala variabile da 0 a 2 (Schiffrin *et al.*, 1979; Manning *et al.*, 1980; Manning *et al.*, 1981; Vintzileos *et al.*, 1983; Manning *et al.*, 1985), Il punteggio ottenuto dalle valutazioni degli indici osservati sono strettamente correlati con la mortalità e la morbilità perinatale. Il profilo biofisico del feto equino proposto da Adams-Brendemuehl e Pipers (1987) valuta lo spessore della placenta, l'ecogenicità e il volume del liquido allantoideo, le dimensioni, la frequenza cardiaca e l'attività del feto. Reef *et al.* (1996) hanno stabilito un PBF nel quale ad ogni parametro valutato è assegnato un punteggio variabile da 0 a 2 e la loro somma esprime un giudizio prognostico sulla gravidanza. Nei soggetti, ove vengano diagnosticate condizioni patologiche reali o potenziali per il feto è strettamente necessario che vengano apportate tutte le possibili terapie atte, a compensare la fattrice e che il parto venga assistito in una struttura Clinica Ostetrica adeguatamente dotata di un reparto di terapia intensiva neonatale.

L'ecografia trans-addominale è utilizzata per valutare il feto dopo il 90° giorno di gestazione, quando il corno uterino gravido è a contatto con la parete ventrale addominale (Vaala e Sertich, 1994). Dal 60° al 120° giorno, il feto è visualizzato posizionando la sonda

nella regione inguinale ed anteriormente al marginale craniale della ghiandola mammaria (Pipers e Adams-Brendemuehl, 1984); gradualmente esso si sposta in direzione craniale e nelle ultime fasi della gravidanza raggiunge il processo xifoideo dello sterno (Vaala e Sertich, 1994). Per tale indagine s'impiegano sonde lineari e settoriali a bassa frequenza (2,5 - 5 MHz). Il periodo della gestazione, il volume addominale della fattrice e la posizione del feto determinano la scelta della sonda (Troedsson e Sage, 2001).

Le scansioni della parete ventrale dell'addome sono condotte sia sul piano sagittale che su quello trasversale, ad una profondità di 27.5 - 30 cm, e quindi ridotte in base alle strutture da esaminare, determinando il numero e la presentazione dei feti (Reef *et al.*, 1996). Dopo l'8° mese, il feto equino è sul piano sagittale in presentazione anteriore, con la testa prossimale al margine della pelvi, generalmente in decubito dorsale e con le vertebre apposte alla parete ventrale addominale (Pipers e Adams- Brendemuehl, 1984; Adams-Brendemeuhl e Pipers, 1987; Reef *et al.*, 1995).

Frequenza cardiaca

La frequenza cardiaca fetale può essere rilevata mediante elettrocardiografia, doppler trans-addominale o visualizzazione ecografica diretta trans-rettale o trans-addominale. La frequenza cardiaca è rilevabile mediante cronometro durante la visualizzazione bidimensionale o impiegando M-mode. I movimenti del feto e della fattrice, che raramente consentono di mantenere per oltre 10 secondi la stessa immagine, e l'elevata frequenza cardiaca fetale rendono l'analisi M-mode più accurata rispetto al metodo che prevede l'utilizzo del cronometro (Curran e Ginther, 1995). L'attività cardiaca dell'embrione è apprezzata dal 21° giorno di gravidanza. Al 1° mese

la frequenza cardiaca è di 123 – 133 bpm, raggiunge il massimo al 3° mese, quando è mediamente di 196 bpm; dopo una significativa riduzione tra il 3° e il 4° mese, la frequenza rilevabile al 6° mese di gestazione ha una media di 130 bpm (Colles *et al.*, 1978; Curran e Ginther, 1995). Dal 10° mese la frequenza cardiaca media in riposo è 75 ± 7 bpm, con un range di 60 - 90 bpm (Reef *et al.*, 1995). La riduzione della frequenza cardiaca è riconducibile al progressivo aumento dell'attività parasimpaticomimetica fetale (McGladdery, 1999).

La reattività cardiaca è l'aumento della frequenza media (HRB) in risposta ai movimenti del feto; incrementi nell'HRB sono osservati in seguito all'attività fetale, mediante elettrocardiografia o ecodoppler (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987; Reef *et al.*, 1995). All'attività fetale corrisponde l'aumento della frequenza di 25 – 40 bpm per circa 23 – 36 secondi; durante un periodo d'osservazione di 10 minuti sono mediamente rilevabili circa 10 aumenti della frequenza (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987).

Le accelerazioni della frequenza cardiaca in associazione all'attività fetale, ricorrono maggiormente in prossimità del parto, soprattutto nei tre giorni che lo precedono; la frequenza cardiaca è 160 - 192 bpm e si mantiene tale per 1 – 6 minuti (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987; Reef *et al.*, 1995). Tuttavia sono anche osservati movimenti fetali in assenza d'accelerazioni della frequenza cardiaca, mentre raramente si riscontrano aumenti della frequenza che non conseguono ad attività fetale (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987).

L'HRB è un indice sensibile di stress fetale. Tuttavia, la mancata risposta della frequenza ai movimenti, potrebbe essere un indice di sofferenza del feto ancor più attendibile delle variazioni della frequenza cardiaca media (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987). Un

feto inattivo che manifesta una ridotta reattività cardiaca può indicare una condizione d'ipossia o uno stato di quiete. Nell'asfissia si riduce e scompare la reattività della frequenza cardiaca; successivamente non sono quindi apprezzabili i movimenti complessi, quelli respiratori, quelli semplici e la tonicità del feto (Vaala e Sertich, 1994).

Generalmente il feto presenta una leggera bradicardia o minime variazioni della frequenza durante il primo stadio del travaglio (Yamamoto *et al.*, 1991). Una condizione di persistente bradicardia nel corso della gestazione è associata a sofferenza fetale riconducibile anche al distacco placentare; l'evento è mediato dalla risposta vagale all'ipossiemia. Episodi di bradicardia terminale sono associati alla morte del feto. Inoltre, gravi forme di tachicardia e aritmia sono osservate nell'aborto o durante un parto distocico o indotto. L'asistolia conferma la morte fetale (Colles *et al.*, 1978).

L'attività cardiaca del feto in condizioni di stress è stata valutata sia somministrando ossitocina alla fattrice, sia posizionando un apparecchio vibroacustico nel retto, in prossimità della testa del feto; tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini per definire l'attendibilità del test (Bucca, 2001). Mediante scansioni ultrasonografiche del torace e del diaframma, dal 300° giorno di gestazione si osservano i movimenti respiratori fetali, rilevabili quando si visualizza l'escursione del diaframma tra il torace e l'addome con l'espansione della gabbia toracica in assenza sia d'attività fetale, che di movimenti della fattrice; non sono stati osservati movimenti respiratori in un neonato con Sindrome da Asfissia Perinatale (Reef *et al.*, 1995). L'ampiezza massima media del torace, misurata dalla colonna vertebrale allo sterno, attraverso il diaframma, è di 183 mm (Reef *et al.*, 1995). Bucca *et al.* (2007) hanno proposto la misurazione della frequenza del polso periferico a livello della carotide esterna.

Ecogenicità dei liquidi fetali

Nella specie umana, è stato osservato che poliidroamnios e oligoidroamnios esprimono condizioni di sofferenza fetale (Manning, 1987). L'aumento del liquido amniotico è generalmente associato ad atresia esofagea, mentre la diminuzione si osserva nell'agenesia renale, nell'ipossia, nella dismaturità fetale ed inoltre nell'insufficienza placentare (Manning *et al.*, 1981).

L'oligoidroamnios può indurre episodi d'ipossia acuta, per compressioni anomale sul cordone ombelicale durante i movimenti fetali e le contrazioni uterine (Vaala e Sertich, 1994).

L'ecogenicità dei liquidi fetali è valutata per mediante approccio trans-rettale, impiegando una sonda lineare da 5 MHz (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987; Renaudin *et al.*, 1997). L'ecogenicità dei fluidi fetali è espressa da una scala variabile da I a IV (McKinnon *et al.*, 1988). L'ecogenicità del liquido amniotico è di Grado II o III dal 4° al 10° mese. L'ecogenicità del liquido allantoideo è di Grado III dal 4° mese di gestazione (Renaudin *et al.*, 2000). Fino a metà gestazione, il liquido amniotico è prodotto dall'epitelio del sacco amniotico e dall'urina fetale, e ciò ne determina l'aspetto acquoso. Con il progredire della gravidanza diminuisce la concentrazione dell'urina, aumentano le secrezioni rino-faringee e la consistenza dell'amnios diventa mucoide (Roberts, 1986). Nell'ultimo terzo di gestazione, le cellule provenienti dalla desquamazione cutanea del feto concorrono ad aumentare il contenuto cellulare del liquido amniotico (FFPs) conferendo un grado II di ecogenicità nel 10° e 11° mese di gestazione (Verpoest *et al.*, 1976; Vaala e Sertich, 1994).

Il liquido amniotico contiene una concentrazione maggiore di FFPs rispetto all'allantoideo, inoltre (Renaudin *et al.*, 2000). Nel liquido allantoideo, è possibile osservare la presenza di masse centralmente iperecogene, Ippomani, derivanti dalla coalescenza delle particelle di tale fluido attorno ad un nucleo di detriti epiteliali (Roberts, 1986; Troedsson e Sage, 2001).

Le particelle del liquido allantoideo sono l'espressione dell'attività renale e l'ecogenicità di tale fluido è riconducibile all'elevata concentrazione di sali di calcio. La densità delle particelle dei fluidi fetali aumenta con i movimenti del feto. L'aumento repentino della torbidità dei liquidi fetali può essere associato all'escrezione del meconio, a placentite o ad emorragie conseguenti a distacchi parziali delle membrane fetali (Sertich, 1993; Vaala e Sertich, 1994). L'aumento dell'ecogenicità dei fluidi fetali, in assenza di altre anomalie, non rappresenta un segno sfavorevole per l'esito della gravidanza (Reef *et al.*, 1996). Renaudin *et al.* (1997), tramite esame ecografico transrettale, non hanno riscontrato anomalie dei fluidi fetali in cavalle affette da placentite.

VALUTAZIONE ULTRASONOGRAFICA DELL'UNITA'

FETO - PLACENTARE NELLA CAVALLA

L'applicazione della metodica ultrasonografica per la diagnosi di gravidanza ha migliorato le performance riproduttive nella specie equina (Ginther, 1986; Troedsson e Sage, 2001). La valutazione delle condizioni dell'ambiente intrauterino e del feto durante la gestazione è una pratica di recente acquisizione che ha per obiettivo quello di

identificare gravidanze patologiche causa d'aborto, di parto distocico o della nascita di puledri dismaturi o disvitali, consentendo pertanto la diagnosi precoce e la prevenzione terapeutica di tali condizioni (Vaala e Sertich, 1994; Reef *et al.*, 1996). L'interruzione della gestazione è la conseguenza di malattie o anomalie maternofetali e di disfunzione placentare, causa più frequente d'aborto e di mortalità neonatale. Quest'ultime, sia per placentite, sia per anomalie del cordone ombelicale, sono alla base dell'insufficiente sviluppo del feto e dell'interruzione della gestazione. Giles *et al.* (1993), hanno diagnosticato l'infezione dell'UFP in circa 1/3 di oltre tremila cavalle che avevano abortito o partorito un puledro dismaturo. Il tasso di concepimento delle fattrici che abortiscono è generalmente ridotto nella successiva stagione riproduttiva (Renaudin, *et al.*, 2000).

L'aborto può avvenire in assenza di segni premonitori, ma spesso la fattrice mostra secrezioni vaginali e sviluppo precoce della mammella, associato a lattazione (Hyland e Jeffcott, 1987). La terapia delle cavalle con segni premonitori di disfunzione placentare è spesso inefficace perché la diagnosi è tardiva (Prickett, 1970; Giles *et al.*, 1993; Sertich, 1993). La valutazione della crescita e del benessere fetale e l'esame della placenta mediante ultrasonografia transaddominale e transrettale trova applicazione nelle fattrici con secrezioni cervico-uterine, sviluppo mammario e lattazione prematura, affezioni sistemiche, abnorme aumento dell'addome e anamnesi remota di gestazione patologica o parto distocico (Pipers e Adams-Brendemuehl, 1984; McGladdery, 1999). Recentemente, l'approccio transaddominale e transrettale è stato anche applicato per la determinazione del sesso a metà gestazione (Renaudin, 2000).

VALUTAZIONE ECOGRAFICA DELLA CRESCITA FETALE

Nella specie umana la valutazione ultrasonografica stabilisce la durata della gestazione e lo sviluppo fetale mediante misurazioni morfometriche. L'individuare all'interno di un range ridotto la data del concepimento e quindi la data di espletamento del parto ha rappresentato nella medicina il primo passo nella diagnosi preventiva, precoce e prognostica nelle alterazioni dello sviluppo fetale. Strutture anatomiche come: l'asse maggiore del femore, omero e radio, il diametro e la circonferenza dell'addome, il diametro biparietale e la circonferenza craniale, la valutazione di organi interni come: volumi dell'aia cardiaca, diametri aortici durante la sistole cardiaca, i volumi dell'ampolla gastrica, del rene, delle gonadi, sono stati proposti come indici per il corretto sviluppo fetale per la loro positiva correlazione con questo (Hellman *et al.*, 1969; Deter *et al.*, 1981; O'Brien *et al.*, 1981; Leopold, 1986; Tarantal e Hendrickx, 1988). Le biometrie esprimono non solo un giudizio prognostico sul grado di preparazione alla vita extrauterina, evidenziando ritardi nello sviluppo, ma possono inoltre anticipare affezioni del periodo post-natale. Dove vengano diagnosticate condizioni patologiche reali o potenziali per il feto, è strettamente necessario che siano apportate tutte le possibili terapie atte a raggiungere il completo sviluppo fetale, a compensare la gestante e il parto deve essere previsto in una struttura Clinica Ostetrica adeguatamente dotata di un reparto di terapia intensiva neonatale.

Nella specie equina come nell'ostetricia umana, la diagnosi ultrasonografica durante la gestazione richiede valutazioni ripetute con intervalli definiti; la laboriosità e l'aspetto economico, nell'attività riproduttiva equina, delimitano prevalentemente a oggi questo mezzo

d'indagine in un numero esiguo di gestazioni. Le Biometrie del feto equino sono determinate mediante le misurazioni dell'orbita (Kahn e Leidl, 1987; McKinnon *et al.*, 1988), del diametro del cranio (Kahn e Leidl, 1987), dello spazio intercostale (Kahn e Leidl, 1987), del diametro addominale (Kahn e Leidl, 1987) e del diametro aortico (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987; Reef *et al.*, 1995) (Figura 8).

Renaudin *et al.* (2000) mediante approccio ultrasonografico trans-rettale e trans-addominale, hanno valutato la crescita fetale dal 100° giorno di gestazione fino al parto, rilevando indici morfometrici del cranio, dell'occhio, dell'aorta, dell'addome, delle gonadi, del rene e del femore, in scansione longitudinale e trasversale; tali indici biometrici sono positivamente correlati con il periodo della gestazione; inoltre il volume approssimativo dell'occhio, la lunghezza del femore, l'area della sezione trasversale del rene, il diametro aortico e del cranio hanno una relazione lineare con il periodo della gestazione.

Diametro Aortico Fetale

Adams-Brendemuehl e Pipers (1987) hanno riportato per il diametro aortico fetale, nel Purosangue Inglese e nel Trotter, un valore di 2,1 cm a 300 giorni di gestazione e di 2,7 cm al termine. Tale parametro registrato in studi successivi dal 298° giorno di gestazione, nelle stesse razze equine, è di $2,28 \pm 0,22$ mm. Ciò sarebbe riconducibile a misurazioni effettuate in un punto diverso della radice aortica o alla variabilità legata all'operatore (Reef *et al.*, 1995). Il diametro dell'aorta è positivamente correlato con il peso della fattrice e con il peso del puledro alla nascita (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987;

Adams-Brendemuehl, 1990). Le misurazioni effettuate nella settimana che precede il parto, hanno dimostrato la correlazione al peso del neonato, con un'accuratezza di $\pm 3,49$ Kg. Esiste inoltre una relazione di tale parametro con la profondità del torace e all'altezza all'anca del puledro (Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987). E' stato dimostrato che il diametro aortico (Figura 9) è correlato significativamente anche alle gravidanze a rischio, e pertanto tale misurazione è un indice di condizioni intrauterine sfavorevoli alla crescita fetale (Reef *et al.*, 1996).

DETERMINAZIONE DEL SESSO DEL FETO

Per la determinazione del sesso del feto sono impiegate due metodiche ecografiche: l'approccio trans-rettale durante la gravidanza precoce (Curran e Ginther, 1989; Curran, 1992) e la combinazione di quelli trans-rettale e trans-addominale durante la metà della gravidanza (Renaudin *et al.*, 1997; Renaudin *et al.*, 1999).

Principio anatomico

La diagnosi precoce del sesso del feto si basa sull'identificazione e sulla localizzazione del tubercolo genitale, struttura embrionale che si differenzia nel pene nel maschio e nel clitoride nella femmina. Approssimativamente fino al 50° giorno post-ovulazione, il tubercolo genitale è in posizione centrale tra gli arti posteriori; ha quindi inizio la differenziazione con l'aumento della distanza ano-genitale nel maschio. Infatti, nel maschio il tubercolo genitale si sposta in

prossimità del cordone ombelicale mentre nella femmina è vicino alla coda per raggiungere la sua localizzazione finale relativa, circa al 70° giorno di gestazione.

Diagnosi precoce del sesso del feto

L'esame è eseguito mediante ecografia trans rettale con sonda lineare da 5MHz dal 53° al 68° giorno di gravidanza. Sono eseguite scansioni sequenziali: trasversali, frontali e sagittali. Le scansioni trasversali sono perpendicolari al piano mediano e il punto di repere del feto è la testa o il cuore. La sonda è spostata caudalmente attraverso l'area dell'inserzione addominale del cordone ombelicale. Nel maschio, il tubercolo genitale è una struttura iperecogena bilobata, caudale e prossimale all'inserzione addominale del cordone ombelicale. Nella femmina, tale struttura è localizzata nell'area compresa tra gli arti posteriori e la coda. Le scansioni frontali sono perpendicolari al piano trasversale e mediano. Gli arti posteriori, il cordone ombelicale, la coda e il tubercolo genitale, sono in sezione trasversale e devono essere visualizzati contemporaneamente. Il tubercolo genitale, struttura iperecogena, nel maschio è caudale e prossimale all'inserzione addominale del cordone ombelicale, mentre nella femmina è al disotto della coda. Le scansioni sagittali sono parallele al piano mediano e il feto è visualizzato in sezione longitudinale. Tale metodica è attendibile al 97% (138/143) per il sessaggio del maschio, e nel 100% (92/92) per quello della femmina. La determinazione è accurata tra il 59° e il 68° di gestazione. Il tubercolo genitale non può essere identificato prima del 53° giorno, a causa delle dimensioni, e dopo il 68° giorno, per la progressiva

localizzazione addominale ventrale del feto (Curran e Ginther, 1989; Curran, 1992).

Diagnosi del sesso del feto a metà gravidanza

L'esame è eseguito mediante ecografia trans-rettale e trans-addominale con sonde lineari o settoriali da 5MHz e da 3,5 MHz. La sonda da 5 MHz è usata nella gravidanza di 100 - 160 giorni mentre oltre 160 giorni è impiegata quella da 3,5 MHz. La sonda è posta cranialmente alla ghiandola mammaria, nella linea mediana ventrale, e quindi spostata abassialmente rispetto a tale linea. Localizzato il feto, si identifica la sua parte posteriore. Per determinare il sesso del feto sono soprattutto impiegate le scansioni trasversali. Nel maschio sono identificati il prepuzio o il pene, caudali e prossimali all'inserzione addominale del cordone ombelicale, mentre nella femmina sono visualizzati le ghiandole mammarie, i capezzoli e le gonadi fetali che presentano un'eco circolare fino al 133° giorno di gestazione. Nel maschio, il pene e il prepuzio sono identificabili dal 100° al 220° giorno di gestazione; in scansioni trasversali hanno forma rotondeggiante con fuochi lineari paralleli approssimativamente fino al 140° giorno e in seguito appaiono triangolari. Il pene ha spesso movimenti oscillatori, in particolare durante l'attività del feto. Il pene e il prepuzio, sono spesso indistinguibili tra loro nell'immagine ecografia, tranne che durante l'erezione. Le gonadi maschili sono di forma ovoidale e misurano da 2 a 7 cm di lunghezza, in relazione al periodo di gestazione; in scansioni frontali sono situate nella porzione caudo-ventrale dell'addome lungo la regione della coscia. La loro ecogenicità è simile a quella del fegato; appaiono omogenee con una

sottile linea ecogena centrale e longitudinale che non è costantemente osservata dopo il 125° giorno.

Nella femmina si apprezzano le ghiandole mammarie e i capezzoli dal 118° al 227° giorno di gestazione; le gonadi sono ovoidali e simili a quelle maschili, sia per la localizzazione sia per le dimensioni. Tuttavia, la presenza dell'eco circolare nell'ovaio permette di diagnosticare il sesso femminile dal 100° al 133° giorno di gestazione. La metodica è attendibile al 100% e il periodo ottimale per la sua applicazione è compreso dal 100° al 220° giorno di gestazione. Fino al 183° giorno, l'approccio trans-rettale è necessario quando il feto è localizzato nella porzione dorsale dell'addome o è in presentazione posteriore (Renaudin, 2000).

ISO-ERITROLISI NEONATALE

L'iso-eritrolisi neonatale (IN) è una patologia caratterizzata dalla distruzione immunomediata degli eritrociti nel neonato in seguito all'assunzione di anticorpi colostrali. Otto principali gruppi sanguigni sono presenti nel cavallo, A, C, D, K, P, Q, T e U. All'interno di ogni gruppo sono presenti alleli responsabili dell'ereditabilità ed espressione degli antigeni eritrocitari, questi fattori vengono espressi con una lettera minuscola (Aa, Ab, Ac). È stato osservato nei casi riportati di IN che gli antigeni Qa e Aa sono la causa principale di malattia (Whiting J. *et al.*, 2000). Pa, Ab, Qrs, Dc, Ua, Qb, Qc, Da, Ka, e Db sono state raramente individuate come responsabili della lisi eritrocitaria (Bailey *et al.*, 1987)(McLeay J.M. *et al.*, 2001). I più comuni anticorpi diretti verso antigeni eritrocitari evidenziati durante gli studi nel cavallo sono anticorpi anti-Ca. L'IN non è stata mai

osservata associata al fattore Ca. E' stato osservato che nelle cavalle negative per I fattori Aa e Ca è possibile la spontanea produzione di anticorpi-Ca e che questi siano responsabili della soppressione o inibizione della produzione degli anticorpi anti-Aa, eliminando precocemente dal circolo degli eritrociti (Bailey *et al.*, 1988). La sensibilizzazione nella fattrice interviene esponendola ad antigeni eritrocitari che non possiede come nelle trasfusioni di sangue da incompatibili donatori. Infiltrazione di eritrociti fetali può intervenire in casi di anomalie e alterazioni patologiche della placenta, infatti possono verificarsi microemorragie durante l'ultimo terzo di gestazione e durante le fasi del parto. Le fattrici che ottengono la prima sensibilizzazione al momento del parto devono essere considerate a rischio per le successive gestazioni. Una fattrice è considerata a rischio se risulta negativa per i gruppi Aa, Qa e Aa+Qa. L'assenza di uno o entrambi i fattori non prevede con certezza il verificarsi dell'emolisi eritrocitaria nel puledro, la concomitanza di alcune condizioni deve esserci per produrre la patologia. La fattrice deve essere stata esposta al fattore dello stallone, il feto deve aver ereditato il fattore paterno, gli anticorpi devono esser presenti in una sufficiente quantità e il puledro deve ingerire e assorbire il colostro materno entro le 24 ore dalla nascita. Bowling *et al.*, (1985) hanno determinato l'incidenza dell'IN per alcune razze; la percentuale d'incidenza nelle cavalle a rischio, per il fattore Aa negativo, osservata è stata: il 2% per i Thoroughbreds (TBs), il 3% per l'Arabo (Ar), il 3% per gli Standardbred trotters (SBt), il 22% per gli Standardbred pacers (SBp) e il 25% per i Quarter horses (Qh); la percentuale d'incidenza per il fattore Qa negativo è: il 16% per TBs, il 72% per Ar, il 68% per Qh e il 100% per gli SB.

Gli asini espongono sui propri eritrociti il fattore "D" (donkey factor) (McClure *et al.*, 1994). Tutte le cavalle fecondate con seme asinino

devono essere considerate a rischio di sviluppare IN per assenza del fattore "D". I puledri di mulo dovrebbero essere osservati strettamente per la presenza di segni di IN poiché è stata osservata un'incidenza dell'IN nei puledri di mulo del 10%; inoltre è stata osservata una minor sensibilità all'anemia moderata indotta dall'emolisi e i segni clinici osservabili possono apparire di minor severità rispetto ai puledri intraspecifici (McClure *et al.*, 1994). Potenzialmente nella necessità di dover trasferire sangue a un puledro di mulo, ogni cavalla non possedendo il fattore "D" e non essendo mai stata sensibilizzata da questo, è un ideale donatrice (Traub-Dargatz, 1992). Anticorpi diretti verso gli eritrociti che espongono fattori Aa e Qa, sono dotati d'azione litica nel 90% dei casi di IN, l'agglutinazione assume ruolo meno importante nella patogenesi dell'IN. Gli anticorpi anti-eritrociti raggiungono un'alta concentrazione nel colostro prima del parto. Sintomatologie iper-acute di IN sono spesso associate ad alta presenza di anticorpi per il fattore Aa, mentre sintomatologie sub-acute sono spesso associate al fattore Qa (Durham A.E., 1997). L'emolisi extravasale e l'attivazione del sistema reticoloendoteliale sono la principale causa dell'anemia nei puledri affetti, l'emolisi intra-vasale può essere osservata (Vaala W.E., 1990). I segni clinici osservati possono essere da iper-acute a sub-clinici. Il puledro nasce sano e può dar inizio ai sintomi dopo 5 ore dalla prima assunzione colostrale, sino a 5 giorni dal parto (McClure *et al.*, 1997). Nelle forme iper-acute e acute, è possibile osservare la morte del puledro nelle prime 24 ore. I sintomi sono dipendenti dalla quantità di anticorpi assunti, nonché del grado d'insufficiente trasferimento immunitario che ne consegue. I segni possono essere: letargia, debolezza, ittero, pallore delle mucose, emoglobinuria, febbre, tachicardia, tachipnea, alterazioni cardiocircolatorie, sindromi neurologiche (David B.J., 1998). L'analisi ematochimica indica un'anemia con diminuzione del volume

corpuscolare (>25% della PVC), alti livelli d'emoglobina libera, ipoglicemia, bilirubina diretta e indiretta aumentate, acidosi metabolica e aumentata azotemia in risposta all'emolisi. Nei muli può essere osservata trombocitopenia; allantoanticorpi, associati a trombocitopenia e neutropenia, leucocitosi, leucopenia e incremento del fibrinogeno, sono stati riportati in puledri di gravidanze interspecifiche con fallimento del passaggio immunitario (Ig<400mg/dl) e della concomitante sepsi (Traub-Dargatz, 1992). La diagnosi differenziale include le copiose perdite ematiche fetali che possono verificarsi durante parti difficili, dove in assenza di lesioni esterne sono possibili traumatismi costali complicati dall'eventuale emotorace ed emoperitoneo. Ritardi durante l'espletamento della fase espulsiva, con impegno del feto nel canale parto, possono conferire un insufficiente apporto ematico placentare ombelicale con alterazione dei parametri ematochimici alla nascita. L'osservazione della pigmentazione itterica delle mucose può essere secondaria nei puledri nati infetti da Herpesvirus o setticemici. Dove siano osservati segni di letargia, tachipnea e atassia, deve essere sempre considerata l'IN e il Jaundiced Foal Agglutination (JFA) test deve essere immediatamente condotto. L'isoeritrolisi-neonatale è una patologia altamente prevenibile. Le strategie per la prevenzione possono essere impiegate prima dell'accoppiamento, nell'ultimo terzo di gestazione e al momento della nascita. È possibile identificare gli accoppiamenti a rischio, attraverso la tipizzazione dei gruppi sanguinei dei riproduttori prima della monta. Le indagini ematiche possono essere condotte in laboratori specializzati tramite "markers" dei gruppi ematici e "markers" biochimici ed elettroforetici. Un'attenta anamnesi riproduttiva deve essere condotta su ogni attrice; dove siano stati osservati segni riconducibili a IN, dovrebbero, nella stagione successiva, esser evitati gli stessi accoppiamenti e comunque le gestazioni considerate come a "rischio" per la produzione di puledri

affetti da IN (David B.J., 1998). Nell'ultimo terzo di gestazione è possibile valutare il plasma della fattrice per la presenza di anticorpi anti-eritrociti; un'alta concentrazione specialmente verso i fattori Aa e Qa sono indicativi di una potenziale IN. Il titolo dovrebbe essere controllato particolarmente ai 330 giorni di gestazione poiché le immunoglobuline aumentano drasticamente prima del parto. Le analisi sono condotte in laboratori specializzati, dove il siero della fattrice è messo a contatto con sangue dello stallone o con eritrociti di cavalli con fattori ematici noti. La presenza di Ig antieritrociti può essere svelata nel colostro materno, prima che questo sia ingerito dal puledro. Il JFA test (Bailey *et al.*, 1987) (Tabella 1) dimostrando tramite la reazione di agglutinazione tra il colostro e gli eritrociti del puledro, conferma la potenziale IN pur non specificando il fattore ematico coinvolto. Un titolo di 1:16 o maggiore conferma l'impossibilità di somministrare il colostro al puledro; le concentrazioni delle Ig colostrali devono essere valutate ogni 24 ore, il puledro può quindi essere assumere latte materno quando il risultato del titolo è <1:16. Nei puledri di gestazioni interspecifiche il colostro deve essere eliminato se il titolo è di $\geq 1:64$ o maggiore (McClure *et al.*, 1997). I puledri considerati a rischio non devono assumere il colostro materno, devono necessariamente portare una musetta che ne impedisca la suzione; inoltre devono essere alimentati con colostro artificiale e deve essere considerata una terapia atta a compensare il fallimento del passaggio immunitario. In medicina umana valutazioni del titolo anticorpale nei confronti del fattore "Rh" vengono effettuate con cadenza mensile durante tutta la gestazione. Le caratteristiche placentari in questa specie conferiscono la possibilità di passaggio di eritrociti fetali anche prima del parto, sensibilizzando la gestante e conferendole memoria immunitaria, principale complicazione nelle future gestazioni. Per la profilassi di questa patologia è stata proposta la rimozione accelerata delle Ig

anti-Rh tramite l'impiego di anticorpi monoclonali (Thomson *et al.*, 1990). Situazione analoga, è stata osservata nella specie equina; in fattrici con assenza sia del fattore Aa che del fattore Ca, può verificarsi la normale produzione di Ig-Ca anche in assenza di sensibilizzazione durante la gravidanza o in seguito a trasfusione. Nelle gestazioni incompatibili, dove il feto abbia ereditato entrambi i fattori Ca e Aa, è stato dimostrato che Ig dirette verso il fattore Ca sopprimono la produzione di Ig anti-Aa presumibilmente accelerando la rimozione degli eritrociti fetali dal circolo materno (Bailey and Albright, 1988). Gli studi condotti indicano la possibilità di applicare questa strategia nelle gestazioni ad alto rischio e quindi per le gravidanze interspecifiche dove l'incompatibilità dei fattori ematici è sempre presente.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

Lo studio sperimentale ha preso inizio nella stagione riproduttiva 2005/2006 e si è concluso con i parti della stagione 2008/2009, presso l'Azienda Didattica della facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Perugia in Sant'Angelo di Celle - Deruta (Pg). Durante lo studio sono state impiegate n=10 fattrici multipare di razza Trotter, enucleate dal libro genealogico, con un peso medio di 500 ± 50 kg. Tutti gli animali sono stati mantenuti liberi in paddock e alimentati con fieno *ad libitum* e con concentrato pellettato per tutta la gestazione. L'anamnesi remota delle fattrici non riferiva gravidanze patologiche e distocie al parto nelle precedenti stagioni riproduttive. Le cavalle sono state sottoposte a visita clinica per escludere affezioni o anomalie del tratto genitale. Le caratteristiche estrali di ogni singolo soggetto sono state esaminate attraverso la valutazione delle manifestazioni esterne dei calori, il teasing, la palpazione rettale e i mezzi d'indagine ecografici. Le visite ginecologiche sono state condotte tramite l'esame vaginale strumentale e la palpazione trans-rettale per valutare, rispettivamente, l'aspetto della cervice, la tonicità uterina e le strutture ovariche. L'utilizzo del mezzo ecografico ha permesso inoltre di eseguire la misurazione dei follicoli preovulatori (35 - 45 mm) e di valutare l'ecogenicità uterina. Gli animali sono stati inseminati artificialmente, a giorni alterni, fino alla conferma ultrasonografica dell'ovulazione (giorno=0).

Il seme, prelevato da un asino di razza Amiatina, in attività nel Centro di Inseminazione dell'Associazione Allevatori del Friuli Venezia Giulia - Codroipo, Udine è stato sottoposto ad analisi quali-quantitativa. Sono state prese in considerazione la motilità totale e progressiva, la concentrazione e la percentuale delle anomalie morfologiche degli spermatozoi.

La motilità totale e progressiva sono state valutate sul seme tal-quale e dopo 24, 48 e 72 ore di refrigerazione. Per analizzare la morfologia spermatica è stata utilizzata la colorazione eosina-nigrosina. I campioni sono stati osservati al microscopio ottico, a 1000x ingrandimenti, contando almeno 200 spermatozoi per vetrino. Durante l'inseminazione artificiale è stato utilizzato materiale sterile e non tossico come siringhe non spermicide con stantuffo di plastica (Vineland, Airtite, NJ[®]), cateteri da inseminazione (Minitube[®]) e gel sterile.

Le fattrici sono state contenute in travaglio, la coda fasciata e allontanata dalla regione perineale. L'area è stata sottoposta a lavaggio chirurgico per eliminare le fonti di contaminazione. Il seme è stato utilizzato entro le 24 ore dal prelievo. Per l'inseminazione sono stati usati 30 ml di seme diluito in estender (Kenney) a una concentrazione di 40×10^9 spermatozoi/ml con $600-700 \times 10^6$ spermatozoi progressivamente mobili.

Sulle fattrici è stato applicato un programma di profilassi vaccinale con prodotti inattivati contenenti EHV-1 ed EHV-4. Il vaccino è stato somministrato al 5°, 7° e 9° mese di gestazione. I soggetti sono stati inoltre sottoposti a vaccinazione, nei confronti del *Clostridium tetani* e dei virus dell'influenza equina A1 e A2 al 10°

mese di gestazione, previa profilassi antelmintica con Ivermectina e Praziquantel.

Metodica ultrasonografica durante la gestazione

L'esame trans-rettale è stato eseguito utilizzando un apparecchio ultrasonografico (Mindray® 3300) munito di sonda lineare (5 MHz).

L'esame trans-addominale è stato eseguito utilizzando sonda settoriale variabile (3,5-5-6,5MHz), previa tricotomia della parete ventrale dell'addome, dal margine craniale della ghiandola mammaria al processo xifoideo e lateralmente fino alle grasselle. Inoltre, prima di ogni esame l'intera area è stata attentamente lavata con acqua calda e alcool.

Aspetto ultrasonografico dal giorno dell'ovulazione al 50° giorno di gestazione

Valutazioni ecografiche trans-rettali sono state eseguite giornalmente in tutti i soggetti, dal momento dell'ovulazione. Le scansioni uterine, trasversali e longitudinali, sono state effettuate procedendo sistematicamente dalla porzione cervicale dell'utero verso le corna uterine e le ovaie, secondo lo schema introdotto da Ghinter (1995). Il corpo e le corna uterine sono stati suddivisi in 6 porzioni: craniale (1dx) e caudale (2dx) del corno di destra, craniale (1sx) e caudale (2sx) del corno di sinistra, giunzione utero cornuale (3) e corpo uterino (4). La mappatura dei segmenti uterini è stata eseguita con l'obiettivo di determinare la presenza e le dimensioni delle cisti

endometriali, al fine della precoce individuazione della VE durante la diagnosi di gravidanza. La localizzazione della VE all'interno dell'utero e i diametri massimi, verticali e orizzontali sono stati registrati dal giorno della diagnosi di gravidanza. Per ogni esame ecografico sono state previste 3 misurazioni; il dato finale è stato espresso in media e deviazione standard. La posizione della VE all'interno dell'utero è stata registrata ogni 15 minuti per 2 ore, durante la fase di mobilità; il dato finale è stato espresso come percentuale delle VE osservate per porzione uterina. Sono stati osservati: la perdita della sfericità e il cambiamento dell'aspetto ecografico della VE rispetto all'incremento del tono uterino. Il giorno della fissazione è stato definito il primo giorno in cui la VE era stata assegnata nella stessa porzione uterina dei giorni seguenti come proposto da Ghinter (1995). È stato registrato il giorno in cui l'embrione si rendeva visibile sul fondo dell'emisfero ventrale del sacco vitellino, così come il giorno in cui era possibile apprezzare l'attività cardiaca. È stata osservata l'emergenza e lo sviluppo del sacco allantoideo dal pavimento della VE, la concomitante regressione del sacco vitellino e la migrazione dell'embrione dal polo ventrale a quello dorsale della VE. I diametri orizzontali e verticali delle sezioni trasversali e longitudinali dell'embrione sono stati determinati durante tutta la fase embrionale. Sono state registrate, inoltre l'origine e formazione del sacco amniotico (allantoamnios), la regressione del vitellino e la formazione del cordone ombelicale.

Nel corso di ogni esame ecografico, sono state eseguite un minimo di tre misurazioni, e sono state espresse quindi in media e deviazione standard.

Aspetto ecografico della gestazione dal 50° giorno al termine

Nel presente studio i parametri sistematicamente esaminati per determinare il benessere fetale o Profilo Biofisico Fetale (PBF) come proposto da "Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987" sono stati: la frequenza cardiaca, attività fetale, ecogenicità dei fluidi. Attenzione particolare è stata riposta nella valutazione dello spessore e dell'aspetto dell'UFP.

Le Morfometrie per la valutazione del corretto sviluppo e accrescimento fetale sono state ricercate come: diametro aortico durante l'attività cardiaca, diametri e volume dell'orbita fetale come introdotto da "McKinnon *et al.*, 1988 e Renaudin *et al.*, 2001".

Frequenza Cardiaca Fetale

La frequenza cardiaca è stata determinata tramite visualizzazione ecografica diretta del cuore sia attraverso l'esame trans-rettale sia trans-addominale, utilizzando contemporaneamente alla visualizzazione bi-dimensionale (B-mode), l'analisi monodimensionale (M-mode). La frequenza cardiaca è stata calcolata e visualizzata automaticamente sullo schermo secondo la formula: $120 \text{ sec} / \text{tempo di due contrazioni} = \text{b.p.m}$ (battiti per minuto). Nel corso di ciascun esame la frequenza cardiaca è stata calcolata come media di un minimo di 3 misurazioni, in condizioni d'inattività del feto (fase di quiete) e durante l'aumento di attività.

Frequenza del polso carotideo fetale

Esami ecografici trans-rettali sono stati eseguiti con l'obiettivo di visualizzare le carotidi esterne e le giugulari del feto tramite scansioni longitudinali e trasversali dalla regione faringea e del collo. Visualizzate con sezioni trasversali, le aree anecogene delle tasche gutturali, si procede verso la base di queste sino a visualizzare la carotide esterna e la giugulare ipsilaterale. La sistole cardiaca e le pressioni all'interno dell'arco aortico, generano uno spostamento delle carotidi sulla giugulare ipsilaterale che può essere valutato alla base delle tasche gutturali con il sistema M-mode (Bucca *et al.*, 2007).

Attività fetale

La tonicità è stata valutata: presente, se il feto estendeva o fletteva gli arti, il dorso e il collo o assente, se il feto appariva flaccido. L'attività è stata espressa in base ad una scala variabile da 0 a 3 in relazione al tempo d'osservazione: grado 0: assenza di movimento; grado 1: scarso movimento ($\leq 33\%$); grado 2: evidente movimento ($> 33\%$ e $< 66\%$); grado 3: elevato movimento ($> 66\%$) (Reef *et al.*, 1995).

Ecogenicità dei fluidi

L'ecogenicità dei fluidi fetali è espressa da una scala variabile da 1 a 4 (McKinnon *et al.*, 1988; Verpoets *et al.*, 1976): grado 1: bianco (iperecogeno); grado 2: grigio chiaro (semiecogeno; numerose

particelle iperecogene in ambiente anecogeno); grado 3: grigio scuro (ipoecogeno; rare particelle iperecogene in ambiente anecogeno); grado 4: nero (anecogeno).

Presentazione e Posizione

A ogni osservazione ecografica del feto, sono stati registrati: il rapporto tra l'asse longitudinale del feto e l'asse del canale del parto o del rachide materno (presentazione) e grazie all'osservazione della struttura anecogena dello stomaco (punto di repere) il rapporto tra la posizione dorsale o lombare del feto ed i quadranti del bacino materno (posizione).

Diametro Aortico Fetale

Il diametro aortico è stato ottenuto visualizzando ecograficamente l'aia cardiaca e l'aorta discendente alla base del cuore come proposto da Adams-Brendemuehl e Pipers, 1987. I diametri sistolici sono stati registrati per mese di gestazione.

Orbita Fetale

Visualizzata la struttura anecogena dell'orbita fetale, l'immagine è stata fermata per permettere le misurazioni. I diametri oculari sono stati considerati come lunghezza e profondità. Come punti di repere sono stati considerati i margini iperecogeni delle strutture ossee della

fossa orbitale. I diametri, l'area e la circonferenza sono stati determinati dalla media di 3 misurazioni consecutive; il volume medio dell'orbita fetale è stato determinato come la somma del diametro verticale e orizzontale ottenuti, come proposto da McKinnon *et al.*, 1988.

Valutazione dello Spessore dell'UFP trans-rettale nel punto della stella cervicale

L'UFP è stata valutata con esami ecografici trans-rettali dal 50°giorno e durante tutta la gestazione con intervalli settimanali. Le immagini trans-rettali sono state ottenute ponendo la sonda all'altezza della stella cervicale fino alla visualizzazione di una ramificazione dell'arteria uterina media come proposto da "Renaudin, 1997". Sono state quindi eseguite le determinazioni dello spessore dell'UFP dorsale e ventrale. Per ogni esame la procedura è stata ripetuta 3 volte ed espressa in medie e deviazione standard. Il dato finale è stato espresso per mese di gestazione.

Valutazione dello spessore dell'UFP trans-addominale

La profondità dei liquidi fetali e lo spessore utero-placentare sono stati valutati dal 150° giorno di gestazione con approccio trans-addominale. L'addome della fattrice è stato diviso in 9 quadranti: sinistro, medio e destro caudali- sinistro, medio e destro centrali o medi- sinistro, medio e destro anteriori. La profondità del liquido allantoideo è stata ottenuta misurando perpendicolarmente all'UFP

ventrale la distanza del feto. Le aree dove il feto era osservato in contatto con l'unità feto placentare non sono state valutate per fenomeni di compressione su questa che possono interferire con la raccolta dati. Per ogni esame la procedura è stata ripetuta 3 volte ed espressa in medie e deviazione standard. Il dato finale è stato espresso per mese di gestazione.

Determinazione del sesso nel feto

Le fattrici sono state sottoposte a esame ultrasonografico trans-rettale con sonda lineare da 5 MHz tra il 58° e il 70° giorno di gestazione. La porzione caudale del feto è stata individuata impiegando le coste quale punto di repere; sono stati quindi identificati il cuore e i polmoni. Muovendo caudalmente il trasduttore, sono stati osservati il diaframma, il fegato e lo stomaco ripieno di fluido anecogeno, nella porzione craniale dell'addome. Sono stati quindi visualizzati dorsalmente la milza e i reni, ventralmente l'inserzione addominale del cordone ombelicale e le gonadi fetali, tubercolo genitale come proposto da Bucca, 2005. Tra il 120° e il 150° giorno di gestazione è stato condotto un esame ultrasonografico trans-addominale con sonda settoriale da 3,5 MHz per convalidare la diagnosi precoce trans-rettale effettuata nel terzo mese di gestazione.

Al 330° giorno di gravidanza, sulla base del grado di sviluppo dei segni premonitori del parto, raccolti durante l'esame clinico ostetrico manuale e strumentale, è stato applicato sulle rime vulvari delle fattrici, un "foaling alarm" in grado di segnalare l'esatto

momento di impegno, nel canale del parto, del feto. L'inizio della seconda fase del travaglio, la fine della fase espulsiva e il secondamento sono stati registrati dal rilevamento del segnale.

L'ispezione delle strutture placentari è stata eseguita nei minuti seguenti il distacco spontaneo (secondamento); gli annessi placentari sono stati separati, pesati e disposti, al fine di determinare la presenza di possibili alterazioni o lesioni durante una sistematica valutazione macroscopica come proposta da "Schlafer DH. 1996". Entrambe le superfici, allantoidea e corionica, sono state osservate distendendole a forma a "F" e individuando le porzioni anatomiche del corno gravidico, del corno non gravidico, del corpo e della "stella cervicale" (Figura 3). La porzione verticale della "F" corrisponde al corpo uterino, con la stella cervicale in direzione dell'osservatore e le braccia, superiori e inferiori, rispettivamente al corno gravidico e al corno non gravidico. È stato determinato il peso e il volume, mediante immersione in un cilindro graduato dell'allantocorion. La lunghezza del cordone ombelicale, sia della porzione amniotica sia allantoidea, il peso dell'amnios sono stati registrati.

Esame clinico peri-natale del puledro

L'Esame Clinico è stato condotto entro il primo minuto dalla nascita e ripetuto dopo cinque minuti; per la valutazione della compatibilità alla vita extra-uterina, è stato applicato il sistema a punteggio A.P.G.A.R. opportunamente modificato per la specie equina da "Knottenbelt D.C. 2004". Un prelievo ematico è stato eseguito durante il primo esame clinico neonatale per la valutazione dell'ematocrito e dei principali valori biochimici. Un'aliquota di sangue è stata utilizzata, come nella

metodica descritta da "Bailey *et al.*, 1988" (Jaundiced Foal Agglutination Test) per evidenziare la possibile insorgenza della iso-eritrolisi neonatale, dopo l'assunzione delle immunoglobuline di origine colostrale nel puledro. I puledri sono stati inoltre sottoposti al test rapido commerciale per la determinazione delle IgG seriche, con un secondo prelievo ematico effettuato trascorse 8 ore dalla prima assunzione del colostro (Midland Quick Test Kit®).

Esami clinici neonatali sono stati condotti ogni 6 ore durante le 48 ore successive al momento del parto, con l'obbiettivo di osservare l'adattamento all'ambiente extrauterino e il normale attivarsi e svolgersi delle funzioni organiche nel puledro; temperatura rettale, minzione, defecazione e assunzione del colostro sono state registrate.

APGAR Score System (Knottenbelt D.C. 2004) (Tabella 8).

Un punteggio totale = 8-10 è normale, un punteggio = 5-7 è indicativo di una lieve asfissia e un punteggio = 0-4 di un'asfissia grave. Il parametro usato in medicina umana per evidenziare la presenza di cianosi (Appearance) è stato sostituito con l'esame delle mucose, assegnando 0 punti in presenza di mucose grigiastre-blu, 1 punto a mucose rosa pallido e 2 punti a mucose rosa scuro (Vaala, 2002). Dopo avere eseguito la valutazione APGAR, entro i primi 10-15 minuti, è stato eseguito l'esame clinico dei vari apparati.

Esame neurologico

È stato eseguito l'esame dello stato del sensorio osservando il comportamento dell'animale: le reazioni nei confronti degli stimoli provocati, l'abilità ad alzarsi, coordinazione e forza. Lo stimolo nasale può essere accompagnato dallo stimolo del padiglione auricolare o da quello toracolombare, facendo scorrere il pollice e l'indice lungo la colonna vertebrale dalla nuca alla base della coda. Il puledro normale, come risposta a questa manualità, muove gli arti e la testa e cerca di mettersi in stazione quadrupedale (Vaala e Sertich, 1994).

Valutazione apparato cardio-vascolare

Sono state esaminate le mucose ed è stato osservato il colore, l'umidità e il tempo di riempimento capillare. Le estremità distali sono state palpate.

È stata valutata la frequenza cardiaca, il ritmo e la presenza di alterazioni patologiche. Il polso è stato valutato a livello di arteria facciale, dall'arteria brachiale sulla faccia mediale del gomito (arteria grande metatarsale).

Valutazione apparato respiratorio

È stata eseguita l'ispezione delle prime vie aeree per verificarne la pervietà.

La frequenza respiratoria è stata calcolata osservando gli atti respiratori dell'animale per un minuto da una certa distanza. L'esame obiettivo particolare dell'apparato respiratorio è stato eseguito per escludere la presenza di alterazioni patologiche e di fratture costali che possono verificarsi durante parti difficili.

Valutazione apparato gastroenterico

Alterazioni del palato e della faringe sono state ricercate per prevenire l'errato passaggio del latte verso i polmoni. L'esame ispettivo dell'addome è stato eseguito osservando posteriormente l'animale, ciascuna regione è stata esaminata da un angolo leggermente obliquo. È stata verificata la totale espulsione del meconio. La percussione è stata eseguita per rilevare la possibile presenza di anse meteoriche a sonorità timpanica. L'auscultazione è stata eseguita con un tempo minimo di 2 min. procedendo dalla fossa paralombare verso la parte ventrale dell'addome.

Valutazione apparato uro-genitale

La lacerazione del cordone ombelicale è stata osservata. È stata accertata la fisiologica retrazione dell'arteria ombelicale; l'ombelico è stato disinfettato con iodio e la cicatrizzazione è stata oggetto di osservazioni giornaliere. La regione ombelicale è stata palpata per escludere la presenza di ernie ombelicali. È stata eseguita l'ispezione dei genitali esterni, la palpazione dello scroto, del prepuzio, del pene e della vulva. L'esame obiettivo particolare dell'apparato urinario e

l'esame fisico delle urine hanno permesso di escludere affezioni quali l'uraco pervio e la stranguria, e alterazioni quali-quantitative dell'urina.

Esame oftalmologico

Per la valutazione particolare dell'occhio sono state osservate la forma e volume dell'occhio *in toto*, le palpebre esterne e la nittitante. L'esame strumentale con oftalmoscopio è stato condotto per la valutazione della cornea e delle strutture interne iride, cristallino e retina.

Valutazione apparato muscolo-scheletrico

Il puledro è stato attentamente esaminato per rilevare la presenza di traumi da parto, come frattura delle coste, danni al plesso brachiale, rottura del gastrocnemio, frattura delle ossa lunghe o della mandibola.

Tutti gli arti sono stati esaminati per l'eventuale presenza di contratture, lassità dei legamenti, deformità angolari e altre malformazioni, come la lussazione congenita della rotula.

Dopo le 48 ore dal parto, la fattrice e il puledro sono stati condotti insieme nel paddock esterno e i successivi controlli sono stati effettuati con cadenza giornaliera. Al 5° mese di vita a ogni puledro,

in previsione dello svezzamento, è stata effettuata una terapia antielmintica a base d'ivermectina e praziquantel (Equimax[®]) e prima profilassi vaccinale per Influenza Equina e Tetano (Duvaxin IE+T[®]).

RISULTATI

Le 10 fattrici sono state esaminate giornalmente dal 5° giorno dopo l'ovulazione. Nello periodo oggetto di studio, la media degli interventi fecondativi è stata 1.53 ± 0.4 di F.A. per concepimento per fattrice. Nella Tabella 2 sono state riportate le medie \pm ds delle caratteristiche quali-quantitative del seme. Nella tabella 3 è stata riportata la percentuale di spermatozoi mobili e progressivi a 24, 48 e 72h dal prelievo (media \pm ds).

Nelle cavalle sono state diagnosticate ecograficamente 25 gravidanze; sono state osservate 27 VE. I diametri trasversali delle VE sono stati registrati dal momento della diagnosi di gravidanza fino al giorno in cui eccedevano le capacità bidimensionali dell'ecografo. La VE è stata osservata da 9.5 ± 1.5 giorno, con un diametro medio di 4.6 ± 1.1 mm. Il 37.5% delle VE sono state osservate all'8° giorno dall'ovulazione.

Sono state osservate due gravidanze gemellari, entrambe nella stessa fattrice, in diverse stagioni riproduttive. Durante le indagini compiute nella prima gravidanza gemellarle, le due VE differivano in diametro di 4 mm. Al 26° giorno, si è verificata la riduzione spontanea della VE di diametro minore. La riduzione è stata associata alla fissazione unilaterale delle VE all'interno dello stesso corno con conseguente competizione per il sito d'impianto. Nella VE di diametro maggiore è stato possibile registrare, durante l'osservazione dello sviluppo degli

annessi fetali, un'irregolarità nell'orientamento della VE e del nodo embrionale. Nel corso delle osservazioni, all'interno della VE, il sacco vitellino era visibile al di sotto dell'embrione, mentre il sacco allantoideo emergeva dal polo dorsale. L'interruzione spontanea della gravidanza è stata registrata al 115° giorno, con assenza di attività cardiaca fetale, non preceduta da apparenti segni ecografici di sofferenza fetale. Nella seconda gravidanza gemellare osservata, è stato eseguito lo schiacciamento manuale trans-rettale della vescicola con minor diametro al 14° giorno di gestazione; la seconda VE non ha mostrato differenze ultrasonografiche durante il periodo embrionale. L'assenza dell'attività cardiaca è stata registrata al 45° giorno in questa gestazione. I dati delle gestazioni gemellari sono stati esclusi dalle analisi statistiche.

E' stata osservata la riduzione spontanea della VE in due fattrici, rispettivamente al 23° e al 26° giorno di gestazione; i dati registrati: prima osservazione della VE, fase di mobilità, diametri medi, giorno di fissazione e tono uterino, prima osservazione e diametri dell'embrione, sono stati studiati separatamente, quindi confrontati con i dati medi ottenuti nel gruppo sperimentale; nessuna differenza significativa è stata osservata. L'attività cardiaca embrionale non è stata osservata in entrambe le VE.

In due gestazioni al 65° e al 120° giorno di gestazione è stata osservata l'assenza dell'attività cardiaca fetale; nessuna differenza significativa è stata osservata nello sviluppo di queste gestazioni dalla comparazione dei dati registrati.

In una fattrice del gruppo è stato osservato un aborto nell'ultimo terzo di gestazione, durante la stagione riproduttiva 2005/2006. L'espulsione del feto è stata registrata al 265° giorno di gestazione senza alcun segno premonitore. Sul feto abortito e sugli annessi fetali, sono state condotte indagini necroscopiche e test di

laboratorio. Nessuna lesione specifica è stata evidenziata. In questa fattrice, nelle seguenti stagioni riproduttive, l'aborto tardivo è stato sempre osservato. Durante la seconda gravidanza interspecifica, dal 4° al 7° mese di gestazione, è stato osservato un aumento di volume dell'ovaio sinistro unitamente ad un aspetto ecografico policistico (Figura 4). L'UFP media registrata dal 8° mese di gestazione fino all'aborto è stata di $18,8 \pm 7,9$ mm., con una apprezzabile perdita della normale ecogenicità. Distacchi placentari progressivi sono stati osservati dal 300° giorno di gestazione sia con approccio trans-rettale sia con quello trans-addominale; la mancata attività fetale è stata registrata al 302° giorno di gestazione, l'espulsione del feto completamente rivestito dagli invogli è stata osservata dopo 24 ore da questa. Sul feto abortito e sugli annessi fetali, sono state eseguiti indagini necroscopiche e test di laboratorio. Nessuna lesione ad eziologia infettiva è stata evidenziata. L'aumento dello spessore e del peso del corion-allantoide è stato confermato all'esame necroscopico. Nella gestazione seguente l'aumento dell'UFP è stato registrato dal 7° mese con uno spessore medio di $15,6 \pm 4,7$. Le frequenze cardiache in stato di quiete osservate in questa gestazione non hanno mostrato differenze significative; differentemente scarsi movimenti fetali e una bassa reattività cardiaca sono stati osservati dal confronto con le altre gestazioni.

Nelle gravidanze osservate ($n=20/27VE$), il giorno medio di fissazione della VE è stato registrato al 17.1 ± 1.1 giorno di gestazione con un diametro medio di $25 \pm 0,2$ mm. Il 63.5% delle VE (12/20) si sono fissate in corrispondenza della giunzione corpo-cornuale di sinistra.

La fase di mobilità della VE è stata seguita, in 9 gestazioni; l'analisi dei dati ha permesso di esprimere la localizzazione delle VE,

all'interno dei segmenti uterini, nei diversi giorni sino alla fissazione; i dati sono riportati nel Grafico 1.

Ecograficamente la VE è apparsa di forma sferica fino al 16.2 ± 1.3 giorno, di forma plettiforme dal giorno 17.8 ± 0.8 , per poi assumere una forma prevalentemente irregolare dopo il 20.2 ± 1.1 giorno di gestazione (Figura 6). L'accrescimento medio della VE è stato di 4.04 mm/die, dal 11° al 16° giorno; di 0.4 mm dal 16° fino al 28° giorno post ovulazione (fase di plateau) e di 1.78 mm/die fino al 45° giorno di gestazione (Grafico 2). La crescita media non è stata determinata oltre il 50° giorno di gestazione, in quanto le dimensioni della VE precludevano accurate misurazioni.

Il nodo embrionale è stato osservato in media al 19.9 ± 1.9 giorno con un diametro medio di 2.4 ± 1.4 mm. L'accrescimento medio embrionale registrato dal giorno 20° al 45° giorno è stato di 0.5 mm/die (Grafico 3).

La presenza del battito cardiaco è stata osservata in media al 24 ± 2.4 giorno post-ovulazione.

L'emergenza del sacco allantoideo è stata registrata al 23.3 ± 1.9 giorno medio, ed è stata seguita durante il suo sviluppo insieme alla concomitante migrazione dell'embrione e alla regressione del sacco vitellino. L'embrione era presente nel polo dorsale della VE in media al 28.3 ± 1.4 giorno. La discesa dell'embrione verso il polo ventrale è stata osservata dal giorno 34 ± 3.4 , insieme alla formazione del cordone ombelicale. Il feto era visibile nel polo ventrale al giorno 46.4 ± 2.7 di gestazione (Figura 7,8).

Tra l'80° ed il 100° giorno di gestazione, la profondità assunta dall'utero gravido all'interno dell'addome e il volume dei liquidi fetali,

hanno permesso spesso l'osservazione solo parziale dei feti sia con approccio trans-rettale sia con quello trans-addominale.

Nei 19 feti monitorati, un totale di 369 e di 151 le valutazioni ecografiche trans-rettali e trans-addominali che sono state eseguite per la valutazione dell'UFP (Grafico 4), del PBF e dell'accrescimento fetale ; 1107 le misurazioni complessive registrate dell'unità feto placentare dorsale e ventrale. I dati sono stati riportati nel Grafico 3.

Le osservazioni dirette alla misurazione dell'area cardiaca e alle registrazioni delle frequenze cardiache nei feti sono state possibili con il singolo approccio trans-rettale sino al 5° mese, l'approccio trans-addominale è stato utilizzato dal 5° mese al termine e sono espresse nella Tabella 4; la frequenza cardiaca a livello delle carotidi è stata osservata in 10/18 feti dal 6° mese di gestazione e sono espressi nella Tabella 7. L'incremento delle dimensioni fetali non ha reso possibile, con l'approccio trans-rettale, ottenere misurazioni relative ai diametri e circonferenze addominali fetali oltre il 113° giorno ed oltre il 141° giorno per la lunghezza e profondità dello stomaco. Le misurazioni biparietali, dei diametri e delle aree della scatola cranica, si sono dimostrate di difficile raccolta e analisi. Risultati attendibili sono stati ottenuti solo nel primo terzo di gestazione. L'intensa attività fetale, la variabilità in presentazione e posizione del feto durante il 5° e 6° mese, nonché le dimensioni fetali raggiunte nell'ultimo terzo di gestazione conferiscono incostanza nelle osservazioni dei predefiniti punti di repere. Le misurazioni delle orbite oculari fetali sono state raccolte sistematicamente dal 3° mese e durante tutta la gestazione, mediante l'esame ecografico trans-rettale; un totale di 163 e 978 osservazioni e misurazioni sono state eseguite, i risultati ottenuti sono stati riportati nella Tabella 5.

La valutazione del diametro aortico è possibile con il solo approccio trans-rettale sino al 6° mese e talvolta è difficilmente visualizzabile per l'intensa attività fetale rispetto l'approccio trans-addominale nello stesso periodo (48/120). I risultati ottenuti sono espressi nella tabella per mese di gestazione. Particelle ecogene libere sono state normalmente osservate nei liquidi amniotico e allantoideo. L'ecogenicità dei fluidi non ha avuto consistenti variazioni durante il 2° e 3° periodo di gestazione; un leggero aumento della torbidità del liquido amniotico al 4° mese si è manifestato in tutte le gravidanze del gruppo. Durante gli esami ecografici non sono stati visualizzate strutture ascrivibili ad ippomani, diversamente al parto, ne sono stati osservati in quattro gestazioni.

Nel presente studio i feti hanno assunto la presentazione anteriore dal 180° giorno di gestazione. Temporanei cambiamenti sono stati osservati durante il 5° mese di gestazione.

Il parto si è verificato in media a 349.2 ± 2.6 giorni; il segnalatore posto sulla rima vulvare ha permesso di individuare l'inizio della fase espulsiva. A momento della ricezione del segnale di allarme, il 92% delle fattrici erano in decubito laterale ed il sacco amniotico integro era visibile al di fuori della rima vulvare. Le successive fasi del parto si sono svolte regolarmente e senza alcuna assistenza; la completa espulsione è stata registrata $15,26 \pm 5,16$ min. dopo la ricezione del segnale di allarme.

Le membrane fetali sono state espulse entro 2 ore ($119,9 \pm 23$ min.) dalla nascita ed esaminate immediatamente; non sono state rilevate anomalie macroscopiche. Il peso medio degli annessi fetali, è stato: allanto-corion $2 \text{ Kg} \pm 400 \text{ g}$, amnios $300 \text{ g} \pm 40 \text{ g}$. Il peso medio del cordone ombelicale è stato di $50 \pm 30 \text{ g}$, la lunghezza complessiva

del cordone ombelicale registrata, è stata in media di 110 ± 30 cm. La porzione amniotica era di $50 \text{ cm} \pm 20 \text{ cm}$.

Assistenza al neonato

La temperatura corporea dei puledri registrata ad un minuto dalla nascita è stata di 37.2 ± 0.4 °C. La temperatura media registrata ad 1h di distanza dal parto è stata di 38.2 ± 0.4 °C. Il punteggio totalizzato in media dai puledri con l' ausilio dell' APGAR Score System è stato di $8,4 \pm 0,7$; solo in un soggetto, a termine a 312 giorni di gestazione, sono stati osservati lievi segni di letargia, dispnea, lassità legamentosa dei posteriori e entropion bilaterale delle palpebre inferiori.

Gli animali hanno assunto la posizione sternale in un tempo medio di $18,1 \pm 5,1$ minuti dopo la nascita. La stazione quadrupedale è stata assunta in un tempo medio di 58.2 ± 23.4 minuti. I puledri hanno presentato, alla stimolazione, un buon riflesso di suzione ed hanno assunto il colostro in media dopo 114.8 ± 26.4 minuti dal parto. La prima minzione è stata registrata tra le 4 e le 6 ore dal parto; la prima espulsione spontanea del meconio è stata osservata tra le 9 e 11 ore dal parto; in tre soggetti è stato eseguito lo svuotamento manuale dell'ampolla rettale.

Il JFA test non ha evidenziato reazioni di emoagglutinazione con il colostro materno. Solo in un soggetto è stata osservata reazione al titolo di $\leq 1:64$; nessun segno clinico di IN è stato osservato in questo puledro. L'assunzione colostrale è stata osservata ripetendo il JFA test e le indagini ematochimiche ogni 12 ore; il risultato del JFA test eseguito a 24 dalla prima suzione è stato di $\leq 1:16$. Nessuna

alterazione dei parametri emato-chimici è stato osservato in questo puledro.

La valutazione dei livelli plasmatici di immunoglobuline ha dimostrato, già dopo le 8 ore dalla suzione, una adeguata competenza immunitaria (Ig>800 mg/dL) in tutti i soggetti nati.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati ottenuti dalla valutazione della concentrazione spermatica ($114.40 \pm 52.22 \times 10^6$) sono stati molto inferiori a quelli osservati nelle altre razze asinine ($182-400 \times 10^6$ spermatozoi/ml) (Carluccio *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2005). Il valore medio della motilità progressiva annuale riscontrato (69%) rientra nell'intervallo osservato dagli altri autori (65-88%) per il seme asinino (Mann *et al.*, 1963; Mello *et al.*, 2000; Serres *et al.*, 2002; Carluccio *et al.*, 2004). Tra questi autori, solo Carluccio *et al.* (2004) ha riportato un valore medio molto superiore a quello ottenuto nel presente studio ($84.2 \pm 5.5\%$ vs $68.88 \pm 4.63\%$). Questa differenza potrebbe essere imputabile ai soggetti inclusi nello studio o a un differente "set-up" dei software utilizzati.

La motilità totale e progressiva, relative al seme refrigerato conservato con diluente addizionato con tuorlo d'uovo, non sono risultate significativamente differenti dopo 24, 48 e 72 ore rispettivamente. Questo dato assume una particolare importanza alla luce dell'utilizzo del seme di asino amiatino in protocolli d'inseminazione artificiale, che prevedano anche la spedizione di dosi e il loro utilizzo nei giorni successivi al prelievo. L'incidenza delle anomalie morfologiche degli spermatozoi asinini è, in genere,

nettamente inferiore rispetto a quella osservata negli spermatozoi di stallone equino (Nishikawa *et al.*, 1951; Morais, 1990; Cherchi *et al.*, 2001; Carluccio *et al.*, 2004; Dowsett *et al.* 1982; 1996; Jasko *et al.*, 1991; Long *et al.*, 1993; Pickett *et al.*, 1993; Parlevliet *et al.*, 1994; Juhasz *et al.*, 2000). La percentuale di gameti normali di Demetrio Di Figno si attestava sui livelli più alti dell'intervallo registrato per la specie asinina, essendo mediamente dell'85% rispetto all'86-61% riportato per altre razze (Nishikawa *et al.*, 1951; Morais, 1990; Gastal *et al.*, 1997; Cherchi *et al.*, 2001; Carluccio *et al.*, 2004). I difetti più frequentemente osservati sono stati: acrosoma danneggiato (6.5%), anomalie del tratto intermedio (4.2%), anomalie della testa (3.2%), teste staccate normali (2.3%) e code piegate (2.9%). Nello studio di Miró *et al.* (2005) sugli asini Catalani è stato osservato il 10,2% di code immature e il 2.9% di teste staccate, valore, quest'ultimo, simile a quello da noi registrato. Negli asini di Martina Franca predominano i difetti del tratto intermedio (Carluccio *et al.*, 2004).

L'osservazione ecografica della VE all'8° giorno di gestazione è riportata da studi precedenti (Ginther, 1995). La possibilità di eseguire un precoce diagnosi di gravidanza è condizionata dalla manualità dell'operatore e dal tipo di sonda impiegata. In base a quanto riportato da Ginther (1995) infatti, utilizzando sonda da 5 MHz, la VE è evidenziabile al 9° giorno nel 5% dei casi e al 10° giorno nel 68% dei casi. Nel presente studio, all'8° e al 10° giorno di gestazione, sono state osservate rispettivamente il 37.75% ed il 75% delle VE. I valori medi registrati dei diametri della VE nelle gestazioni interspecifiche, non hanno presentato differenze significative rispetto ai dati pubblicati da altri autori per le gravidanze equina ed asinine (Ginther 1995; McKinnon *et al.*, 1988; Allen 1986) (Bessent *et al.*, 1988; Gastal *et al.*, 1993; Meira *et al.* 1998). Relativamente alla fase di mobilità, non sono state riscontrate significative differenze, rispetto

a quanto riportato nella cavalla e nell'asina. Il giorno medio di fissazione si esprime più tardivamente (17.3 ± 1.3 giorno) rispetto al pony (14.7 ± 0.2) e all'asino (15.6 ± 0.3) (Bessent e Ghinter, 1988). Nessuna differenza significativa è stata osservata per l'indice di crescita giornaliera e per il cambiamento della forma della VE. I dati relativi al nodo embrionale sono sovrapponibili a quelli riportati da Bessent e Ginther (1988) per la specie equina e da Meira (1998) per quella asinina. Le misurazioni della lunghezza cranio-caudale dell'embrione di mulo e il suo indice di crescita giornaliera sono risultati sovrapponibili ai dati degli embrioni di cavallo e asino, pur presentandosi, tra il 40° ed il 50° giorno di gestazione, una leggera inflessione dell'indice di accrescimento. Non è stato infatti possibile determinare con precisione la lunghezza longitudinale dell'embrione, per la mancanza di iperecogenicità delle strutture rachidiane primordiali e per l'ampia mobilità embrionale, soprattutto nell'ultimo periodo della fase embrionale. Nessuna significativa differenza è stata registrata nella formazione e sviluppo dei sacchi allantoideo e amniotico, nella regressione del sacco vitellino e nella formazione del cordone ombelicale.

La valutazione del profilo biofisico e il sessaggio del feto sono stati eseguiti contenendo le cavalle nel travaglio, senza sottoporle a sedazione; la metodica non è invasiva, e generalmente non arreca disagio agli animali. E' stato riportato che la somministrazione di xilazina e detomidina può indurre nel feto bradicardia e riduzione dei movimenti (Vaala e Sertich, 1994). Le osservazioni relative all'attività cardiaca embrionale e fetale sono risultate sovrapponibili ai precedenti studi condotti sul feto equino (Renaudin *et al.*, 2000; Bucca *et al.*, 2005, Bucca *et al.*, 2007). La risposta della frequenza cardiaca ai movimenti, è un indice di stress fetale più sensibile rispetto al rilevamento della frequenza nei periodi d'inattività, che

generalmente non superano i 15–20 minuti (Vaala e Sertich, 1994); come nella valutazione del PBF in medicina umana, anomalie nella reattività cardiaca rispecchiano fenomeni di compensazione dello stato di parziale ipossia e acidosi metabolica che si instaurano durante le disfunzioni patologiche placentari.

La presentazione anteriore, il decubito fetale prevalentemente dorso-laterale e la facilità di reperire i margini della fossa orbitale, hanno permesso di determinare ecograficamente le dimensioni dell'orbita fetale, durante tutta la gestazione. L'analisi ultrasonografica dei parametri oculari risulta un valido mezzo per la valutazione dell'accrescimento fetale dal 3° mese e trova particolare applicazione nell'ultimo terzo della gravidanza, per le notevoli dimensioni del feto e la sua presentazione; si dimostra, inoltre, utile per stimare l'età del feto dove la data del concepimento non sia nota (Kahn e Leidl, 1987; McKinnon *et al.*, 1998; Renaudin *et al.*, 2000; Bucca *et al.*, 2005).

La profondità e l'ecogenicità dei fluidi, si modificano in relazione ai movimenti fetali; l'abnorme accumulo di tali liquidi è stato osservato nell'idrope degli invogli fetali (Vaala e Sertich, 1994). Nel presente studio non sono state apprezzate anomalie dell'ecogenicità dei fluidi placentari; l'ecogenicità del liquido amniotico era costantemente maggiore rispetto a quella allantoidea. Le particelle libere dei fluidi fetali sono state valutate utilizzando l'approccio trans-rettale, in quanto questa tecnica permette di ottenere immagini più definite rispetto all'esame transadominale (Renaudin *et al.*, 1997).

L'esame ultrasonografico trans-rettale fornisce ulteriori informazioni cliniche per la valutazione dello spessore complessivo utero-placentare dal 2° mese di gestazione. Essendo l'infezione ascendente la causa più frequente della placentite (Giles *et al.*, 1993; Ousey *et al.*, 2000), i segni clinici, quali l'aumento dello spessore complessivo

utero-placentare e il distacco placentare, possono essere precocemente diagnosticati mediante ecografia.

La diagnosi precoce della disfunzione placentare o dello stato di sofferenza fetale consente di migliorare il management della gravidanza, del parto e del neonato. In conclusione, l'esame ultrasonografico applicato alla valutazione del PBF, dell'UFP e dell'accrescimento fetale, rappresenta un'accurata metodica per la diagnosi della gravidanza a rischio e per la determinazione prenatale del sesso, nelle gestazioni interspecifiche.

ICONOGRAFIA

Figura 1. Crescita del sacco allantoideo e regressione del sacco vitellino dell'embrione di cavallo.

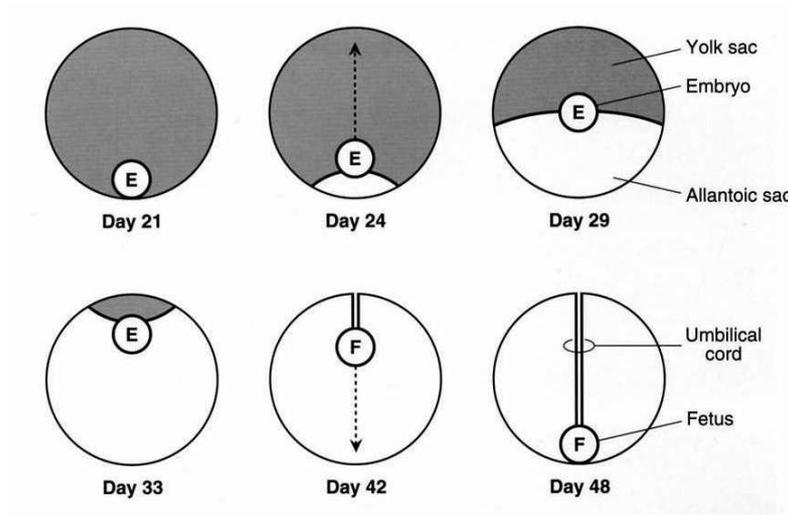


Figura 2. Accrescimento fetale nel cavallo.

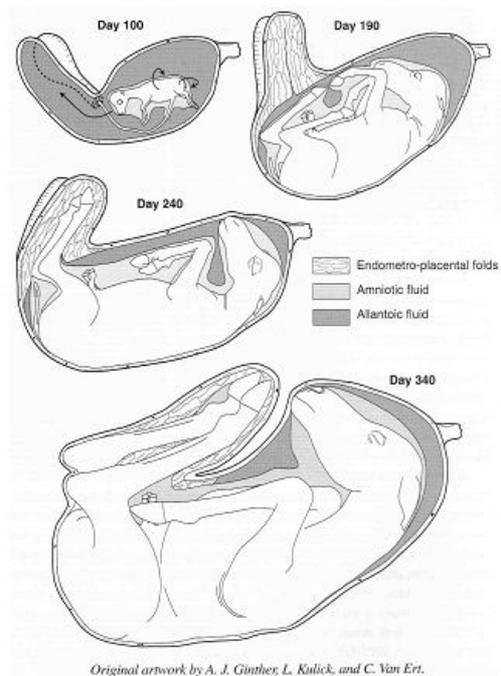


Figura 3. Placenta distesa ad "F": la parte verticale rappresentata dalla parte di placenta corrispondente al corpo uterino, con la stella cervicale in direzione dell'osservatore e le braccia , superiore e inferiore, rispettivamente dal corno gravidico e dal corno non gravidico.



Figura 4. Reperti ultrasonografici: aumento del volume ovarico e ispessimento dell'UFP osservata in una gravidanza interspecifica.

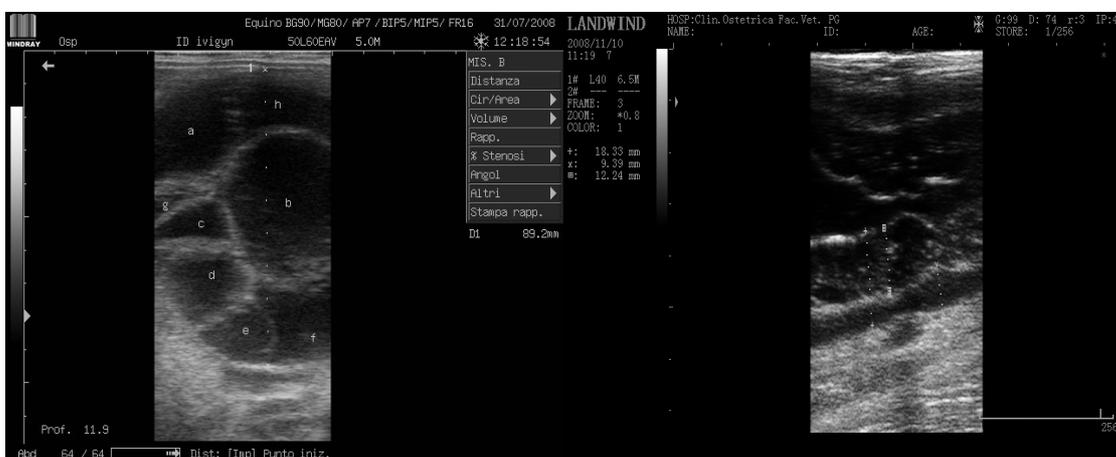


Fig. 5 -Immagini ultrasonografiche della VE (8°-16°giorno di gestazione).

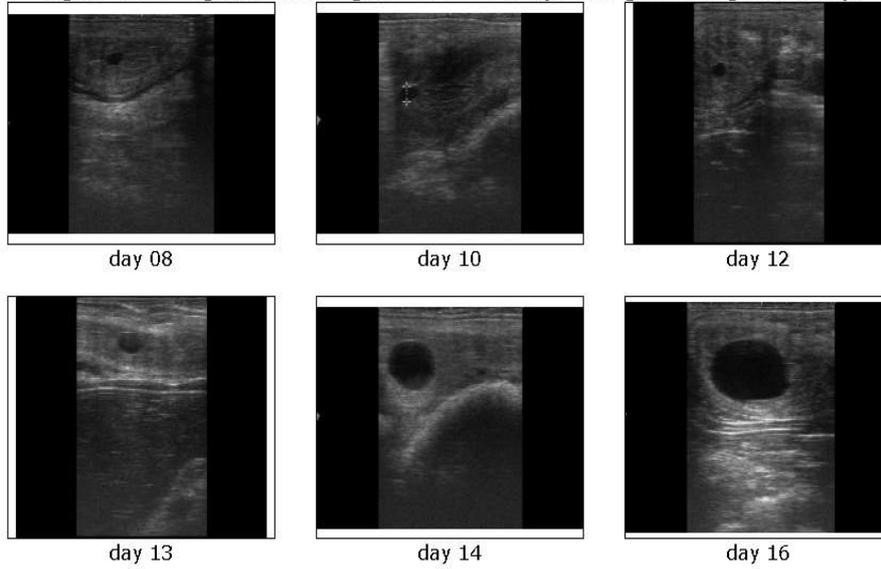


Fig. 6 -Immagini ultrasonografiche della VE (17°-24°giorno di gestazione).

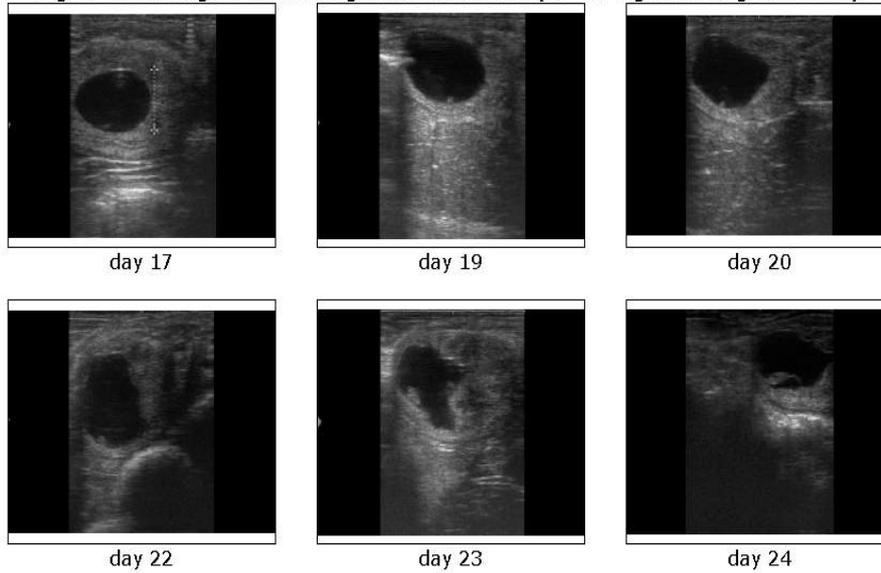


Fig. 7 - Immagini ultrasonografiche della VE (25°-31°giorno di gestazione).

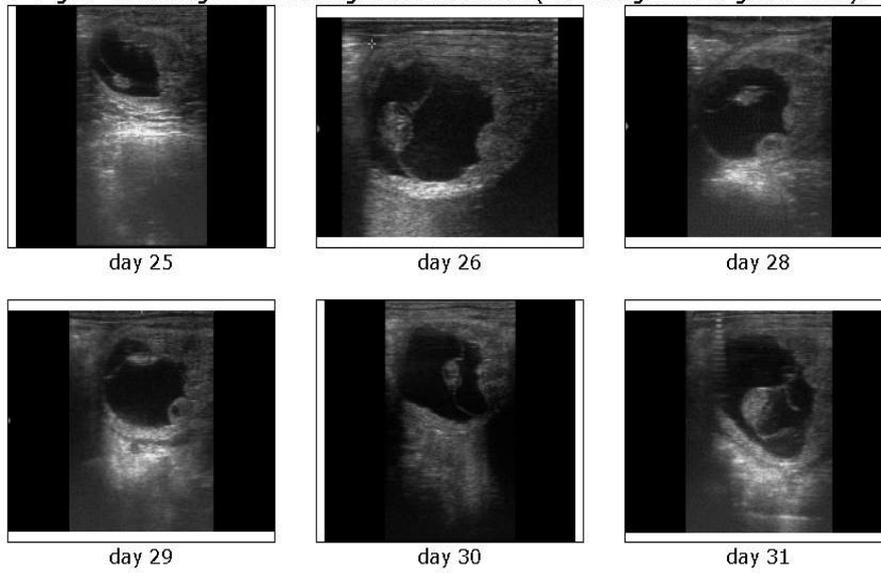


Fig. 8 - Immagini ultrasonografiche del feto.

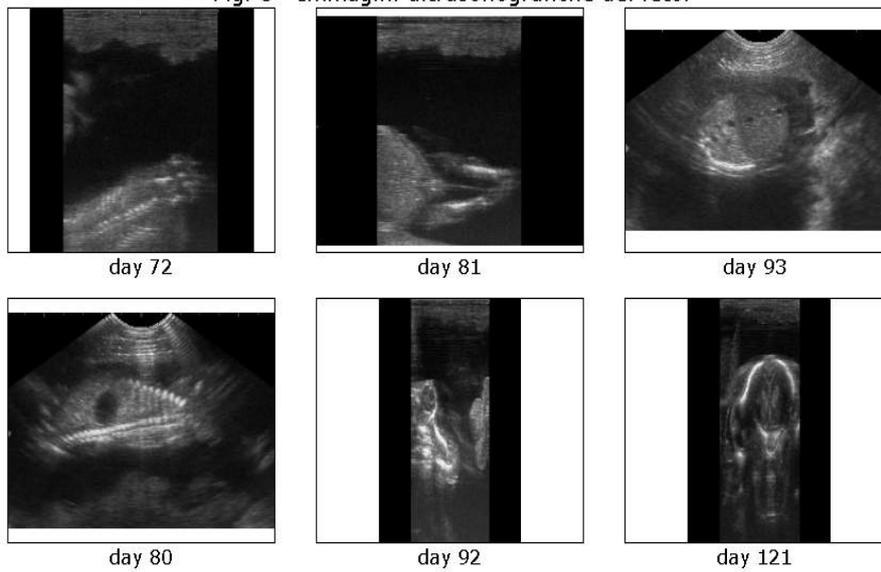


Fig. 9 - Immagini ultrasonografiche del feto.

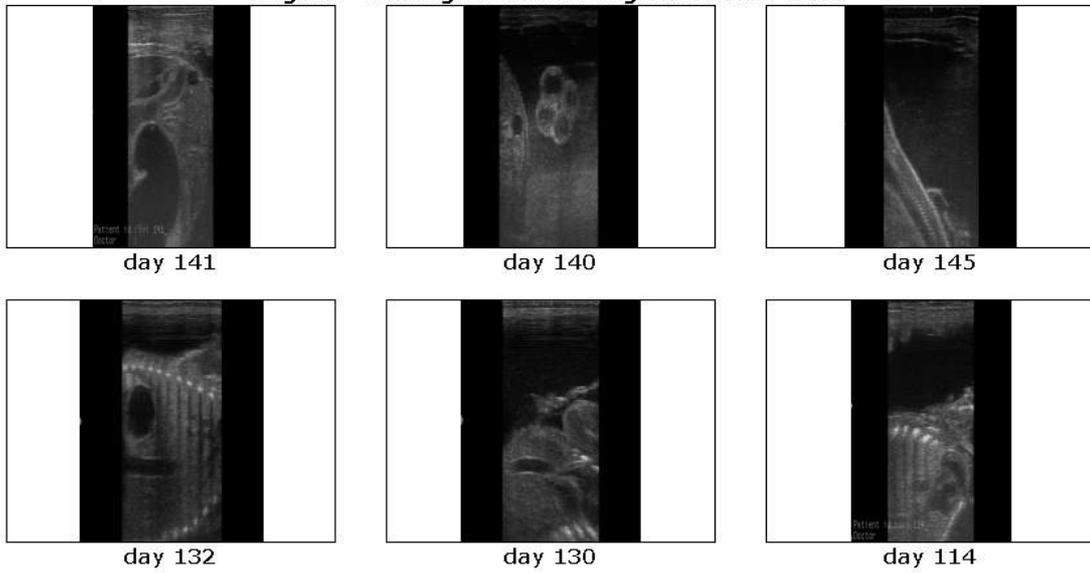


Fig. 10 - Unità Feto Placentare e ecogenicità dei liquidi fetali.

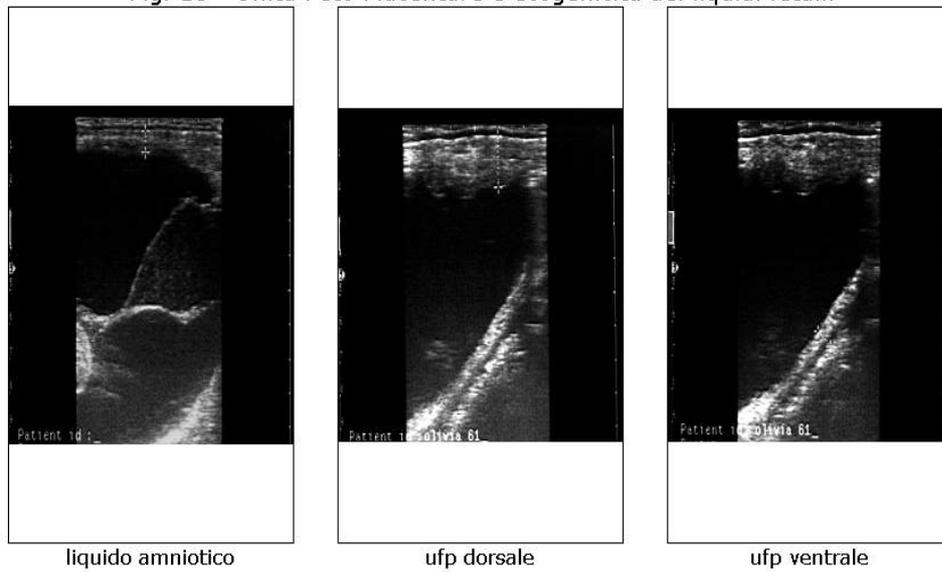


Grafico 1. Mobilità della vescicola embrionale: fissazione nella giunzione utero-cornuale destra (n=8 VE) e sinistra (n=12 VE).

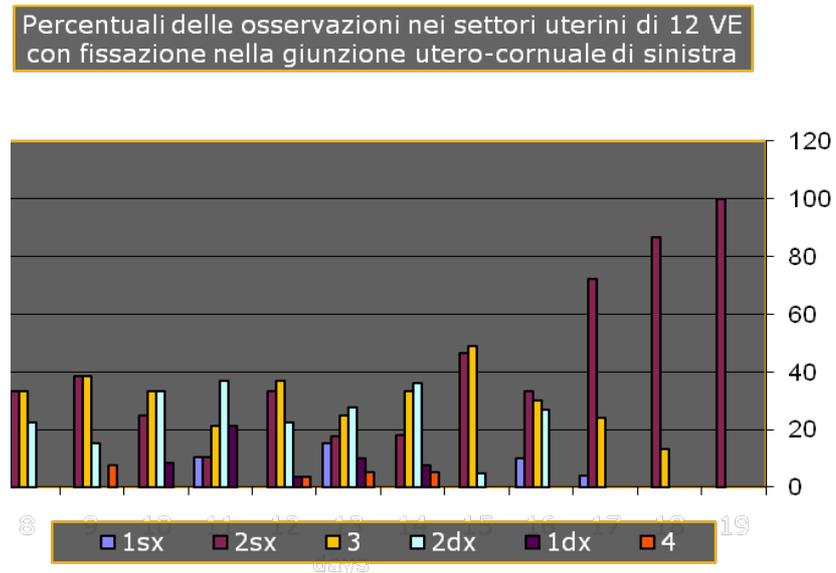
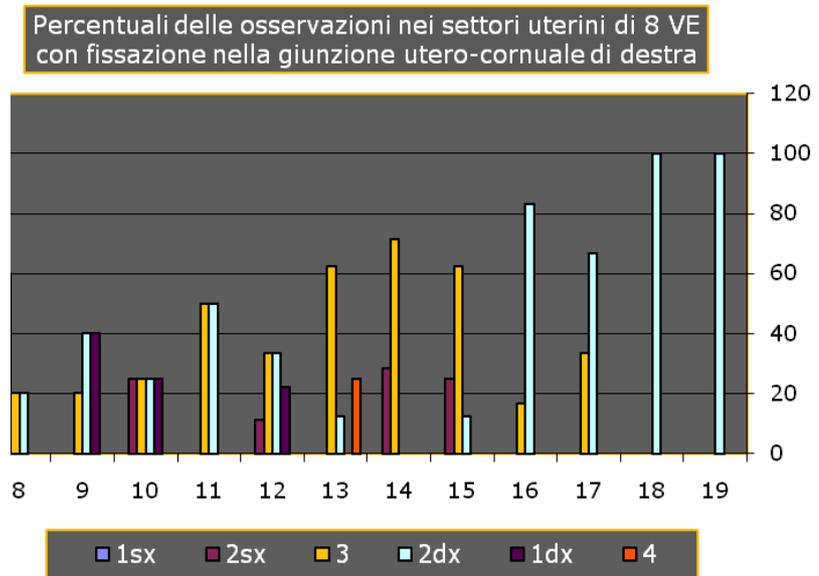


Grafico 2. Diametri medi della vescicola embrionaria di mulo, cavallo e pony (8°-50° giorno di gestazione).

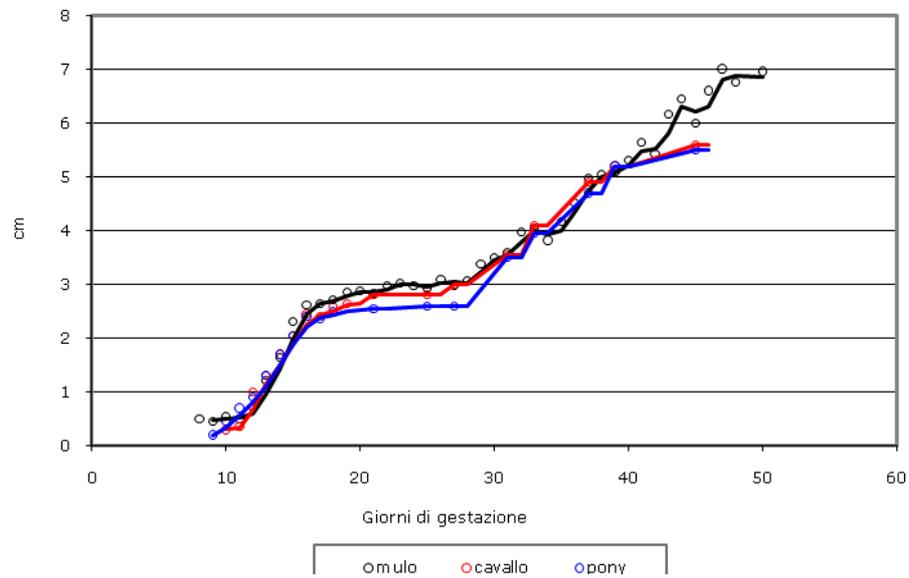


Grafico 3. Diametri medi dell'embrione di mulo.

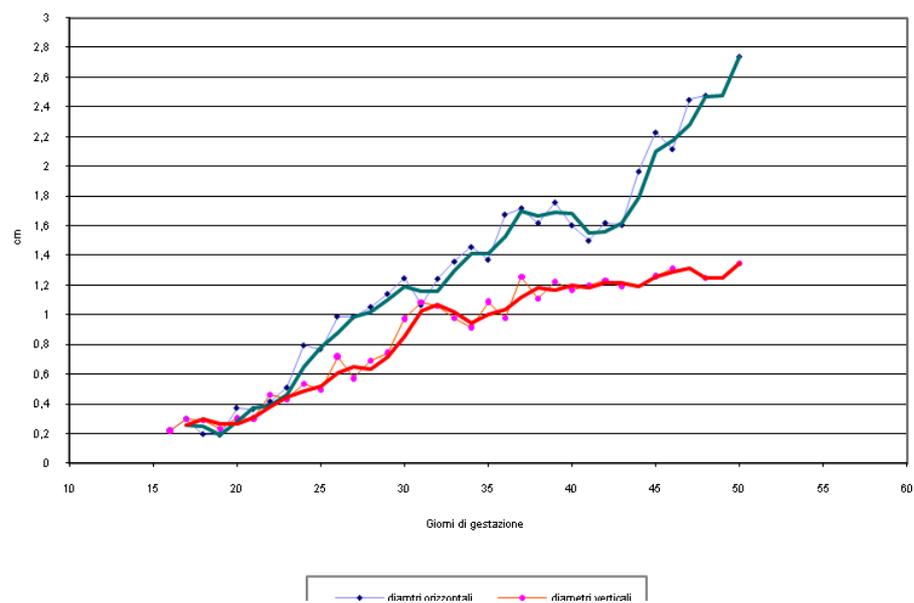


Grafico 4. Unità Feto-Placentare dorsale e ventrale (2°-12° mese di gestazione).

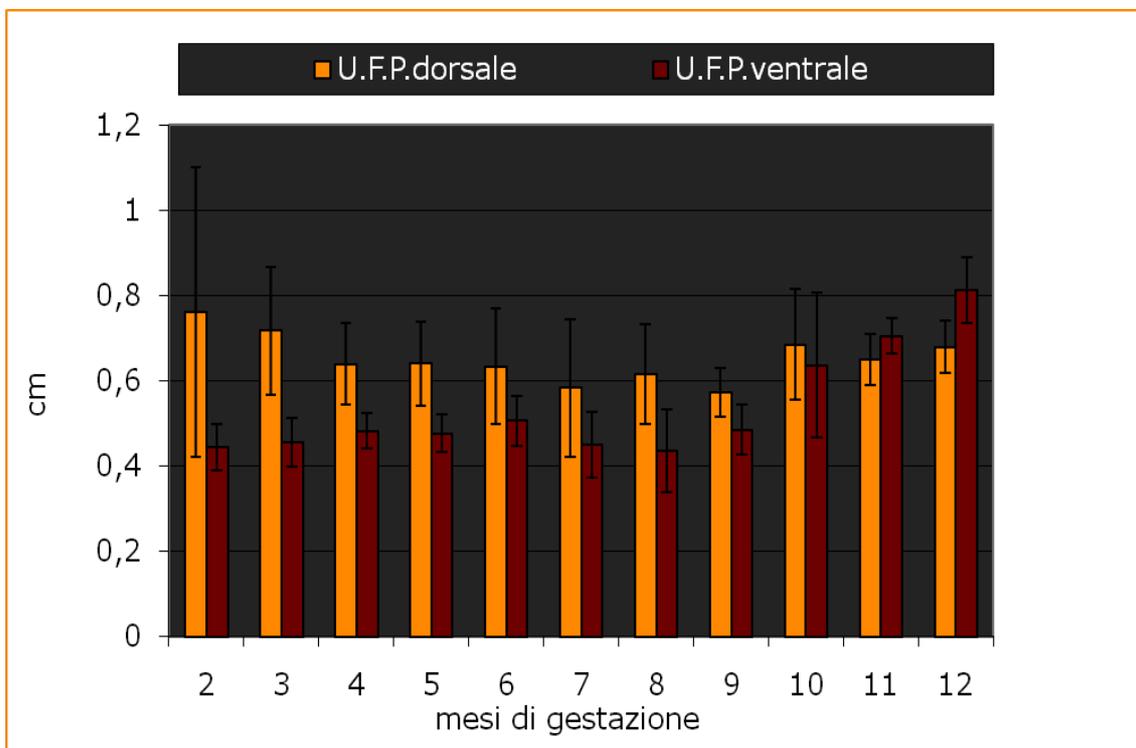


Tabella 1: JAUNDICED FOAL AGGLUTINATION TEST (JFA)

Materials:
1. Centrifuge capable of centrifuging blood types at moderate speeds (300 x 600 x g)
2. Test tubes, either 13- x 100 mm disposable tubes or blood collection tubes.
3. Test tube rack.
4. Pasteur pipettes and rubber bulbs or other pipette system to deliver 1.0-ml volumes.
5. Room temperature 0.9% NaCl
6. Colostrum from mare.
7. Presuckle blood from the foal, preferably in EDTA anticoagulant.
8. Blood from the mare, preferably in EDTA anticoagulant, can be used for a control.
Methods:
1. Add approximately 1 ml of 0.9% NaCl to each of 8 tubes.
2. Label the first tube SALINE CONTROL.
3. In the remaining 7 tubes, prepare serial dilutions (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128) of the colostrum by adding 1 ml of colostrum to the tube labeled 1:2, then transferring 1 ml of the mixture to the second tube labeled 1:4, and so on until reaching the tube labeled 1:128. Discard 1 ml from the tube labeled 1:128 so that the total volume in each tube is approximately 1 ml.
4. Add one drop of the foal's whole blood to each tube and mix the samples.
5. Centrifuge the tubes for 2 to 3 minutes at medium speed (300-500 x g).
6. Invert each tube, one at a time, pouring out the liquid contents; observe the status of the button of the red cells at the bottom of the tube.

Tabella 2. Medie \pm ds delle caratteristiche quali-quantitative del seme (C, concentrazione spermatica media annuale; MT, motilità totale media annuale; MP, Motilità progressiva media annuale).

<u>C (x 10⁶ spz/ml)</u>	114.40 \pm 52.22
<u>MT (%)</u>	94.34 \pm 4.10
<u>MP (%)</u>	68.88 \pm 4.63
<u>Spermatozoi normali</u>	85.04 \pm 10.26
<u>Goccia prossimale</u>	0.10 \pm 0.26
<u>Goccia distale</u>	0.17 \pm 0.38
<u>Anomalie Tratto Intermedio</u>	4.16 \pm 3.84
<u>Teste staccate normali</u>	2.33 \pm 1.22
<u>Anomalie testa</u>	3.2 \pm 0.62
<u>Coda piegata</u>	2.92 \pm 2.16
<u>Forme D.A.G.</u>	0.23 \pm 0.44
<u>Acromosoma danneggiato</u>	6.47 \pm 5.29

Tabella 3. Percentuale di spermatozoi mobili e progressivi all'ora 24, 48 e 72 (media \pm ds) (MT, motilità totale; MP motilità progressiva).

Ore	MT	MP
24	92.75 \pm 7.05	94.4 \pm 10.84
48	89.34 \pm 10.34	84.52 \pm 16.95
72	87.01 \pm 11.5	78.21 \pm 16.02

Tabella 4. Osservazioni della frequenza cardiaca fetale (FC) durante le fasi di attività e riposo del feto.

Mese di gestazione	FC	range		FC	range	
	Attività	max	min	Riposo	max	min
2°	208 \pm 19,4	238	186	189,8 \pm 13,7	208	196
3°	186 \pm 13,3	191	172	169,9 \pm 11	186	169
4°	153,2 \pm 9,2	165	149	148 \pm 15,4	148	127
5°	140 \pm 8,8	153	132	124,4 \pm 7,3	133	113
6°	128 \pm 13,7	142	112	112,8 \pm 11,3	118	103
7°	143,2 \pm 19,3	178	118	116 \pm 12,1	112	95
8°	127,3 \pm 9,7	149	113	104,7 \pm 8,9	115	89
9°	104 \pm 11,2	138	104	92,1 \pm 13,3	104	79
10°	109 \pm 14,7	133	98	84,4 \pm 8,6	98	82
11°	92,3 \pm 7,4	127	87	72,6 \pm 7	85	66
12°	85,9 \pm 11,8	105	70	66,1 \pm 4,6	72	58

Tabella 5. Misurazioni dell'orbita oculare del feto (3°-11° mese di gestazione).

Mese	3°	4°	5°	6°	7°	8°	9°	10°	11°
Volume medio (cm)	1.35 ±0.3	2.99 ±0.4	4.16 ±0.6	4.18 ±0.3	4.82 ±0.5	5.01 ±0.2	5.57 ±0.2	5.86 ±0.3	6.24 ±0.5
Area (cm ²)	0.66 ±0.3	2.25 ±0.5	3.18 ±0.8	3.44 ±0.4	4.83 ±0.7	5.61 ±0.4	6.19 ±0.4	7.84 ±0.5	9.62 ±0.6
Circonferenza (cm)	2.82 ±0.6	4.89 ±0.8	6.14 ±0.8	6.64 ±0.4	7.5± 0.7	8.42 ±0.8	8.94 ±0.7	9.13 ±0.5	10.9 ±0.4

Tabella 6. Media e deviazione standard delle osservazioni del diametro aortico fetale dal 5° mese di gestazione al termine.

Mese di gestazione	Media	ds
5°	4,23	1,69
6°	8,66	2,53
7°	10,11	1,93
8°	13,23	1,44
9°	14,56	2,01
10°	17,19	1,89
11°	21,78	1,17
12°	25,92	0,98

Tabella 7. Media e deviazione standard della frequenza del polso periferico a livello delle carotideo durante i mesi di gestazione al termine.

	Mese di gestazione						
	6	7	8	9	10	11	12
Media	112,8	106,4	103,1	91,3	82,6	72,8	66,9
ds	7,3	6,5	8,7	8,1	6,7	7,9	6,3

Tabella 8. L'APGAR Score System (Knottenbelt D.C. 2004).

Parametro	0	1	2
Mucose e TRC	Cianotiche	Pallide	Rosee
Frequenza cardiaca	Assente	<60	>60
Frequenza respiratoria	Assente	Lenta Irregolare	40- 60bpm Regolare
Tono muscolare	Decubito laterale	Tono muscolare	Decubito sternale
Risposta a stimolo nasale	Nessuna	Debole reazione starnuto	Tosse

BIBLIOGRAFIA

Allen W.E. (1986). Two cases of abnormal equine pregnancy associated with excess fetal fluid. *Equine Vet. J.* 18:220-2.

Adams-Brendemuhel C. e Pipers F.S. (1987). Antepartum evaluations of the equine fetus. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 35: 565-573.

Adams-Brendemuhel C. (1990). Fetal assessment. In: *Equine Clinical Neonatology*. Eds: Koterba AM, Drummond WH, Kosch PC. Lea and Febiger, Philadelphia.

Bailey E., Conboy HS, Mccarthy Pf. Neonatal isoerythrolysis of foals: and update on testing. *Proc 33rd Annu Conv Am Assoc Equine Pract*, 1987. pp 341-353

Bailey E, Albright DG, Henney PJ. (1988) Equine neonatal isoerythrolysis: evidence for prevention by maternal antibodies to the Ca blood group antigen. *Am J Vet Res* 1988; 49(8):1218-1222.

Bessent C. e Ginther O.J. (1988). Comparison of early *conceptus* mobility between mares and jennies. *Theriogenology* 29:913-920.

Boeta M. e Zarco L. (2005). Progesterone and Equine Chorionic Gonadotropin concentration around the time of pregnancy loss in mare impregnated by donkeys or stallions. *J. Equine Vet. Sci.* 25: 531-538.

Bowling, A.T. and Clark, R.S. (1985) Blood group and protein polymorphism gene frequencies for seven breeds of horse in U.S.A. *Anim. Blood Groups Biochem. Genet.* 16, 93-108.

Brehm A. E. (1881). La vita degli animali. Biblioteca Comunale Augusta di Perugia.

Brendemuehl J.P., Boosinger T.R., Bransby D.I., et al. (1995). Effects of short-term exposure to and removal from the fescue endophyte *Acremonium coenophialum* at 300 days of gestation on pregnant mares and foal viability. Biol Reprod Monograph Series 1: Equine Reprod. VI, pp. 61-67.

Bucca S. (2005). Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. Theriogenology 64:568-571.

Bucca S. (2001). Valutazione dello stato di salute della gravidanza equina. Il Progresso Veterinario 2-4.

Bucca S., Fogarty U., Collins A., Small M. (2005). Assessment of feto-placental well-being in the mare from mid-gestation to term: tranrectal and transabdominal ultrasonographic features. Theriogenology 64: 542-557.

Bucca S., Carli A., Fogarty U. (2007). How to assess equine fetal viability by transrectal ultrasound evaluation of fetal peripheral pulses. AAEP Proceedings 53: 1-5

Camillo F., Vannozzi I., Rota A., Di Luzio B., Romagnoli S., Aria G., Allen W.R. (2003). Successful non-surgical transfer of horse embryos to mule recipients. Reprod. Domest. Anim. 38(5):380-5.

Carluccio A., Villani M., Contri A., Tosi U., Batocchio M., (2004). "Studio preliminare su alcune caratteristiche seminali e morfometriche testicolari dello stallone asinino di Martina Franca". Ippologia 15 (4): 23-26.

Cherchi R., Cossu I., (2001). "Esperienze preliminari di seminologia nelle razze asinine: asino sardo e asino dell'Asinara". Atti del 7° Congresso Nazionale SIVE. Pp. 302-303.

Colles C.M., Parkers R.D., May C.J. (1978). Fetal electrocardiography in the mare. *Equine Veterinary Journal* 10: 32-37.

Curran S. (1992). Diagnosis of fetal gender by ultrasonography. Robinson ED eds. *Current Therapy in Equine Medicine*. 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders Co, pp. 660-664.

Curran S. e Ginther O.J. (1989). Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. *Equine Veterinary Science* 9: 77-83.

Curran S. e Ginther O.J. (1995). M-mode ultrasonic assessment of equine fetal heart rate. *Theriogenology* 44: 609-617.

David BJ, Byars DT, Braniecki A, Chaffin MK, Storts RW. Kernicterus in a foal with neonatal isoerythrolysis. *Comp Cont Edu* 1998; 517-522.

Demarchi G. (1883). Il mulo. Biblioteca Comunale Augusta di Perugia.

Deter R.L., Harrist R.B., Hadlock F.P., Carpenter R.J. (1981). The use of ultrasound in the assessment of normal fetal growth: a review. *Journal of Clinical Ultrasound* 9: 481-493.

Dowsett K.F., Pattie W.A., (1982). "Characteristics and fertility of stallion semen". *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 32: 1-8.

Durham AE. Failure of the indirect anti-globulin test to predict a case of neonatal isoerythrolysis. *Equine Vet Edu* 1997; 9(3):115-117.

Gandini G.C., Villa E., (2003). "Analysis of the cultural value of livestockbreeds: a methodology." J. Anim. Breed. Genet. 120: 1-11.

Gastal E.L., Santos G.F., Henry M., Piedade H.M. (1993). Embryonic and foetal development in donkeys. Equine Vet. J., Suppl. 15: 10-13.

Gastal M.O., Henry M., Beker A.R., Gastal E.L., (1997). "Effect of ejaculatory frequency and season on donkey jacks semen". Theriogenology 47: 627-638.

Giles R.C., Donahue J.M., Hong C.B., Tuttle P.A., Petrites-Murphy M.B., Poonacha K.B., Roberts A.W., Tramontin R.R., Smith B., Swerczek T.W. (1986-1993). Causes of abortion, stillbirth, and perinatal death in horses: 3527 cases. Journal of American Veterinary Medicine Association 203: 1170-1175.

Ginther O.J. (1995). Ultrasonic imaging and animal reproduction, book 2: Horses, Equiservices Publishing, Cross Plains (WI).

Ginther O.J. (1992). Ultrasonic imaging and animal reproduction, book 1: Fundamentals, Equiservices Publishing, Cross Plains (WI).

Ginther O.J. (1986). Ultrasonic Imaging and Reproductive Events in the Mare. Cross Plains, Wisconsin: Equioservices.

Ginther O.J. (1992). Reproductive Biology of the Mare: Basic and Applied Aspects, 2nd ed. Cross Plains, Wisconsin: Equioservices.

Hellman L.M., Kobayashi M., Fillisti L., Leavenhar M., Cromb E. (1969). Growth and development of the human fetus prior to the twentieth week of gestation. American Journal of Obstetrics and Gynecology 103: 789-800.

Hyland J. e Jeffcott L.B. (1987). Abortion. In: Robinson ED (ed), Current Therapy in Equine Medicine. Philadelphia: WB Saunders Co, pp. 520-525.

Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H., (1991)a. "The repeatability and effect of season on seminal and computer-aided sperm analysis in the stallion". Theriogenology 35: 127-133.

Jasko D.J., Lein D.H., Foote R.H., (1991)b. "Stallion spermatozoa morphology and its relationship to spermatozoal motility and fertility". Proceedings of the Am. Ass. Eq. Pract. Pp. 211-223.

Juhasz J., Nagy P., Kulcsar M., Huszenicza G.Y., (2000). "Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review". Acta Vet. Brno 69: 247-259.

Kahn W. e Leidl W. (1987). Die ultraschall-biometrie von pferdefeten *in utero* und die sonographische darstellung ihrer orange. Deutsche Tierarztliche Wochenschrift 94 : 497-540.

Knottenbelt, D.C., Holdstock, N., Madigan, J.E. (2004). Equine Neonatology Medicine and Surgery. Saunders eds.

Leopold G.R. (1986). Obstetrical ultrasound examination guidelines. Journal of Ultrasound in Medicine 5: 241.

Long P.L., Pickett B.W., Sawyer H.R., Shideler R.K., Amann R.P., Squires E.L., (1993). "Relationship between morphologic and seminal characteristics of equine spermatozoa". Eq. Vet. Sc. 13 (3): 143-149.

MacLeay JM. Neonatal isoerythrolysis involving the Qc and Db antigens in a foal. J Am Vet Med Assoc 2001; 219(1):79-81.

Maijala K. et al., (1984). "Conservation of animal genetic resources in Europe.Final report for an EAAP Working Party". Livest. Prod. Sci. 11: 3-22.

Mann T., Minotakis C.S., Polge C., (1963). "Semen composition and metabolism in the stallion and jackass". J. Reprod. Fertil. 5: 109-122.

Manning F.A., Platt L.D., Sipos L. (1980). Antepartum fetal evaluation: Development of a fetal biophysical profile. American Journal of Obstetrics and Gynecology 136: 787-795.

Manning F.A., Hill L.M., Platt L.D. (1981). Qualitative amniotic fluid volume determination by ultrasound: Antepartum detection of intrauterine growth retardation. American Journal of Obstetrics and Gynecology 139: 254-258.

Manning F.A., Morrison L., Lange I.R., Harman C.R., Chamberlain P.F. (1985). Fetal assessment based on fetal biophysical profile scoring: Experience in 12620 referred high-risk pregnancies. I. Perinatal mortality by frequency and etiology. American Journal of Obstetrics and Gynecology 151: 343-350.

Manning F.A., Morrison L., Lange I.R., Harman C.R., Menticoglou S. (1987). Fetal assessment based on fetal biophysical profile scoring: Experience in 19221 referred high-risk pregnancies. II. An analysis of false-negative fetal deaths. American Journal of Obstetrics and Gynecology 157: 880-884.

Manning F.A., Harman C.R., Menticoglou S., Morrison. (1991). Assessment of fetal well-being with ultrasound. Obstetrics and Gynecology 18: 891-905.

McClure J, Parrish S. Diseases caused by allogenic incompatibilities. Neonatal isoerythrolysis. In: Smith, B ed. Large animal internal medicine, 2nd ed. St. Louis: Mosby, 1995; 1867-1873.

McClure, J. Strategies for prevention of neonatal isoerythrolysis in horses and mules. Equine Vet Edu 1997; 9(3):118-122.

McClure J, Koch C, Traub-Dargatz J. Characterization of a red blood cell antigen in donkeys and mules associated with neonatal isoerythrolysis. Anim Genet 1994; 25:119-120.

McGladdery A.J. (1999). Ultrasonographic diagnosis and management of fetal abnormality in the mare in late pregnancy. Pferdeheilkunde 15: 618-621.

McKinnon A.O., Squires E.L., Pickett B.W. (1988). Growth and development of the normal fetus. Equine Reproductive Ultrasonography Animal Reproduction Laboratory Bulletin 4: 11-20.

McKinnon A.O., Squires E.L., Pickett B.W. (1988). Uterine pathology. Equine Reproductive Ultrasonography Animal Reproduction Laboratory Bulletin 4: 31-40.

McKinnon A.O. e Voss J.L. (1993). Equine Reproduction. Malvern, Philadelphia: Lea and Febiger.

Meira C., Ferreira J.C.P., Papa F.O., Henry M. (1998). Ultrasonographic evaluation of the conceptus from days 10 to 60 of pregnancy in jennies. Theriogenology 49:1475-1482.

Mello S.L.V., Henry M., Souza M.C., Oliveira S.M.P., (2000). "Effect of split ejaculation on longevity of donkey semen preserved at 5° C". Arq. Bras. Med. Vet. Zootec. 52 (4): 372-378.

Miró J., Lobo V., Quintero-Moreno A., Medrano A., Pena A., Rigau T., (2005). "Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen". *Theriogenology* 63: 1706-1716.

Morais R.N., (1990). "Contribucao ao estudo da biologia reprodutiva de jumentos (*Equus asinus*)". MS Thesis, San Paulo SP, USP.

Nishikawa Y., Waide Y., Onuma H., (1951). "Studies on Nat. Inst. Agric. Sci. Ser. G, 1:15.

O'Brien G.D., Queenan J.T., Campbell S. (1981). Assessment of gestational age in the second trimester by real time ultrasound measurement of the femur length. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 139: 540-545.

Ostermann O.P., (1998). "The need for management of nature conservation sites designated under Natura 2000". *J. Appl. Ecol.* 35: 968-973.

Otto C. e Platt L.D. (1991). Fetal growth and development. *Obstetrics and Gynecology Clinics of North America* 18: 907-931.

Ousey J. e McGladdery A. (2000). Clinical diagnosis and treatment of problems in the late pregnant mare. In *Practice*.

Parlevliet J.M., Kemp B., Colenbrander B.C., (1994). "Reproductive characteristics and semen quality in maiden Dutch Warmblood stallion". *J. Reprod. Fertil.* 101: 183-187.

Pickett B.W., (1993)b. "Reproductive evaluation of the stallion", in McKinnon A.O., Voss J.L., *Equine Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia. Pp. 755.

Pipers F.S. e Adams-Brendemuehl C.S. (1984). Techniques and applications of transabdominal ultrasonography in the pregnant mare. Journal of American Veterinary Medicine Association 185: 766-771.

Platt H. (1984). Growth of the equine foetus. Equine Vet. J. 16: 247-252.

Prickett M.E. (1970). Abortion and placental lesions in the mare. Journal of American Veterinary Medicine Association 157: 1465-1470.

Reef V.B., Vaala W.E., Worth L.T., Spencer P.A., Hammett B. (1995). Ultrasonographic evaluation of the fetus and intrauterine environment in healthy mares during late gestation. Veterinary Radiology and Ultrasound 36(6): 533-541.

Reef V.B., Vaala W.E., Worth L.T., Sertich P.L., Spencer P.A. (1996). Ultrasonographic assessment of fetal well-being during late gestation: development of an equine biophysical profile. Equine Veterinary Journal 28(3): 200-208.

Reef V.B. (1998). Equine Diagnostic Ultrasound. WB Saunders Co, Philadelphia.

Renaudin C., Gillis C., Tarantal A. (1997). Transabdominal combined with transrectal Ultrasonographic determination of equine fetal gender during mid-gestation, in Proceedings. 43rd Annual Convention American Association of Equine Practitioners, pp. 252-255.

Renaudin C., Troedsson M.H.T., Gillis C., King V.L., Bodena A. (1997). Ultrasonographic evaluation of the equine placenta by transrectal and transabdominal approach in the normal pregnant mare. Theriogenology 47(2): 559-573.

Renaudin C., Gillis C., Tarantal A. (1999). Transabdominal Ultrasonographic determination of fetal gender in the horse during mid-gestation. *Equine Veterinary Journal* 31: 483-487.

Renaudin C., Troedsson M.H.T., Gillis C. (1999). Transrectal ultrasonographic evaluation of the normal equine placenta. *Equine Veterinary Education* 11(2): 75-76.

Renaudin C., Gillis C., Tarantal A., Coleman A. (2000). Evaluation of equine fetal growth from day 100 of gestation to parturition by ultrasonography. *Journal of Reproduction and Fertility Supplement* 56: 651-660.

Renaudin C., Troedsson M.H.T., Gillis C. (2000). Ecografia placentare per via transrettale. *Veterinaria Pratica Equina* 2: 35-41.

Renaudin C. (2000). Ultrasonographic Determination of Equine Fetal Gender. *Recent Advances in Equine Theriogenology: International Veterinary Information Service.*

Roberts S.J. (1986). Gestation period-embryology, fetal membranes and placenta toxicology. In: Roberts SJ (ed.), *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases, Theriogenology*, Ann Arbor MI: Edwards Brothers Inc, pp. 38-92.

Schifrin B.S., Foye G., Amato J., Kates R., MacKenna J. (1979). Routine fetal heart rate monitoring in the antepartum period. *Obstetrics and Gynecology* 54: 21-25.

Schlafer DH. The equine placenta before and after birth: recognition of normal features and appreciation of lesions of clinical importance. In: *Proceedings of the Mare Reproductive Symposium, American College of Theriogenologists and the Society for Theriogenology.* Kansas City, MO, 1996; 122-137.

Serres C., Rodríguez A., Álvarez A.L., Santiago I., Gabriel J., Gómez-Cuétara C., Mateo E., (2002). "Effect of centrifugation and temperature on the motility and plasma membrane integrity of Zamorano-Leonés donkey semen". *Theriogenology* 58: 329-332.

Sertich P.L. (1993). Clinical anatomy and evaluation of equine fetal membranes. In: *Proceedings of Society of Theriogenology*, pp. 178-184.

Taylor, M.J., and Short, R.V.: Development of the germ cells in the ovary of the mule and hinny. *J. Reprod. Fertil.*, 32: 441-445, 1973.

Thomson , A., Contreras, M., Gorik, B., Kumpel, B., Chapman,G.E., Lane, R., Teesdale, P., Hughes-Jones, N.C., Molison, P.L.(1990) Clearance of Rh D-positive red cells with monoclonal anti-D. *Lancet* 336, 1147-1150.

Traub-Dargatz JL, McClure J, Kock C, et al. Neonatal isoerythrolysis in mule foals. *JAVMA* 1995; 206:67-70.

Troedsson M.H.T. e Sage A.M. (2001). Fetal/Placental Evaluation in the Mare. *Recent Advances in Equine Reproduction: International Veterinary Information Service.*

Vaala W.E. e Sertich P.L. (1994). Management strategies for mares at risk for periparturient complications. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice* 10: 237-265.

Vaala WE. Neonatal anemia. In: Koterba A, Drummond W, Kosch P, eds. *Equine Clinical Neonatology*. Philadelphia: Lea and Febiger, 1990; 571-588.

Vaala W.E. (2002). "Diagnosis and treatment of the abnormal foal" dati personali.

Vaala W.E. (2002). "Prematurity and Dysmaturity: Special Concerns and Prognostic Indicators" dati personali.

Vaala W.E. (2002). "Periparturient problems in mares" dati personali.

Verpoest M.J., Seelen J.C., Westerman C.F. (1976). Changes in the appearance of the amniotic fluid during pregnancy: The macroscore. *J. Perinat. Med.* 4: 12-25.

Vintzileos A.M., Campbell W.A., Ingardia C.J., Nochimson D.J. (1983). The fetal biophysical profile and its predictive value. *Obstetrics and Gynecology* 62: 271-278.

Vintzileos A.M., Fleming A.D., Scorza W.E., Wolf E.J., Balducci J., Campbell W.A., Rodis J.F. (1991). Relationship between fetal biophysical activities and umbilical cord blood gas values. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 165: 707-713.

Whiting J, David JB. Neonatal isoerythrolysis. *Comp Cont Edu* 2000; 22 (10): 968-976.

Woodsdalek, J.E., Causes of sterility in the mule. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole*, 30: 1-56, 1916.

Woods G.L., White K.L., Vanderwall D.K., Li G.P., Aston K.I., Bunch T.D., Meerdo L.N., Pate B.J. (2003). A Mule Cloned from Fetal Cells by Nuclear Transfer. *Science* 29:29.

Yamamoto K., Yasuda J., Too K. (1991). Electrocardiographic findings during parturition and blood gas tensions immediately after birth in Thoroughbred foals. *Jpn. J. vet. Res.* 39: 143-157.

OTTIMIZZAZIONE DELLA GESTIONE DEL PARTO PER IL MIGLIORAMENTO DELLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE NELLA BOVINA DA LATTE

Mentre esistono norme gestionali, chiare e dettagliate, relative alla gestione sia alimentare che sanitaria del periodo di transizione nella bovina da latte, limitate sono le possibilità pratiche di assistenza al momento del travaglio. Nell'organizzazione aziendale della gestione dei parti, le distocie sono affrontate spesso in maniera passiva, in condizioni d'emergenza e con attrezzatura non adeguata durante le ore notturne, nelle quali è scarsa la presenza del personale addetto al controllo della mandria. Una tempestiva e adeguata assistenza al parto è essenziale per assicurare la sopravvivenza del vitello, prevenire la maggior parte delle patologie riproduttive del puerperio, mantenendo quindi elevata la produttività della lattifera, sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo. Diversi studi hanno proposto dei protocolli per determinare l'esatto momento del parto sulla base dell'osservazione: di reperti ecografici (Wright *et al.*, 1988; Aoki *et al.*, 2005), dei cambiamenti nella temperatura corporea (Fujimoto *et al.*, 1988), dell'analisi dei livelli ematici di estrone solfato e del 17- β -estradiolo (Shah *et al.*, 2007), del progesterone (Matsas *et al.*, 1992), del progressivo rilassamento delle strutture legamentose della pelvi (Shah *et al.*, 2006), delle concentrazioni degli elettroliti nelle secrezioni mammarie (Bleul *et al.*, 2006). E' stato condotto uno studio riguardante l'applicazione di un sistema elettronico applicato alle labbra vulvari che, attivato dalla distensione vaginale conseguente all'impegno nel canale del parto degli invogli e del feto, genera una frequenza radio trasmessa ad un commutatore

GSM (Paolucci *et al.* 2008). Le nostre osservazioni preliminari sull'applicazione di questa tecnologia nelle bovine da latte hanno evidenziato che la mortalità neonatale può essere ridotta attraverso la tempestiva e appropriata assistenza ostetrica, con conseguente miglioramento delle performance riproduttive (Paolucci *et al.*, 2009).

Il presente studio è stato condotto da Maggio 2007 a Dicembre 2009 in un allevamento di bovine da latte di razza Frisona Italiana. Per il protocollo di assistenza al parto con l'impiego della tecnologia GSM è stato selezionato un gruppo di 120 bovine, 60 primipare e 60 pluripare.

I gruppi sperimentali sono stati assegnati alla sala parto, il gruppo controllo, rappresentato dal resto della mandria, in assenza di assistenza GSM e ostetrica, è stato mantenuto nel reparto dell'asciutta con lettiera permanente. Dal 280° giorno di gestazione è stata eseguita una visita ostetrica per valutare la presenza e la progressione dei segni premonitori del parto e un esame ecografico con approccio trans-rettale per determinare il benessere fetale. Applicata la trasmittente dell'allarme parto, ogni soggetto è stato condotto nella zona parto che ha previsto 3 box singoli coperti, lettiera in paglia rimossa ad ogni parto. Al momento della ricezione del segnale è stata condotta una visita ostetrica per determinare lo stadio del parto, la presentazione, posizione e atteggiamento del feto, l'integrità delle membrane fetali, il grado di dilatazione cervicale e la dimensione del feto rispetto al diametro della pelvi materna. La progressione del feto durante la fase espulsiva del parto è stata osservata. L'esame clinico e le cure perinatali sono stati condotti nei neonati. Per la valutazione clinica dei vitelli è stato utilizzato il sistema a punteggio APGAR (Knottenbelt *et al.*, 2004). Il parto è stato osservato più frequentemente nelle ore notturne: il 63% e l'80% rispettivamente per le pluripare e per le primipare hanno

partorito tra le 18:00 e le 6:00. Tutti i feti si presentavano in posizione dorso-sacrale; 117 feti in presentazione anteriore (2 gravidanze gemellari) e 5 feti in presentazione longitudinale posteriore. Alla ricezione dell'allarme, il 62,5% dei vitelli si presentava impegnato nel canale parto con le estremità degli arti anteriori visibili oltre la rima vulvare. Il parto è stato suddiviso in 5 gruppi in base alle cause di distocia. Tra le primipare, il 33.3% presentava distocia (il 18.3% per disposizione fetale anomala, l'8.3% per macrosomia fetale e il 6.7% per prolungamento della seconda fase del parto), mentre nelle pluripare si registrava un 23.4% di distocie, tutte di origine fetale, tranne 1.7% di torsioni uterine. E' stata evidenziata una significativa riduzione delle patologie puerperali e neonatali; il punteggio A.P.G.A.R. medio registrato era di 8.5 e non sono stati rilevati casi di mortalità neonatale. Il 17.8% e il 21.3% di perimortalità è stato registrato nel gruppo controllo, rispettivamente per le pluripare e le primipare. L'incidenza delle patologie puerperali è risultata maggiore nel gruppo controllo: il 24.52% delle pluripare e il 40% delle primipare sono risultate affette; nel gruppo sperimentale, il 4.17% ha manifestato sintomi ascrivibili a patologia puerperale, indipendentemente dalla classe di parto. L'incidenza di ritenzione delle membrane fetali nell'intero gruppo controllo è stata del 18.97%, mentre, in tutte le bovine sottoposte a monitoraggio con tecnologia GSM, la fase del secondamento è avvenuta spontaneamente. L'intervallo parto-concepimento è risultato significativamente ridotto sia nelle pluripare (110.4 vs 181.3 gg) che nelle primipare monitorate (108.5 vs 169.51 gg). Gli interventi fecondativi necessari ad ottenere il concepimento sono stati osservati sia nelle pluripare (1.94 vs 3.08) che nelle primipare (2.07 vs 3.1).

L'applicazione della tecnologia GSM, unitamente alla buona gestione della sala parto, risultano essere un affidabile strumento nel

management e nell'assistenza al parto. L'adeguato e tempestivo intervento ostetrico ha consentito la prevenzione delle patologie correlate alle distocie. Ne sono risultate significative riduzioni sia delle infezioni uterine *post partum* che delle perdite perinatali, nonché un netto miglioramento delle performance riproduttive. Gli autori del presente studio stanno attualmente sperimentando dei sistemi alternativi a quelli impiegati che abbiano costi di acquisto, gestione ed applicazione compatibili con l'industria della produzione del latte.

CALVING MANAGEMENT IN ORDER TO IMPROVE REPRODUCTIVE PERFORMANCES IN DAIRY CATTLE

Proper reproductive management of dairy herds is a crucial aspect of the bovine life cycle. In the dairy industry, where the primary revenue source is milk production, calving and newborn management are undervalued as areas of concern. Meyer et al (2001) reported a stillbirth rate of 7.1% in a retrospective study on 666341 calvings, and 50% of this rate was due to both dystocia and unassisted birth (Meyer et al 2001). Dystocia, a prolonged or difficult parturition, is one of the most economically significant secondary yield traits that directly or indirectly affect production (Lombard et al 2007). Many studies on Holsteins have shown that calving difficulty impaired reproductive performance, resulting in more open days, more services per pregnancy, and increase of calving to first breeding interval (Mangurkar et 1984; Dematawewa and Berger 1997). Using the National Association of Animal Breeders dystocia data, Djemali *et al.* (1987) attempted to estimate the effect of dystocia on open days of Holsteins based on a fixed effect model and demonstrated an increased of open days as dystocia became more severe.

The calving management has traditionally been approached in a passive manner. Very few dairy producers incorporate breeding strategies in order to decrease dystocia occurrence, or have calving and newborn management protocols that specifically address the problem. Observation of the cows close to calving and early intervention can help prevent some of the more difficult dystocia and calf deaths. The course of the calving process, especially the duration of the second stage of labor seems to be crucial and monitoring of the birth process is necessary in order to notice the beginning of this stage. Insufficient monitoring around parturition might unnecessarily prolong the birth process, thereby increasing the risk of stillbirth

(Gundelach et al 2009). This first line of defense is important because if the onset of parturition could be predicted early on an individual basis, obstetrics assistance not only prevents calf losses but also protects subsequent fertility dysfunctions such as uterine prolapse, retained fetal membranes and metritis, which occur early in *post partum*. All these disturbances are linked together and may interfere with future production, reproductive efficiency and thereby affecting the economy of the dairy farm.

To improve herd fertility the solution on large dairy farms is to develop calving management strategies. Various protocols have been proposed to determine the exact moment in which calving process begins, and these include ultrasound monitoring (Wright *et al.*, 1988), body temperature changes (Dufty, 1971; Fujimoto *et al.*, 1988; Birgel *et al.*, 1994; Aoki *et al.*, 2005), analyzing blood levels of progesterone (Matsas *et al.*, 1992; Birgel *et al.*, 1994), estrone sulfate and 17- β -estradiol (Shah *et al.*, 2006), controlling the level of relaxation of pelvic ligaments (Shah *et al.*, 2006) and determining the concentration of sodium and inorganic phosphorus present in mammary gland secretions (Bleul *et al.*, 2006). Recently, a proposal was made regarding the use of an electronic system that once attached to the *labia vulvaris*, gets activated by the fetal fluid break, thus, generating a radio-wave frequency that is transmitted to the global system for mobile communications (GSM) (Paolucci et al, 2008). Our preliminary observations on the use of this system in dairy cows showed that calf loss could be reduced through emergency obstetric assistance, thus resulting in an improvement in their reproductive performance (Paolucci et al, 2009).

To our knowledge calving monitoring system by GSM technologies has not been validated in dairy farming industry, therefore, our main objectives were to: *i*) validate calving monitoring system through the use of the GSM system, *ii*) confirm the fact that

this system is able to reduce stillbirth rate, and *iii*) verify whether a large number of *post partum* reproductive pathologies could be prevented through emergency obstetric intervention, thus leading to an improvement of herd fertility.

This study was conducted from May 2007 until December 2009 and was carried out in a Holstein Friesian dairy farm located in central Italy. A total of 120 cows were selected for the protocol of calving assistance using GSM technology, 60 primipara cows and 60 pluripara. Both groups were placed in the calving barn, while the control group was void of GSM assistance and was maintained in the dry zone with permanent litter. On day 280 of gestation, premonitory signs of eminent calving were evaluated. A clinical examination, along with a trans-rectal ultrasound (5 MHz), was performed to determine fetal wellness, condition of fetal membranes, as well as fetal presentation and position. After confirming loosen cervical mucus plug, the transmitter was sutured to the cow vulva. The calving barn consisted of 3 covered lots (4 m x 4 m) and a separate place for the GSM receptor and transmitter emplacement. After setting the alarm, the following parameters were examined: fetal presentation, position, postures, dimension, as well as cervical dilation. Neonatal clinical examination was then carried out using the A.P.G.A.R score system. The reproductive parameters were extrapolated by the dairy management software program, and were expressed in mean \pm sd units and the difference among the various groups was evaluated using student's *t* test ($P < 0,01$). Calving was observed 36 ± 8 h after the application of GSM device, mainly in the night time.

Delivery occurred mainly at night and in particular, from 18:00 to 6:00, in cow 63% and in heifers 80%. All calving occurred with dorsum-sacral position, 117 fetuses in anterior presentation (2 cases of twins) and 5 foetus in caudal presentation.

After setting the alarm, 62.5% of the fetuses presented with their front limbs already out of the vulvar outlet. A calving score was based on the reason of dystocia. Among the primipara cows, 33.3% presented dystocia (18.3% for abnormal postures, 8.3% for fetal macrosomy and 6.7% for delay of 2nd stage of labour), whereas in the pluripara group 23.4% presented dystocia, all of fetal origin but 1.7% of uterine torsion. The mean A.P.G.A.R score was 8.5. Furthermore, there was a significant reduction in both puerperal and neonatal pathologies, both in the primipara and pluripara groups. In the control group, both pluripara and primipara cows presented 17.8% and 21.3% of stillbirth, respectively, while the experimental group did not present any occurrence of stillbirth. Rate of puerperal abnormalities were higher in the control group, with 24.52% of pluripara and 40% of primipara cows being affected by post-partum pathologies, compared to the monitored group with only a 4.17% of the cows affected. Incidence of fetal membranes retention in the control group was 18.97%; conversely, in the monitored group, fetal membranes expulsion occurred spontaneously. Calving to conception interval reduced significantly in the monitored group both for pluripara and primipara cows compared to control group, 110.4 *versus* 181.3 days and 108.5 *versus* 169.51 days respectively. The same trend was observed for the mean number of insemination per conception in the two groups both for the primipara (2.07 *versus* 3.1) and the pluripara cows (1.94 *versus* 3.08). The application of GSM technology, along with good management of the calving barn, proved to be a reliable tool in dairy cows calving management and assistance. The results demonstrated that adequate and ready obstetric intervention allows the prevention of various pathologies connected to stillbirth, such as post partum uterine infections and reduced perinatal deaths, as well as a clear improvement in reproductive performance. In spite of the less number of clinical

observations, we can affirm that such results are definitely encouraging. However, the main disadvantage of this procedure is related to its high cost rates in term of purchase, maintenance and installation. The authors of this article are testing alternative systems that require lower cost rates in terms of purchase, installation, and maintenance for the milk industry.

INTRODUZIONE

L'allevamento della bovina da latte, per contrastare le attuali difficoltà economiche, sta subendo, in tutto il mondo, un'evoluzione continua che vede una riduzione del numero d'impres e un aumento dei capi allevati. Al fine di aumentare la produttività dell'azienda, come dimostrato dal rapporto dell'Osservatorio del latte ISMEA e dai Bollettini AIA del 2004, gli allevatori hanno adottato nuove strategie manageriali quali la stabulazione libera con poste non fisse e nuove tecniche di riproduzione, di mungitura robotizzata e di raccolta delle messi destinate agli animali. Un allevamento di oltre 200 capi in lattazione si trova a gestire delle problematiche quantitativamente e qualitativamente spesso diverse da unità produttive di dimensioni inferiori. Il concetto di soggetto "ammalato" diviene così relativo in un allevamento moderno. "Ammalato", e quindi bisognoso di attenzioni sanitarie, è quel soggetto che mal si adatta alle prestazioni richieste dall'allevatore per giustificare, con la sua redditività, la presenza in allevamento. Le bovine allevate per la produzione lattifera sono animali a cui è richiesta una prestazione metabolica spesso "sconcertante" ed ineludibile. Mentre esistono norme gestionali chiare e dettagliate relative alla gestione alimentare e sanitaria del periodo di transizione della bovina da latte, scarse sono le possibilità pratiche di assistenza al parto vero e proprio. Nell'allevamento della bovina da latte, dove la principale risorsa economica è rappresentata dalla produzione latte, il management del momento del parto e del vitello neonato sono tuttora elementi sottovalutati. Raramente l'organizzazione aziendale della gestione dei parti prevede strategie per l'assistenza ostetrica, specialmente durante le ore notturne (± 12 ore), nelle quali è scarsa la presenza del personale addetto al controllo della mandria. Nell'allevamento della bovina da latte, le

anomalie nell'espletamento del parto (distocie) sono comunemente osservabili, soprattutto nelle primipare, e il momento del parto è affrontato spesso in maniera passiva; tuttavia il suo monitoraggio si rivela essere una fase cruciale, specialmente se ci si riferisce alla durata del secondo stadio del parto. Un controllo insufficiente potrebbe causare un prolungamento nello svolgimento del parto, aumentando così il rischio di perimortalità neonatale (Gundelach *et al.* 2009).

Una tempestiva e adeguata assistenza al parto è essenziale per prevenire la maggior parte delle patologie riproduttive del puerperio, per mantenere elevata la produttività della lattifera sia da un punto di vista qualitativo che quantitativo, nonché per incrementare le probabilità di sopravvivenza del vitello. A corroborare questo concetto è l'inserimento, da parte di molte Associazioni di Razza, della "facilità al parto" tra gli indici genetici da selezionare, viste le sostanziali ripercussioni economiche che hanno tali momenti della vita riproduttiva della bovina. Sulla base dell'incidenza media della perimortalità neonatale nelle bovine da latte, è stato dimostrato che su 666.341 parti, la mortalità entro le 48 ore post-partum ammontava al 7,1%, di cui il 50% era direttamente correlato a fenomeni di distocia e a parti non assistiti (Meyer *et al.* 2001). La distocia è uno degli aspetti economicamente più rilevanti che influiscono sulle produzioni (Lombard *et al.* 2007). Molti studi condotti su bovine di razza Frisona hanno dimostrato che le difficoltà al parto pregiudicano le performance riproduttive con conseguente allungamento del periodo d'interparto, del parto-concepimento e con l'aumento degli interventi fecondativi per concepimento (Mangurkar *et al.* 1984; Dematawewa and Berger 1997). Djemali (1987) ha dimostrato che l'allungamento del periodo d'interparto è correlato alla gravità della distocia. Grandi aziende hanno investito nello sviluppare programmi di management dei parti per implementare la fertilità

delle loro stalle, tuttavia senza raggiungere livelli di efficacia. Diversi studi hanno proposto dei protocolli per determinare l'esatto momento del parto sulla base dell'osservazione di reperti ecografici (Wright *et al.*, 1988), dei cambiamenti nella temperatura corporea (Fujimoto *et al.*, 1988; Aoki *et al.*, 2005), dell'analisi dei livelli ematici dell'estrone solfato e del 17- β -estradiolo (Shah *et al.*, 2007), del progesterone (Matsas *et al.*, 1992), del progressivo rilassamento delle strutture legamentose della pelvi (Dufty *et al.* 1971), nonché delle concentrazioni degli elettroliti nelle secrezioni mammarie (Bleul *et al.*, 2006). I suddetti studi presentano alcuni inconvenienti che ne ostacolano la diffusione nella pratica, richiedendo l'intervento di personale altamente specializzato, l'impiego di attrezzature onerose, monitoraggi frequenti con prelievi di fluidi biologici e successive determinazioni analitiche che assoggettano l'allevatore a costi di gestione sproporzionati alle esigenze pratiche. Sin dalla fine degli anni '70, per l'importanza e le problematiche osservate nel management riproduttivo della specie equina, sono stati studiati e introdotti diversi sistemi di allarme in grado di segnalare l'appropinquarsi del parto. Questi si basano, essenzialmente, su due sistemi di rilevazione dell'evento: uno prevede dei sensori di posizione, posti sul dorso o fra le branche mandibolari, che rilevano il momento in cui la cavalla si pone in decubito per partorire; l'altro prevede la sutura di due contatti magnetici a livello delle labbra vulvari che, in seguito alla distensione vaginale conseguente all'impegno nel canale del parto del feto e degli invogli fetali, si separano, attivando il sistema sonoro di allarme durante la fase espulsiva del parto. I suddetti allarmi sono stati successivamente implementati con la tecnologia Global System for Mobile Communications (GSM) permettendo il ricevimento del segnale tramite telefonia mobile all'addetto della sorveglianza. È stato recentemente impiegato un sistema di allarme parto combinato alla

tecnologia GSM nella bovina da latte, con l'obiettivo di ridurre l'incidenza delle più comuni patologie del *post-partum*, quali l'endometrite subclinica e la ritenzione di membrane fetali, e della natimortalità, il cui fattore predisponente comune è rappresentato dalle distocie e dalla scarsa igiene dei ricoveri destinati al parto e del materiale ostetrico (Risco *et al.* 2005). Fornire assistenza ostetrica tempestivamente alla fattrice si è rivelato necessario al fine di mantenerne l'efficienza riproduttiva e per ridurre le perdite perinatali. L'ottimizzazione del management della fase di transizione, del parto e del *post-partum* mediante l'intervento ostetrico adeguato, l'igiene del parto, nonché l'ottimizzazione delle immunità delle bovine nel periodo di transizione, riduce le patologie riproduttive e consente il miglioramento delle performance produttive. Le nostre osservazioni preliminari sull'uso di questo sistema nelle bovine da latte hanno evidenziato che la mortalità neonatale può essere ridotta attraverso la tempestiva e appropriata assistenza ostetrica, con conseguente miglioramento delle performance riproduttive (Paolucci *et al.*, 2009).

IL PARTO EUTOCICO

Un parto si definisce eutocico, quando nella madre l'apertura del canale del parto e l'espulsione del feto avvengono senza pericolo per la vita di entrambi, senza lacerazioni e con dolori sopportabili. Nei primi studi sulla dinamica del parto eutocico vennero basate le osservazioni sui rapporti anatomici tra il canale del parto e il feto, derivandone le basi diagnostiche per la prevenzione delle distocie. La scoperta degli ormoni, che regolano la riproduzione, introdusse in Ostetricia il concetto della regolazione endocrina. Tale concetto, dimostrata l'importanza del sistema nervoso per la sintesi e la liberazione ormonale, fu esteso alla teoria sulla regolazione neuroendocrina del parto.

Segni premonitori del parto

Negli animali da reddito il momento del parto normalmente è stimabile sulla base della data del concepimento e della durata media della gestazione. Nella bovina nelle settimane antecedenti il parto sono osservabili il rilassamento dei legamenti sacro-ischiatici e sacro-iliaci della pelvi materna. Modificazioni progressive intervengono anche a carico della cervice e del tappo mucoso che ne riveste la superficie. Con l'aumentare dell'edema della mucosa vaginale e della secrezione mucosa, che va intensificandosi qualche giorno prima del parto, può fuoriuscire dalla vulva un cordone di muco denso e viscoso. Mentre nelle bovine primipare l'edema e l'aumento plastico della mammella è rilevabile dal quarto mese di gravidanza, nelle bovine pluripare il turgore della mammella si evidenzia da quattro a

due settimane prima del parto. L'edema può estendersi alla regione addominale inferiore fino all'appendice xifoidea dello sterno e in direzione caudale tra gli arti posteriori fino alla vulva.

Tali segni premonitori, tuttavia, non permettono l'esatta determinazione dell'inizio del parto. 24-48 ore prima dell'insorgenza del parto è possibile osservare l'imponente edema vulvare, la diminuzione di 0,5-1°C della temperatura corporea e le modificazioni del secreto mammario.

FASI DEL PARTO

Nella bovina fin dall'inizio dell'8° mese di gravidanza il feto assume la presentazione anteriore, fisiologica per il parto; gli arti posteriori del feto scivolano nell'apice del corno, diretto caudalmente, e la presentazione anteriore viene mantenuta fino al parto. Se all'inizio dell'8° mese, trovandosi il feto in presentazione posteriore, non avviene alcuna rotazione, gli arti anteriori raggiungono l'apice del corno gravidico e il feto viene espulso in presentazione posteriore, che deve essere, in ogni caso, considerata patologica. La forma rotonda o ellissoidale del visceri, fissato al centro e in direzione caudale, rende impossibile la rotazione assiale del feto senza contemporanea torsione dell'utero. La posizione del feto nella bovina, perciò, dipende dal tono della muscolatura uterina. La posizione dorsale, necessaria per l'espulsione del vitello attraverso il canale del parto, può essere assunta prima del parto per aumento del tono muscolare, che si deve verificare durante le doglie. L'assunzione della posizione dorsale durante l'espletamento del parto è, invece, dovuta all'azione delle contrazioni uterine. Per la corretta espulsione, prima

del parto, il feto estende gli arti anteriori e il collo nell'incavo sopravaginale dell'utero, modificando così l'atteggiamento incurvato, proprio dell'ultima fase della gestazione. Le contrazioni uterine, durante il parto, stabilizzano la posizione in estensione e l'impegno della testa del canale del parto. Il travaglio è sostenuto in primo luogo dalla muscolatura uterina. Le prime doglie sono di breve durata ed insorgono ad intervalli irregolari e con moderata intensità; in seguito si instaura una coordinazione delle contrazioni del miometrio che diventano regolari e vigorose.

Negli animali unipari le contrazioni di regola cominciano agli apici delle corna e si propagano sotto forma di onde peristaltiche lungo le corna uterine in senso caudale. Raramente si osservano contrazioni antiperistaltiche. Le contrazioni provocano un aumento di pressione nel lume uterino che spinge i liquidi fetali verso la cervice rilassata, che costituisce il punto di minor resistenza. In seguito alla lacerazione del corion in corrispondenza dell'orificio uterino interno ed al conseguente spostamento del sacco fetale, si trasmette una pressione idrostatica sui tessuti cervicali che si distendono senza lacerarsi.

Nelle pluripare, la completa dilatazione della cervice necessita in media di 80 contrazioni (200 minuti), mentre nelle primipare di un tempo medio complessivo di 290 minuti per un totale di 125 contrazioni.

La durata di una singola contrazione, all'inizio dell'attività contrattile, si aggira tra i 25 e i 50 secondi; in seguito alla coordinazione contrattile, la durata di ogni contrazione varia dai 50 ai 90 secondi. Nelle ultime fasi del parto, le singole contrazioni possono durare fino a 120 secondi. Nel parto eutocico la frequenza è di circa 6 contrazioni ogni 15 minuti. Un numero di contrazioni inferiore a 4 ogni 15 minuti

è indice di doglie languide, mentre un numero superiore a 7 ogni 15 minuti è segno di doglie tumultuose. Anche la concentrazione ematica dell'ossitocina subisce variazioni considerevoli, passando da 1×10^{-10} UI/ml alla fine della gravidanza, all'inizio delle doglie e durante l'attività contrattile nella fase dilatante, a 1×10^{-4} UI/ml raggiunta la dilatazione completa della cervice, quando il feto è impegnato nel canale del parto. La concentrazione di ossitocina aumenta per via riflessa quando la testa del feto viene a contatto diretto con l'orifizio uterino interno, e ciò crea uno stimolo pressorio più intenso sulle formazioni terminali nervose locali (*riflesso di Ferguson*).

L'intero processo del parto può essere suddiviso in una fase passiva e una attiva. Nella fase passiva, le variazioni endocrinologiche permettono le modificazioni delle strutture molli del canale del parto, preparandole all'inizio della fase attiva, caratterizzato dall'insorgenza delle contrazioni (doglie), a cui conseguono la dilatazione completa della cervice e, con l'ausilio del torchio addominale, l'espulsione del feto. Da un punto di vista clinico, in base alle modificazioni rilevabili nell'apparato genitale della madre, è, tuttavia, più appropriato distinguere il parto in una fase dilatante, una fase espulsiva ed uno stadio post-partum.

Fase dilatante

In seguito al rilassamento della muscolatura liscia uterina, nella fase latente del parto si evidenzia la dilatazione del canale cervicale in corrispondenza dell'orifizio uterino interno. La cervice si presenta in questo stadio inclinata davanti al margine anteriore del pube e ben chiusa a livello dell'orifizio interno. La riduzione del tono, che si

instaura all'inizio del parto in tutta la struttura muscolare dell'utero, della cervice, e della vagina, da una parte provoca la discesa dell'utero nel distretto cranio-ventrale dell'addome, e dall'altra innalza la cervice a livello del piano pelvico del canale del parto. Il rilassamento della muscolatura circolare della cervice, allo stesso tempo, causa l'apertura dell'orifizio uterino interno, per cui il lume del canale cervicale raggiunge un diametro di 5-7 cm. Le contrazioni, in un primo tempo ancora deboli e irregolari, provocano un transitorio aumento di pressione in cavità uterina. Questa forza pressoria spinge i liquidi fetali racchiusi nel corion e nelle membrane fetali contro l'orifizio uterino interno già dilatato, permettendo così la rottura del sacco amniotico che accoglie il feto. Nel parto eutocico, la fase dilatante ha la durata di 6-12 ore. Alla fine dello stadio dilatante, il sacco fetale che procide dalla rima vulvare è l'allantoide, se non ne è stata provocata la rottura precoce in seguito alle forze di trazione.

Fase espulsiva

Con la rottura del sacco amniotico da parte del feto e la fuoriuscita della maggior parte del liquido amniotico ha inizio la fase espulsiva. Quando il feto viene spinto in corrispondenza della cervice, esercita per contatto diretto uno stimolo pressorio crescente sui corpuscoli nervosi terminali locali, che inducono per via riflessa la liberazione di ossitocina dal lobo ipofisario posteriore, con conseguente intensificazione delle contrazioni. In questo modo aumenta la pressione per distensione esercitata dal feto sul canale del parto, stimolando i pressocettori localizzati nella parete del fornice vaginale dorsale. Lo stimolo nervoso raggiunge il midollo spinale tramite il

nervo pudendo e provoca, in via riflessa, la contrazione della muscolatura addominale (riflesso di svuotamento).

Per torchio addominale si intendono le contrazioni della muscolatura del tronco e del diaframma che, insorgendo nel corso di una contrazione uterina per la durata di soli pochi secondi, portano ad un breve ed intenso aumento della pressione intraddominale.

Il torchio addominale rinforza la pressione delle doglie da tre a cinque volte, aumentando conseguentemente la forza di espulsione esercitata sul feto. Poiché l'aumento di pressione addominale è di breve durata, l'azione distensiva sul canale del parto esercitata dal feto aumenta in maniera graduale, minimizzando il pericolo di iperdistensione o di lacerazione.

Lo sviluppo della massima forza del torchio addominale sia in cavità addominale che in cavità uterina, si verifica quando la gestante è coricata. Durante la fase espulsiva la bovina rimane per la maggior parte del tempo coricata, preferendo il decubito laterale, con gli arti in. Le prime contrazioni, accompagnate dall'attività del torchio addominale portano alla rottura del sacco amniotico con conseguente cessazione della trasmissione della moderata pressione idrostatica. Il feto agisce direttamente trasmettendo le forze delle spinte intermittenti alle parte non ancora dilatata del canale del parto. La trasmissione "rigida" della pressione richiede più tempo, in particolare misura nella bovina che ha un canale del parto particolarmente lungo. Nella bovina, l'ostacolo alla progressione del feto è rappresentato dalla particolare resistenza dei tessuti dell'anello imenale e della vulva, perciò, durante l'espulsione, per il passaggio della testa è necessario un maggior numero di contrazioni. Una trazione esercitata dall'esterno o l'insorgenza di contrazioni particolarmente violente, se superano la capacità di rilassamento del tessuto, possono esitare in

lacerazioni. Negli animali unipari, le forze espulsive si arrestano quando la fronte del feto oltrepassa la rima vulvare. La completa espulsione del feto viene portata a termine da una successione ravvicinata di doglie unitamente a spinte del torchio addominale. Poiché il torchio addominale viene attivato contemporaneamente alle contrazioni uterine, il numero delle contrazioni uterine nello stadio espulsivo può essere determinato dal numero delle serie di premiti addominali. Il numero di spinte del torchio addominale, che accompagna una contrazione uterina, sale lentamente da 4-5 all'inizio fino a 6-8 con l'avanzare della fase espulsiva.

Fase del secondamento

Il secondamento avviene spontaneamente tra le 2 e le 12 ore dopo il parto. Se la parte fetale della placenta non viene eliminata entro le 12 ore dopo il parto, si parla di ritenzione di membrane fetali. Nell'epitelio della parte fetale della placenta, prima del parto, si assiste ad un aumento dei diplocariociti, la cui attività riassorbente e fagocitaria si manifesta poco prima del distacco, con la formazione di cellule giganti polinucleate. Le caruncole non sono dotate di cellule contrattili, quindi il distacco delle membrane fetali in questa sede non può avvenire in seguito a contrazioni. La forza di spinta delle contrazioni post-partum comporta un'azione di trazione sulla parte fetale della placenta e favorisce come forza meccanica l'espulsione degli involti fetali.

IL PARTO DISTOCICO

Durante la visita ostetrica in corso di assistenza al parto sono fondamentali l'esame obiettivo generale e l'esame obiettivo particolare dell'apparato genitale. L'intervento ostetrico richiede una scelta univoca ed efficace; stimolare le contrazioni o praticare una trazione, effettuare una fetotomia oppure intervenire chirurgicamente.

L'esigenza fondamentale di un rilevamento accurato dei segni clinici non esclude tuttavia che in particolari circostanze si debba procedere con maggiore urgenza, come nel caso di prolassi o travagli con forti premiti.

Anamnesi

L'anamnesi deve fornire informazioni sul numero e sul decorso dei parti precedenti, compresa la fase del secondamento, sulla durata della gravidanza in corso, sullo stato di salute, sul comportamento della madre durante la gravidanza, su eventuali osservazioni di carattere generale, sui sintomi eventualmente già rilevati nell'imminenza del parto, quali il momento della fuoriuscita dei sacchi fetali e il loro aspetto, sui trattamenti e ausili ostetrici già effettuati. Devono essere segnalati con particolare attenzione comportamenti insoliti, quali manifestazioni di dolore piuttosto violente, perdite ematiche dalle vie genitali o dall'ano, alterazioni vistose dei liquidi

fetali (colore ematico, presenza di flocculi, intorbidamento, emanazione di odore anomalo).

Esame obiettivo generale della gestante

Il numero di parti e quindi le lattazioni rivestono particolare importanza per il decorso del parto. Doglie inadeguate per frequenza ed intensità sono riscontrate frequentemente nelle pluripare con elevato *parity range*, mentre nelle primipare è alta la probabilità di distocia. Nelle femmine troppo giovani, anche se maggiore è la mobilità articolare e la distensibilità del cingolo pelvico, possono insorgere talora considerevoli difficoltà al parto per macrosomia fetale relativa o assoluta.

Si deve tener presente che il parto può presentare complicazioni in animali defedati o obesi, che si trovano in stato di spossatezza o in decubito permanente.

Prima del parto la temperatura scende di 1-2°C rispetto alla norma in connessione con la luteolisi, mentre nel puerperio, specialmente nelle bovine, si deve considerare non preoccupante un transitorio aumento fino a 40°C. Anche la frequenza del polso subisce modificazioni, innalzandosi oltre le 120 pulsazioni al minuto, soprattutto nel parto prolungato, per poi rientrare nel range fisiologico un volta espletato il parto.

La circolazione sanguigna deve essere monitorata in tutti gli animali, con particolare attenzione negli animali già debilitati o sofferenti: a tal fine è utile auscultare il cuore, controllare i vasi arteriosi e quelli venosi, ispezionare le mucose (oculari, nasali e orali). Non di rado da

questi rilievi emerge già un'indicazione ad intervenire immediatamente per rimuovere i fattori causali del disturbo.

Sudorazione, sguardo fisso, pupille dilatate e addome teso possono indicare la presenza di peritoniti o lesioni delle vie del parto. Nella bovina, mucose pallide, occhi infossati, stramazamenti o il decubito permanente sono indicative di probabili emorragie interne.

ESAME CLINICO OSTETRICO

Alla palpazione, negli animali di grossa taglia sono spesso avvertibili movimenti fetali. In base a tale rilievo non si possono, tuttavia, trarre conclusioni certe sulla vitalità del feto, poiché in caso di ipossia possono insorgere movimenti fetali violenti, mentre d'altra parte feti vivi possono non muoversi. La percezione di toni cardiaci fetali conferma la presenza di feti vivi, per quanto le condizioni di campo renda spesso difficile la trasmissione delle onde sonore. Conferme diagnostiche si ottengono impiegando gli ultrasuoni secondo il principio Doppler.

L'ispezione dell'addome può orientare la diagnosi; aumenti considerevoli di volume e tensione possono indicare una gravidanza plurifetale, oppure idrope degli invogli fetali.

La valutazione dei genitali esterni e delle strutture circostanti può fornire indicazioni sulla fase del parto; ad esempio, il grado di rilassamento delle strutture legamentose pelviche e l'edema vulvare rappresentano segni premonitori scarsamente visualizzabili nei parti prematuri.

La quantità e l'aspetto del liquido allantoideo e del liquido amniotico, la presenza di sangue, l'aspirazione di aria, l'odore fetido sono reperti che permettono di diagnosticare con una certa sicurezza se il parto è eutocico o patologico e di trarre conclusioni per i provvedimenti da adottare. Allo stesso modo, il rilievo di contrazioni, senza fuoriuscita di invogli fetali, pone in diagnosi differenziale i restringimenti del canale del parto, le torsioni o dislocazioni dell'utero, i difetti di atteggiamento e le malformazioni fetali.

È possibile evidenziare la procidenza di anse intestinali dalla rima vulvare, per la lacerazione retto-vaginale.

L'esame ostetrico strumentale richiede pulizia e disinfezione accurate. Nella bovina l'esame ostetrico deve essere effettuato possibilmente sull'animale in stazione quadrupedale; nell'animale in decubito laterale permanente, è da preferire il lato sinistro (per l'aspetto topografico ventrale del ruminante). Inoltre, può risultare vantaggioso posizionare il treno posteriore dell'animale a 50-60 cm di altezza, permettendo una valutazione ostetrica adeguata e rispettando la necessaria igiene del parto.

L'esame ostetrico vaginale manuale è volto all'esplorazione delle parti molli, per accertare la presenza o meno di lacerazioni, emorragie, restringimenti, stato di lubrificazione del canale del parto, grado di dilatazione cervicale.

Il grado di stenosi influenza il trattamento e la prognosi, quindi deve essere accertato con la maggiore precisione possibile. Si parla di dilatazione insufficiente o stenosi di I grado nel caso in cui, attraverso il canale cervicale in forma di anello, riescono a passare la testa, il collo e almeno un arto anteriore o, nella presentazione posteriore, entrambe le cosce, ma non la pelvi del feto. La dilatazione insufficiente o stenosi di II grado permette il passaggio solo delle

estremità distali degli arti; nella stenosi di III grado, il lume vaginale è per la maggior parte occluso, tanto da permettere il passaggio di poche dita dell'operatore.

In caso di restringimenti del canale del parto a causa di pregresse fratture della pelvi, tumori, briglie, ematomi, cisti, turgori infiammatori ed ascessi, se ne devono accertare il volume e la sede; nelle dislocazioni e nelle torsioni uterine sono da definire il grado, la localizzazione e la direzione. Per determinare con maggiore precisione queste complicazioni può essere necessario effettuare l'esame rettale od anche l'esame combinato retto-vaginale (bimanuale).

Del canale osseo del parto si deve calcolare l'ampiezza e la profondità libera in rapporto alla grandezza del feto (rapporto feto – pelvi) e del suo cingolo scapolare e pelvico, per formulare una prognosi riguardo la possibilità di passaggio del feto o per poter valutare tempestivamente l'esistenza di sproporzioni. Talora, pur essendo i rapporti spaziali favorevoli, possono rappresentare un ostacolo le eminenze ossee (promontorio, rilievo pettineo dell'osso pubico, spina ischiatica) eccessivamente sviluppate. Nella crescente casistica delle sproporzioni per macrosomia fetale assoluta e bacino giovanile acquista importanza dal punto di vista prognostico la pelvimetria, soprattutto nelle primipare.

VALUTAZIONE DEGLI ANNESSI E DEI LIQUIDI FETALI

L'ispezione e la palpazione delle membrane fetali permettono di accertare se ne è avvenuta la rottura, con conseguente perdita di liquidi. Se le membrane fetali risultano integre, occorre procedere con la lacerazione manuale dopo avere valutato che non si vadano ad

interrompere i naturali processi di dilatazione o che appaia indicato accelerare il parto, come nel caso di ipossia fetale da schiacciamento del cordone ombelicale.

In caso di parti protratti o condizioni patologiche, le membrane fetali evidenziano alterazioni macroscopiche: esse possono apparire turgide, infiammate, di colore alterato, fetide e lacerate. Il sospetto di patologie infettive deve porre il veterinario nella condizione di mettere in atto misure protettive nei confronti di se stesso, dell'animale gravido e della mandria potenzialmente contagiabile. Nella rottura precoce degli invogli fetali, il grado di lubrificazione del canale del parto viene a ridursi notevolmente, i feti appaiono asciutti, ed il parto si arresta. In questo caso la lubrificazione artificiale del canale del parto deve precedere qualsiasi altro trattamento. La quantità di liquidi fetali, fisiologicamente intorno ai 20-25 litri, può risultare considerevolmente aumentata in seguito a fenomeni di idrope degli invogli. Infine, il cordone ombelicale fornisce spesso l'unica preliminare possibilità di orientamento nelle disposizioni trasversali addominali; inoltre torsioni ed attorcigliamenti ostacolano non di rado l'estensione massima degli arti e le conseguenti compressioni dei vasi ombelicali provocano anossia fetale.

VALUTAZIONE DEL BENESSERE DEL FETO

L'esame completo e sistematico del feto rappresenta una parte fondamentale dell'esame ostetrico pre-parto, per giungere ad una rapida e corretta diagnosi. La palpazione trans-vaginale delle porzioni fetali proclivi la rima vulvare ne deve permettere il riconoscimento e la distinzione; nella presentazione longitudinale anteriore, durante

la palpazione, partendo dagli unghia e passando sull'articolazione metacarpale, si apprezza l'articolazione del carpo e successivamente quella del gomito, con il processo olecrano. Nella presentazione posteriore, invece, la mano dell'ostetrico oltrepassa l'articolazione metatarsale prima della tuberosità calcaneale.

La corretta distinzione delle porzioni fetali risulta di fondamentale importanza soprattutto in caso di presentazioni simultanee di gemelli o mostrosità fetali quali lo *Schistosoma reflexum* che possono indurre in confusione.

L'atteggiamento della testa è facilmente riconoscibile dalla posizione degli occhi, degli orecchi, del naso, della fessura buccale; il rovesciamento della testa all'indietro permette la palpazione degli anelli cartilaginei della trachea incurvata. Il riconoscimento della pelvi e del treno posteriore è reso agevole dalla presenza della coda, dalla palpazione dell'ano, delle tuberosità ischiatiche, dello scroto e dall'articolazione del ginocchio.

Valutazione delle dimensioni del feto

La valutazione del rapporto feto-pelvico deve essere sempre eseguita prima di effettuare una trazione manuale o per indirizzare il trattamento verso il taglio cesareo. La palpazione della testa, delle scapole e della pelvi fetale e materna fornisce indicazioni sulla capacità del feto di attraversare il canale del parto. Indicazioni anamnestiche riguardanti la frequenza di distocie per macrosomie fetali assolute o relative dovrebbero suggerire la necessità di eseguire un esame particolarmente coscienzioso prima di mettere in atto misure ostetriche e costituire motivo per modificare i programmi di

accoppiamento o per escludere dalla riproduzione gli animali portatori di determinati caratteri ereditari.

Vitalità del feto

La vitalità del feto grava sul tipo di intervento ostetrico da adottare (taglio cesareo, fetotomia, trazione manuale). In caso di morte del feto tutti i provvedimenti devono essere diretti alla salvaguardia della salute della gestante.

Per valutare la vitalità del feto si ricorre all'evocazione di riflessi quali la retrazione degli arti in seguito a divaricazione o pizzicamento degli unghia, la suzione e la deglutizione introducendo un dito nella cavità buccale, l'ammicciamento con la pressione sui bulbi oculari; in caso di presentazione posteriore, si ricorre al riflesso perineale che provoca la contrazione dello sfintere anale. La palpazione del cordone ombelicale permette di apprezzare la pulsazione dei vasi ombelicali, e una sua compressione protratta evoca movimenti fetali. È da sottolineare, comunque, che, in alcuni feti e per ragioni non note, tali riflessi possono essere innescati in modo non rimarcabile; per tale motivo, l'ariflessia non esclude la presenza di un feto vitale, mentre la risposte riflesse depongono per la vitalità del feto. Se il feto non è raggiungibile attraverso il canale del parto, i rilievi palpatori devono essere ottenuti, per quanto possibile, per via transrettale.

ESAME *POST-PARTUM*

Espletato il parto, tramite l'esplorazione deve essere accertata la presenza di altri feti o parti fetali, di lesioni uterine, della cervice e della vagina. Il secondamento deve avvenire spontaneamente.

In seguito a parti distocici, fetotomie e taglio cesareo, il distacco delle membrane fetali può avvenire con ritardo a causa dell'atonia uterina conseguente alla narcosi e all'esaurimento funzionale dell'organo.

Lacerazioni della parete uterina sono facilmente riconoscibili durante l'esame transvaginale mediante la palpazione della sierosa (che al tatto appare liscia) o, nei casi più gravi, dei visceri addominali. Le lesioni uterine sono più frequenti dorsalmente e cranialmente all'orifizio uterino interno.

L'esame ostetrico *post-partum* si conclude con la palpazione dell'orifizio uterino esterno, della porzione craniale della vagina, dell'anello imenale, del vestibolo vaginale, e della vulva al fine di valutare la presenza di ferite, contusioni, lacerazioni del perineo, fistole retto-vaginali, emorragie arteriose, prolassi, estroflessione della vescica.

DISTOCIE DA CAUSA MATERNA

Malattie sistemiche

Errori alimentari e manageriali, parti prematuri, inadeguata preparazione al parto, insufficienti dilatazioni, debolezza delle doglie,

disturbi dell'eccitabilità neuromuscolare con decubito permanente, fratture, debolezza, astenia, stati setticemici e pioemici, rappresentano fattori di rischio per l'instaurarsi di una distocia. Il trattamento, in questi casi, deve mirare alla risoluzione della causa primaria, come nell'ipocalcemia/ipomagnesiemia, ottenendo in tal modo anche un effetto benefico diretto sull'espletamento del parto.

Singole patologie d'organo possono compromettere il normale svolgimento del parto. Ad esempio una peritonite, una reticoperitonite o pericardite traumatica pregiudicano l'attivazione del torchio addominale. Ernie, rotture della parete addominale, eccessiva distensione della muscolatura addominale (idropie degli invogli), inibiscono la forza delle contrazioni addominali. Arresto improvviso della fase espulsiva del parto con cessazione delle contrazioni si può riscontrare in caso di lacerazioni organiche, quali le rotture dell'utero e dell'intestino nella fase espulsiva.

Disturbi delle doglie uterine

Per il normale andamento del parto le doglie devono essere sufficientemente forti e regolari. È importante che le contrazioni siano attive a partire dall'inizio dello stadio dilatante fino al secondamento, anche se con intensità e frequenza differenti. Disturbi dell'attività contrattile dell'utero possono verificarsi in qualsiasi fase del parto.

Disturbi del canale del parto

Negli animali domestici le difficoltà di parto a causa del canale osseo sono tanto meno frequenti quanto più alla riproduzione vengono destinati solo quegli animali che a maturità completa ed in perfetto stato di salute presentino un buon sviluppo corporeo.

Bacino giovanile

Nel bovino non è possibile effettuare *in vivo* un'esatta pelvimetria e la proporzione feto-pelvica non è oggettivabile *intra-partum*, i dati sulla conformazione della pelvi giovanile come causa di distocia vanno interpretati con molta prudenza. Spesso come causa di parti distocici si adduce una troppo precoce utilizzazione degli animali a scopo riproduttivo. Le cause più frequenti dell'insufficiente ampiezza della pelvi ossea nelle primipare sono da ricondurre a errori alimentari nel periodo di accrescimento e a malattie croniche (parassitosi). In caso di distocia per bacino giovanile, nonostante la completa dilatazione delle vie molli del parto, il parto si arresta; all'esame ostetrico viene rilevata la sproporzione tra il feto e il canale osseo del parto, da cui possono derivare complicazioni dovute a difetti di posizione e atteggiamento, a morte fetale, doglie languide.

Osteopatie del canale osseo del parto

Restringimenti del canale osseo del parto possono essere provocati da malformazioni del bacino, come nel caso di eccessiva prominenza del promontorio e della sinfisi con riduzione dell'altezza della pelvi o di eccedente sporgenza della cresta ileo-pettinea con riduzione del

diametro trasverso. Evenienza relativamente rara è rappresentata da esostosi e calli ossei in seguito a fratture pelviche. Diastasi dell'articolazione sacroiliaca, conseguenti a distocie pregresse, occasionalmente possono apportare gravi complicazioni nel parto.

Alla dilatazione del canale del parto, che ha inizio nella fase prodromica, prendono parte l'intero apparato legamentoso, la cervice, la vagina e la vulva. Nella dilatazione delle vie molli del parto sono chiamate in causa le variazioni peripartali della concentrazione sierica delle prostaglandine, degli estrogeni, degli gestageni e del cortisolo.

Le cause ed i sintomi della stenosi vulvare e vaginale durante il parto sono riconducibili a: stenosi giovanile, nel caso in cui l'animale sia stato fecondato prima di aver raggiunto uno sviluppo sufficiente; cicatrici, associate a lacerazioni occorse in parti distocici pregressi, a interventi ostetrici, e a lesioni da monta naturale; disturbi di circolo, provocati da compressioni in corso di parti languidi, sono causa di edemi vulvari e vaginali.

Il trattamento prevede soluzioni mediche o chirurgiche: se nei tentativi di trazione si generano tensioni eccessive, si può ricorrere all'uso di sostanze in grado di favorire il rilassamento delle porzioni stenotiche interessate. Il vantaggio dell'impiego di medicinali in presenza di stenosi vulvare e vaginale sta nel fatto che dopo la somministrazione è necessario attendere un lasso di tempo variabile tra i 30 e i 50 minuti prima che si manifesti l'effetto farmacodinamico. Se la posizione del feto è corretta e l'attività contrattile nella norma, si favorisce in questo modo una dilatazione sufficiente all'estrazione del feto con moderata trazione. Nei casi più gravi, bisogna, invece, prendere in considerazione la dilatazione cruenta, preceduta sempre dalla valutazione che l'ostacolo all'espletamento del parto risiede

unicamente nelle vie molli. L'episiotomia si esegue nella parte superiore delle labbra vulvari in direzione laterodorsale. La dilatazione cruenta permette la prevenzione di lacerazioni in punti sfavorevoli, provocando la lesione nel punto più esterno del canale del parto. In presenza di una stenosi vaginale e vulvare di grado elevato e nel caso in cui il trattamento medicamentoso non ha prodotto un'evidente dilatazione, si deve prendere in considerazione il trattamento chirurgico; il taglio cesareo rappresenta il trattamento d'elezione, anche se, in presenza di sufficiente spazio per lo strumento, si può ricorrere alla fetotomia, intervenendo con un numero limitato di tagli.

Se il parto si prolunga oltre le 12 ore si parla di parto protratto. In questi casi, le condizioni generali della partoriente sono più o meno compromesse in conseguenza dell'instaurarsi di uno stato di tossicosi. In questa fase sono in corso processi involutivi, quali la regressione dei vasi e della muscolatura liscia. Il canale del parto, dall'utero alla vulva, perde la sua elasticità e, in conseguenza dei processi regressivi in atto, diviene fragile e facilmente lacerabile. Le membrane e i liquidi fetali residui appaiono alterati nel colore e nell'odore. Il feto è morto, spesso enfisematoso, e presenta i primi segni di putrefazione (caduta dei peli, distacco degli unghioni, odore).

Anche per l'insufficiente ampiezza del canale cervicale si distinguono tre gradi di stenosi. Un'insufficiente ampiezza del canale cervicale nel parto protratto rappresenta un ostacolo all'espletamento del parto più grave della dilatazione insufficiente della cervice, in primo luogo perché l'utero e il canale del parto perdono la loro elasticità, e in secondo luogo perché l'utero ed il suo contenuto, di norma, sono infetti. Tentativi di dilatazione con distensione meccanica o con docce

vaginali, e il trattamento con estrogeni o utero-rilassanti non danno risultati.

DISTOCIE DA CAUSE FETALI

Anomalie di atteggiamento

I difetti di atteggiamento sono tra le cause più frequenti di distocia di origine fetale. Negli animali unipari, prevalendo la presentazione anteriore, si osservano più frequentemente gli atteggiamenti anomali della testa e degli arti anteriori.

- Atteggiamenti anomali della testa: nell'espletamento del parto, dall'atteggiamento fisiologico in estensione, la testa può essere deviata verso i lati, verso il petto e verso il dorso del feto, per cui si è soliti distinguere un atteggiamento laterale, un atteggiamento toracico e un atteggiamento dorsale della testa. Una trazione praticata soltanto sugli arti in estensione con cervice non completamente dilatata può causare un arresto della progressione della testa con ripiegatura del collo.

- Atteggiamenti anomali degli arti anteriori: fisiologicamente, i due arti anteriori del feto durante il parto si trovano in estensione nel canale del parto. Le deviazioni sono rappresentate da atteggiamenti in flessione delle articolazioni di uno o di entrambi gli arti. Se sono interessati entrambi gli arti, solitamente vengono rilevate in flessione le medesime articolazioni. Importanza pratica hanno l'atteggiamento di flessione del carpo, quello di spalla flessa, quello di spalla e gomito flessi e l'atteggiamento di arti sopra la nuca.

- Atteggiamenti anomali degli arti posteriori: anche nella presentazione posteriore, gli arti si trovano in estensione nel canale del parto, e, come per gli arti anteriori, si possono osservare atteggiamenti anomali nelle flessioni di alcune articolazioni. Rivestono importanza pratica in ostetricia l'atteggiamento in flessione dell'articolazione tarsica (garretto) e la flessione dell'anca, che possono essere mono o bilaterali. L'atteggiamento in flessione dell'anca e del ginocchio non si osservano mai singolarmente, in quanto alla flessione dell'articolazione del ginocchio solitamente si accompagna anche la flessione dell'articolazione tarsica, dovuta alla tensione del *muscolo fibularis tertius* (peroneo terzo).

In genere, la correzione degli atteggiamenti anomali degli arti posteriori presenta maggiori difficoltà di quella degli arti anteriori; inoltre, nelle presentazioni posteriori il cordone ombelicale viene compresso prima ed è quindi più facile che sopravvenga l'asfissia. In definitiva, la presentazione posteriore comporta una maggiore predisposizione all'instaurarsi di atteggiamenti anomali degli arti.

Anomalie di posizione

Si possono verificare deviazioni di vario grado dalla normale posizione dorsale (dorso-sacrale) del feto nel parto. L'orientamento del dorso del feto verso un lato o verso l'addome materno permette la distinzione della posizione laterale e della posizione ventrale, quali, a loro volta, possono essere in presentazione di arti anteriore (rispettivamente posizione dorso-iliaca destra o sinistra e posizione dorso - pubica), o in presentazione posteriore (rispettivamente lombo-iliaca destra o sinistra e posizione lombo - pubica).

Statisticamente, i difetti di posizione risultano meno frequenti rispetto alle anomalie di atteggiamento.

IGIENE DEL PARTO

Con l'introduzione dell'asepsi da parte di Ignazio P.Semmelweis (1847) si crearono le condizioni preliminari per lo sviluppo dell'ostetricia sia conservativa che operatoria. Con la scoperta dei chemioterapici, erroneamente, si ritenne che con il loro impiego su vasta scala non fosse più necessario attenersi rigidamente alle regole dell'asepsi, favorendo così l'insorgenza di gravi infezioni causate da specie batteriche resistenti. È ben noto che risultano essere necessarie entrambe le misure: pulizia, disinfezione e sterilizzazione preventiva da una parte e chemioterapia dall'altra. Durante il parto, l'esposizione ad agenti patogeni è un'evenienza da tenere in seria considerazione. Anche in corso di parto eutocico, l'eliminazione di materiale fecale crea presupposto per la penetrazione di germi nelle vie posteriori del parto e la loro propagazione in utero. Durante l'espletamento di un parto distocico, gli operatori e gli strumenti impiegati per il trattamento divengono mezzo di diffusione dei patogeni. La trasmissione avviene per contatto diretto con animali portatori d'infezione o per contatto indiretto con portatori intermedi (polvere o altri vettori).

Sterilizzazione e disinfezione

Per sterilizzazione si intende l'eliminazione dei patogeni, mentre con la disinfezione viene abbassata al minimo la carica infettante, senza

riuscire però ad ottenere l'allontanamento degli agenti non patogeni. Tra i metodi fisici di eliminazione dei germi (sterilizzazione) si annoverano: la filtrazione, l'irradiazione (ultravioletti, gamma, ultrasuoni), l'essiccamento, il calore (arroventazione, fiammazione, riscaldamento, bollitura a fondo, vapore, autoclavaggio). Ai procedimenti chimici appartengono numerose sostanze, che soddisfano i seguenti requisiti: azione battericida, virulicida, fungicida, solubilità in acqua, intensa umettabilità, tossicità minima, assenza di odore, innocuità per il materiale da disinfettare.

Preparazione della zona parto

Per limitare i rischi di contagio è preferibile prevedere nell'allevamento un ambiente specifico per il parto. L'igiene di tale zona deve essere ottenuta mediante l'impiego di soluzioni disinfettanti, preferibilmente nebulizzando soluzioni battericide mediante apparecchi a superpressione, e di abbondante strame (paglia, trucioli di legno, segatura) (A. Corrias – I. Martini 1989).

Preparazione del personale

Mani e braccia degli operatori svolgono un ruolo centrale nella trasmissione delle infezioni genitali, poiché i germi annidati sotto la rima ungueale e sulla cute trovano all'interno del canale del parto le più favorevoli condizioni di vita. Inoltre, il potere di difesa locale delle mucose genitali viene indebolito dalle manipolazioni ostetriche e contrappone, quindi, minore resistenza alla diffusione e alla moltiplicazione degli agenti patogeni. Per contro anche germi presenti

in utero (streptococchi, E. coli, clostridi) possono rappresentare un pericolo per la salute dell'ostetrico (Severidt *et al.* 2002). Il veterinario, quindi, prima del trattamento ostetrico deve provvedere a lavaggio e disinfezione di mani e braccia in acqua calda corrente con sapone e con spazzolino per le unghie, e preparare lo strumentario sterile (corde, guanti zootecnici).

LE CONSEGUENZE DEL PARTO SULLE PERFORMANCE RIPRODUTTIVE

L'ipofertilità nelle bovine è stata osservata come conseguenza di complicanze stabilitesi al momento del parto, in seguito, soprattutto, ad una non appropriata assistenza durante il travaglio.

Alterazioni dell'ultimo tratto dell'apparato genitale, quali le lacerazioni vulvari, le stenosi del canale vaginale e le lacerazioni della cervice possono essere conseguenze di errate manovre ostetriche, in particolare, durante parti difficoltosi, come ad esempio nel caso di soggetti macrosomici, o in corso di distocie, con difetti di atteggiamento del feto incorsi durante le ore notturne e affrontati con ritardo (Dematawewa *et al.*, 1995).

Insufficienti condizioni igieniche, spesso osservate in strutture nelle quali non sia stata prevista una zona assegnata esclusivamente al parto, risultano essere fattori predisponenti ai processi infiammatori, sia acuti che cronici, a carico dell'utero anche in bovine con anamnesi di parto eutocico. Fenomeni infiammatori di carattere subclinico e a decorso cronico possono inoltre essere conseguenza della lenta e difficoltosa eliminazione delle secrezioni lochiali e della ritenzione degli involgii fetali, e rendersi responsabili di continui ritorni in calore,

con conseguenti ripetute inseminazioni, mancati concepimenti e riassorbimenti embrionali. In ultima analisi, episodi di salpingite e di ovarite possono essere riconosciuti come conseguenza diretta dello sviluppo di endometriti e pregiudicare, quindi, l'intera carriera riproduttiva della bovina (Lombard et al 2007).

L'ottimizzazione del management nelle bovine da latte, nella fase di transizione, al parto e nel *post-partum*, mediante un adeguato intervento ostetrico, all'ottimizzazione delle immunità e dell'igiene del parto, è stato oggetto di questo studio con l'obiettivo di ridurre le patologie del post-partum e per incrementare le performance riproduttive in questa specie.

PARTE SPERIMENTALE

MATERIALI E METODI

Lo studio è stato condotto nel periodo maggio 2007- dicembre 2009, presso l'Azienda Agricola di Casalina, Deruta (PG). Sono state assegnate per l'esperimento un totale di 60 primipare e di 60 pluripare di razza Frisona Italiana; gli animali presentavano Body Condition Score medio di $3,75 \pm 0,50$ e $3,50 \pm 0,25$, rispettivamente. L'organizzazione aziendale dell'allevamento prevede una zona destinata alle pluripare in asciutta e una per le bovine in produzione latte suddivise per periodo di lattazione (freschissime, fresche e in piena produzione); ulteriore zona è destinata alle primipare nei diversi stadi di sviluppo. Ogni zona presenta lettiera permanente rinnovata ogni 6 mesi circa, corsia di alimentazione e un paddock

esterno senza copertura. Box singoli, prefabbricati, sopraelevati, coperti, isolati dal resto della stalla sono destinati ai vitelli sino allo svezzamento; inoltre è destinata una zona per la sala mungitura e due zone separate destinate ai box parto e all'infermeria.

Protocollo per l'applicazione della trasmittente GSM

Dal 280^o±5 giorno di gestazione, a ogni soggetto è stata eseguita una visita ostetrica con l'obiettivo di valutare la presenza e la progressione dei segni premonitori del parto. Ogni esame ha previsto la valutazione dello sviluppo e la preparazione della mammella, la valutazione dello stato di rilassamento delle strutture legamentose del bacino, l'apprezzamento dell'edema vulvare, nonché, tramite esame vaginoscopico, la fluidificazione del tappo mucoso cervicale. L'esame ecografico con approccio trans-rettale con sonda lineare da 5 MHz è stato condotto per determinare il benessere fetale, l'aspetto degli annessi fetali, nonché, la presentazione del feto rispetto l'asse longitudinale materno. Alla rilevazione dei segni di preparazione al parto e della fluidificazione del tappo mucoso, a ogni soggetto è stata applicata la trasmittente dell'allarme parto (5x2x1 cm/15gr.), costituita da un rivestimento in materiale plastico e da una spina magnetica di contatto progettata per distaccarsi con una trazione di 300 gr.; al suo interno è collocato il componente elettronico generante una radio-frequenza. La ricevente della frequenza radio, posizionata entro un raggio di 30 m., è stata studiata per comunicare, una volta attivata, con un commutatore/compositore GSM in grado di segnalare tramite telefonia mobile all'addetto alla sorveglianza degli animali, il verificarsi dell'evento. L'installazione ha previsto la fasciatura e contenimento della coda, il lavaggio della regione perineale con soluzione di iodopovidone al 10%, il fissaggio

della trasmittente tramite tre punti di sutura non assorbibile in nylon sulla porzione media delle rime vulvari, previa infiltrazione con anestetico locale (Lidocaina® 2%, 3 - 5 ml). Dopo l'installazione ogni soggetto è stato condotto nella zona parto (Figura 1) costituita da tre zone singole coperte, un locale per l'alloggiamento della ricevente e trasmittente GSM e del materiale ostetrico necessario per l'assistenza al parto e le cure neonatali. A ogni parto, ogni box è stato disinfettato con soluzioni battericide e sostituita la lettiera con abbondante strame di paglia.

Assistenza ostetrica e neonatale

Al momento della ricezione del segnale allarme parto è stata condotta una visita ostetrica per determinare lo stadio del parto, la presentazione, la posizione e l'atteggiamento del feto, l'integrità delle membrane fetali, il grado di dilatazione cervicale e la dimensione del feto rispetto al diametro della pelvi materna. Dopo aver constatato lo stadio del parto e averne valutata la possibilità di espletamento eutocico, è stata classificata la progressione del feto durante la fase espulsiva sulla base delle porzioni fetali osservabili al di fuori della rima vulvare: 1) arti anteriori, 2) testa, 3) torace e 4) completa espulsione. Diversamente, in caso di valutazione di un evento distocico, sono state attuate le normali manovre ostetriche atte a risolvere nel minor tempo possibile la distocia stessa. In ogni caso viene sottolineato l'uso da parte dell'operatore di materiale ostetrico, accuratamente sterilizzato. L'esame clinico e le cure perinatali sono stati condotti nei neonati; per la valutazione clinica dei vitelli è stato utilizzato il sistema a punteggio A.P.G.A.R. (Knottenbelt, 2004). Per l'analisi statistica sono stati estrapolati i dati riproduttivi degli animali oggetto dello studio dal software aziendale di gestione dati e

sono stati comparati con il gruppo controllo composto da primipare $n=195$ e pluripare $n=169$, selezionate dal totale della mandria per data prevista del parto e per numero di gestazioni (*parity range*), per un totale di 120 parti sperimentali e 354 parti controllo. I dati riproduttivi ottenuti dai soggetti pluripari, inoltre, sono stati comparati con i dati della gestazione precedente.

RISULTATI

Il tempo medio per l'installazione della trasmittente nelle primipare e nelle pluripare è stato di $5,4 \pm 0,1$ e di $4,5 \pm 0,1$ minuti, rispettivamente; non sono state osservate reazioni locali conseguenti all'applicazione della trasmittente. Il parto, avvenuto mediamente dopo 36 ± 8 ore dall'applicazione del dispositivo GSM, si è verificato prevalentemente nelle ore notturne e in particolare: il 40% delle pluripare ha partorito tra le 18:00 e le 24:00, il 15% tra le 12:00 e le 18:00, il 22% tra le 6:00 e le 12:00, e il 23% tra le 0:00 e le 6:00; mentre, tra le primipare, il 53% tra le 18:00 e le 24:00, l'8% tra le 12:00 e le 18:00, il 12% tra le 6:00 e le 12:00, e il 27% tra le 0:00 e le 6:00 (Grafico 1). Il tempo medio trascorso dal ricevimento dell'allarme GSM alla visita delle bovine in sala parto è stato di 20 ± 5 minuti. La durata media della fase espulsiva del parto è stata rispettivamente di 70 ± 21 minuti nelle primipare e di 59 ± 26 minuti nelle pluripare ($P < 0,01$). La durata media delle fasi 1, 2 e 3, è stata rispettivamente di 29 ± 11 , 45 ± 16 e 61 ± 19 minuti nelle primipare e di 28 ± 10 , 36 ± 14 e 45 ± 18 minuti nelle pluripare. Tutti i feti si presentavano in posizione dorso-sacrale; 117 feti in presentazione anteriore (tra questi, 2 casi di gemellarità) e 5 feti in presentazione longitudinale posteriore.

Approssimativamente 15 ± 5 min dopo la ricezione dell'allarme, il 62,5% dei vitelli si presentava impegnato nel canale parto con le

estremità degli arti anteriori visibili oltre la rima vulvare. Il parto è stato suddiviso in 5 gruppi in base alle cause di distocia (Tabella 1). Il grado 0 era assegnato al parto eutocico che non richiedeva assistenza ostetrica; il grado 1 veniva attribuito in caso di prolungamento della seconda fase del parto; il grado 2 prevedeva disposizioni fetali anomale; il grado 3 le sproporzioni feto-pelviche; infine, il grado 4 era assegnato in caso di torsione uterina o stenosi cervicale o vaginale.

Tra le primipare, il 33.3% ha fatto registrare difficoltà al parto (il 18.3% per disposizione fetale anomala, l'8.3% per macrosomia fetale e il 6.7% per prolungamento della seconda fase del parto), mentre il 23.4% delle pluripare ha mostrato segni di distocia, tutti di origine fetale, escluso un caso di torsione uterina. Lo score A.P.G.A.R. medio registrato era di 8.5. Si è evidenziata una significativa riduzione delle patologie puerperali e neonatali, sia nel gruppo delle primipare sia in quello delle pluripare. Nel gruppo controllo, le pluripare e le primipare registravano rispettivamente il 11,2% e il 13.3% (19/26) di vitelli morti nell'arco delle prime 48 ore dopo il parto (Tabella 2), mentre nel gruppo sperimentale non sono stati rilevati casi di mortalità neonatale. L'incidenza delle patologie puerperali è stata maggiore nel gruppo controllo; infatti, il 13.61% delle pluripare e il 21.03% delle primipare sono risultate affette da endometriti. Delle bovine assistite con GSM, solo il 6.67% ha manifestato sintomi ascrivibili a patologia puerperale, indipendentemente dalla classe di parto. L'incidenza di ritenzione delle membrane fetali nel gruppo controllo è stata del 3.55% nelle pluripare e del 8.20% nelle primipare, mentre, in tutte le bovine sottoposte a monitoraggio con tecnologia GSM la fase del secondamento è avvenuta spontaneamente. I dati riguardanti le patologie puerperali del gruppo controllo e di quello sperimentale sono riportati in Tabella 3 e Grafici 4 e 5.

Anche l'intervallo parto-concepimento (Grafico 2) è risultato, inoltre, significativamente ridotto sia nelle pluripare ($110.4 \pm 49,88$ vs 181.3 ± 97.30 gg.) ($P < 0,001$) che nelle primipare monitorate ($108.5 \pm 45,01$ vs $169.51 \pm 91,23$ gg.) ($P < 0,001$), per i gruppi sperimentale e controllo, rispettivamente. Un andamento analogo si è registrato anche per il numero degli interventi fecondativi necessari a ottenere il concepimento (Grafico 3) sia nelle pluripare ($1.94 \pm 1,22$ vs $3.08 \pm 1,52$) ($P < 0,001$) che nelle primipare (2.07 ± 1.11 vs 3.1 ± 1.83) ($P < 0,001$).

La comparazione dei dati riproduttivi delle bovine pluripare oggetto della prova con quelli della loro precedente gestazione ha evidenziato una significativa riduzione dell'intervallo parto-concepimento (138.94 ± 79.45 versus $110.40 \pm 49,88$) ($P < 0,001$) e del numero d'interventi fecondativi per concepimento ($2,73 \pm 1,82$ versus $1,94 \pm 1,22$) ($P < 0,001$).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

L'applicazione della tecnologia GSM risulta essere un affidabile strumento nel management e nell'assistenza della bovina al parto, così come riportato per la specie equina, permettendo di conoscere con attendibilità l'inizio della fase espulsiva. Durante la prova non è stata rilevata la deiscenza della sutura che fissa il dispositivo alla rima vulvare. Sono stati osservati tre falsi allarmi dovuti al distacco del contatto per l'azione di frizione da parte delle bovine. In confronto ai diversi protocolli elencati nell'introduzione - monitoraggio ecografico della gravidanza, modificazioni della temperatura corporea, dosaggi di ormoni e degli elettroliti - che consentono la previsione della data del parto con l'approssimazione di circa 24 ore, il sistema applicato in questo studio, permette una precisa determinazione dell'inizio del

travaglio. Come evidenziato nel grafico 4, il pronto intervento ostetrico e l'adeguata igiene del parto hanno consentito la prevenzione delle patologie correlate al parto distocico. In particolare, nel presente studio è stata centrata l'attenzione sull'igiene delle zone adibite al parto; la completa sostituzione della lettiera a ogni parto, preceduta da un'accurata disinfezione, ha consentito la significativa riduzione delle infezioni uterine *post-partum*, delle ritenzioni delle membrane fetali, con conseguente miglioramento delle performance riproduttive e del benessere animale. Inoltre la significativa riduzione della natimortalità denota l'importanza dell'assistenza perinatale dei vitelli, nel particolare della pronta assunzione del colostro e quindi del successo nel trasferimento dell'immunità. Riteniamo che, anche se la numerosità delle osservazioni è relativamente modesta, tali risultati siano decisamente incoraggianti. Purtroppo a tutt'oggi sia i costi di acquisto che di mantenimento del sistema d'allarme, nonché la laboriosità della modalità di applicazione, rendono la procedura economicamente onerosa per la realtà buiatrica. Ciononostante, laddove il valore economico del vitello e/o della madre risultino particolarmente elevati, madri e figli di tori, figli di trapianti embrionali, l'applicazione della tecnologia GSM può trovare già da ora un interesse sostanziale, auspicando l'introduzione di sistemi alternativi a quelli impiegati che abbiano costi di acquisto, gestione ed applicazione compatibili con l'industria della produzione del latte. Gli autori del presente studio sono attualmente sperimentando dei sistemi alternativi a quelli impiegati che abbiano costi di acquisto, gestione e applicazione compatibili con l'industria della produzione del latte.

ICONOGRAFIA

Figura 1 - Area destinata al parto e all'alloggiamento della ricevente e trasmittente GSM

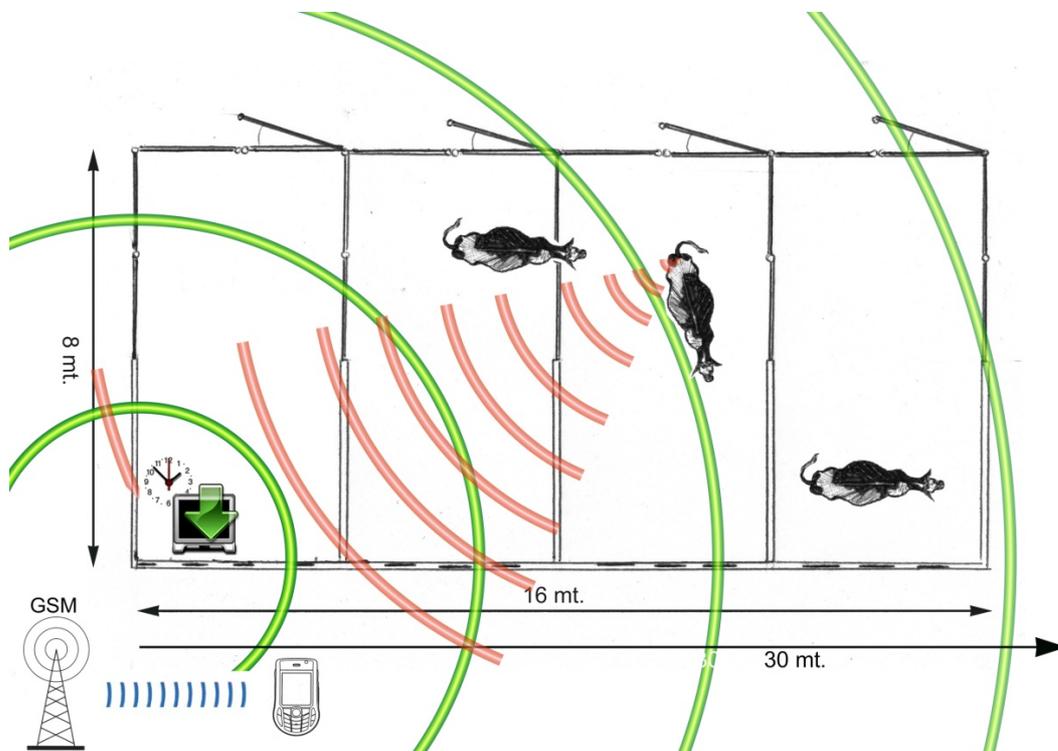


Grafico 1: Distribuzione del numero dei parti nelle 24 ore; primipare e pluripare sottoposte a monitoraggio con tecnologia GSM.

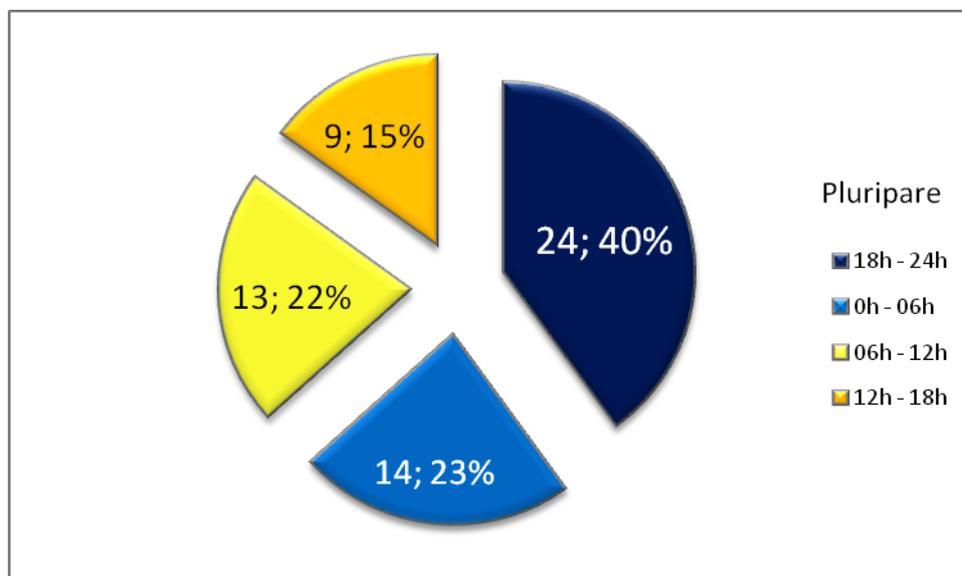
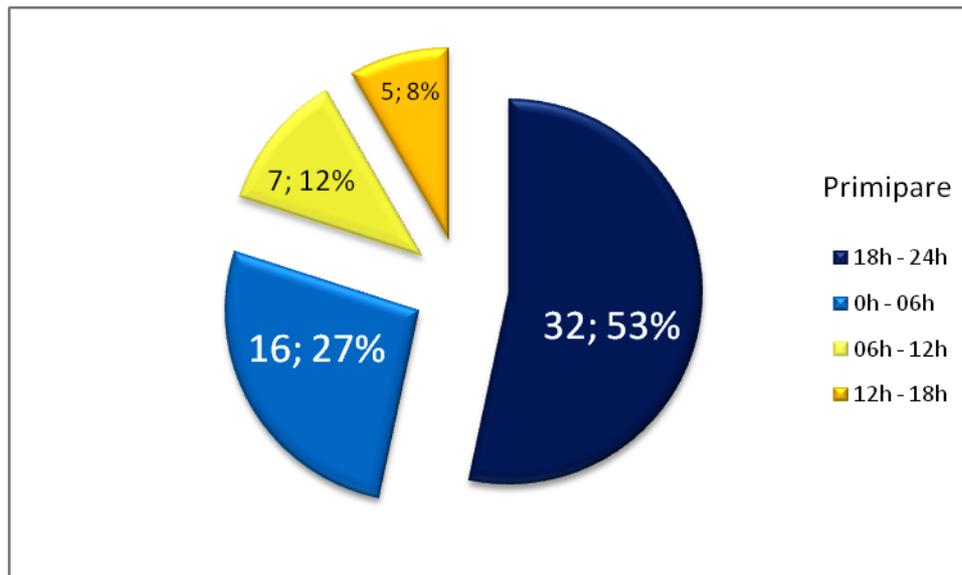


Grafico 2: Medie e Deviazione Standard dell'Intervallo Parto-Concepimento durante lo studio.

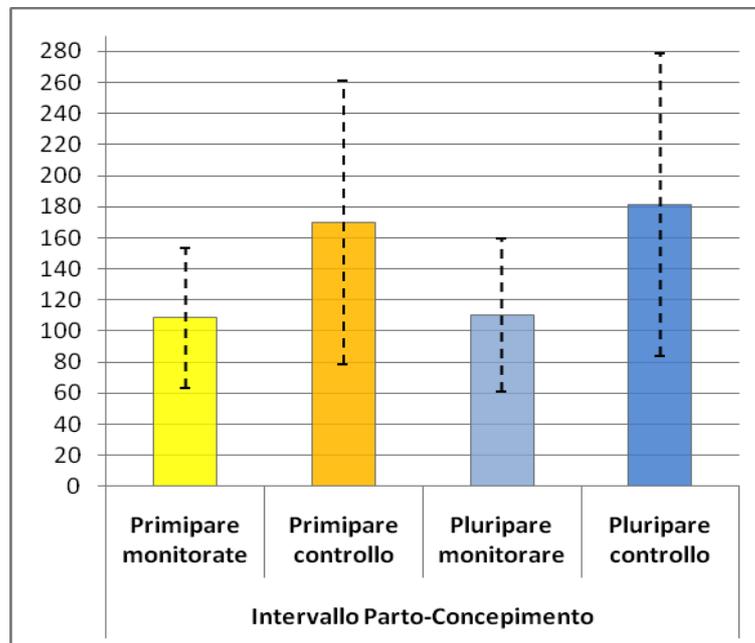


Grafico 3: media e Deviazione Standard degli Interventi Fecondativi per Concepimento durante lo studio.

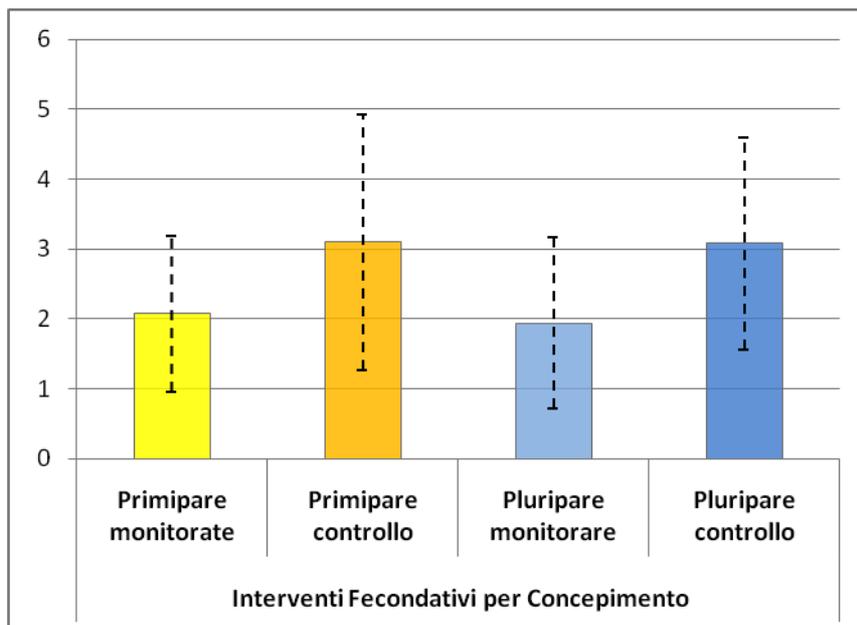


Grafico 4: Patologie *post-partum*

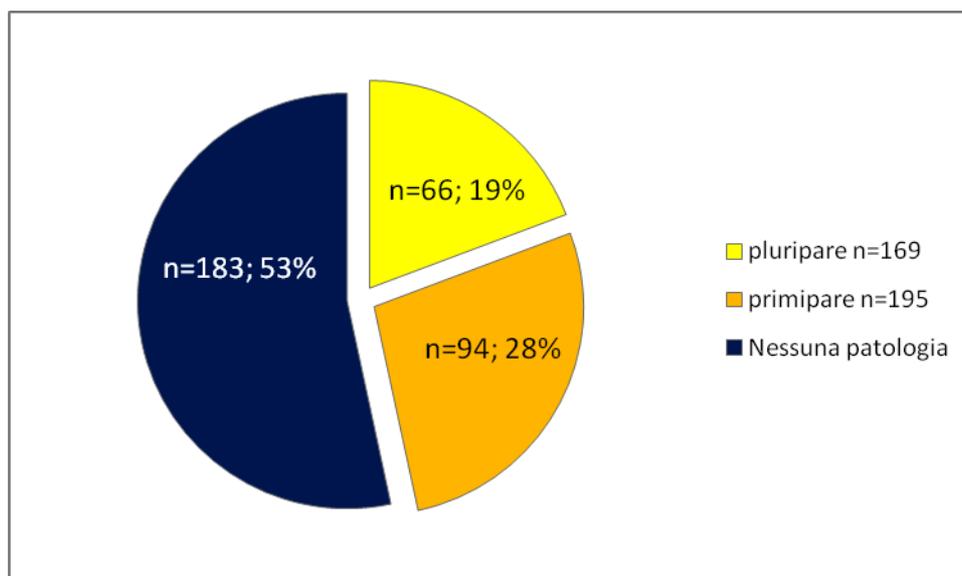
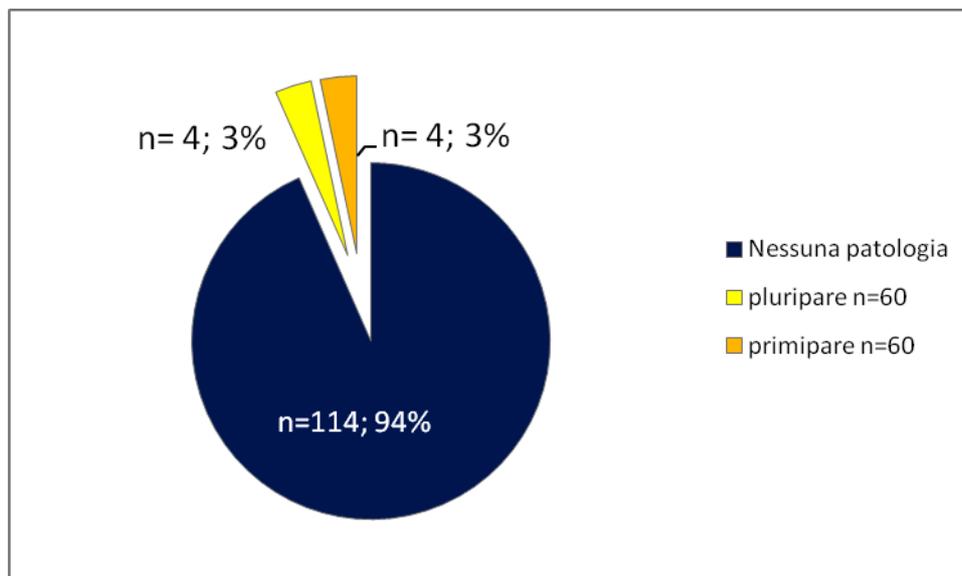


Grafico 5: Osservazioni delle patologie *post-partum* nel gruppo sperimentale e nel gruppo controllo

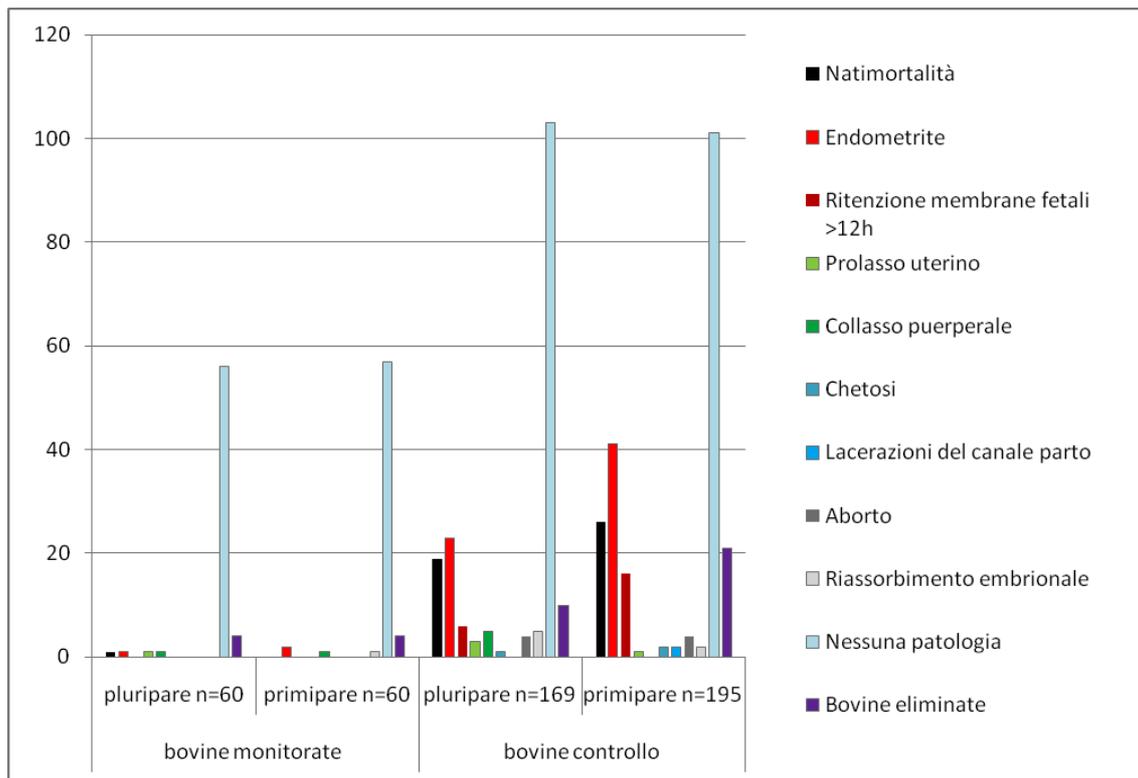


Tabella 1: Osservazioni e Classificazione delle cause di distocia in questo studio.

	Classe	Pluripare con assistenza n=60		Primipare con assistenza n=60	
		n°	%	n°	%
Nessuna assistenza ostetrica	0	46	76,6	40	66,7
Prolungamento seconda fase del parto	1	3	5	4	6,7
Disposizioni fetali anomale	2	9	15	11	18,3
Sproporzioni feto -pelviche	3	1	1,7	5	8,3
Torsione utero e stenosi cervicale	4	1	1,7	0	0

Tabella 2: Natimortalità e difficoltà al parto nelle bovine controllo (ottenuti dal software gestione dati stalla).

		Bovine controllo			
		vitelli		Parti gemellari	Parti singoli
		morto	vivo		
Facile	0	12	244	-	256
Parti gemellari		10	16	13	-
Parto difficoltà	1	7	69	-	76
Parti gemellari		2	10	6	-
Parto difficoltà	2	8	8	-	16
Parti gemellari		4	-	2	-
Taglio cesareo	3	2	-	-	2
Parti gemellari		-	-	-	-
Totali		45	347	21	350

Tabella 3: Patologie *post-partum*.

	bovine monitorate		bovine controllo	
	pluripare n=60	primipare n=60	pluripare n=169	primipare n=195
Natimortalità	1		19	26
Endometrite	1	2	23	41
Ritenzione membrane fetali >12h			6	16
Prolasso uterino	1		3	1
Collasso puerperale	1	1	5	
Chetosi			1	2
Lacerazioni del canale-parto				2
Aborto			4	4
Riassorbimento embrionale		1	5	2
Nessuna patologia	56	57	103	101
Bovine eliminate	4	4	10	21

BIBLIOGRAFIA

- **Aoki M. et al. (2005)**. Predicting time of parturition from changing vaginal temperature measured by data-logging apparatus in beef cows with twin fetuses. *Animal Reproduction Science* 86:1-12.
- **Bleul U. et al. (2006)**. Electrolytes in bovine prepartum mammary secretions and their usefulness for predicting parturition. *J. Dairy Sci.* 89:3059-3065.
- **Corrias A. – Martini I. (1965)**. Igiene della gravidanza e del parto nei bovini. Ed. Reda
- **Dematawewa et al. (1997)**. Effect of dystocia on yield, fertility, and cow losses and on economic evaluation of Dystocia scores for Holsteins. *J. Dairy Sci.* 80:754-761.
- **Djemali M., A. E. Freeman, and P. J. Berger. (1987)**. Reporting of dystocia scores and effects of dystocia on production, days open, and days dry from Dairy Herd Improvement data. *J. Dairy Sci.* 70:2127–2131.
- **Dufty J.H. (1971)**. Determination of the onset of parturition in Hereford cattle. *Aust. Vet. J.* 47,77-82.
- **Fujimoto Y. et al. (1988)**. Change in rectal temperature, and heart and respiration rate of dairy cows before parturition. *Jpn. J. Zootech. Sci.* 59,301-305.
- **Gundelach Y., Essmeyer K., Teltscher M.K., Hoedemaker M. (2009)** - *Theriogenology* 71:901–909
- **Knottenbelt D.C., Holdstock N., Madigan J.E. (2004)**. *Equine Neonatology Medicine and Surgery*. Saunders eds.

- **Mangurkar B.R., Hayes J.F., Moxley J.E. (1984).** Effects of calving ease-calf survival on production and reproduction in Holsteins. J. Dairy Science 67:1496-1509
- **Matsas D.J. et al. (1992).** Evaluation of an on-farm blood progesterone test for predicting the day of parturition in cattle. Theriogenology. 37(4):859-68.
- **Meyer C. L., Berger P. J., Koehler K. J., Thompson J. R., Sattler C. G. (2001).** Phenotypic Trends in Incidence of Stillbirth for Holsteins in the United States. J. Dairy Sci. 84:515–523
- **Paolucci et al. (2008).** Predicting time of parturition in Holstein Friesian cow by using C6 Birth Control®. Proceedings of XVI International Congress of Animal Reproduction, 13-17 July 2008 Budapest (Hungary)
- **Paolucci et al. (2009).** Ottimizzazione della gestione del parto per il miglioramento delle performance riproduttive nella bovina da latte. Proceedings of LXIII Congress of S.I.S.Vet. 2009, Udine (Italy)
- **Risco C.A. et al (2005).** Management of periparturient disorder in dairy cattle. Animal Practitioner. 21(2):503-21
- **Severidt J. et al (2002).** Educational tools for calving and calf care on dairy farm. J. Vet. Intern. Med. Mar-Apr;19(2):271-4
- **Shah K.D. et al. (2007).** Peripartum changes in plasma estrone sulphate and estradiol-17beta profiles associated with and without the retention of fetal membranes in holstein-friesian cattle. J Reprod Dev. 53(2):279-88.

- **Wright I.A. *et al.* (1988)**. Prediction of calving date in beef cows by real-time ultrasonic scanning. *Vet Rec.* 123(9):228-9.

CONCLUSIONE

I valori medi registrati dei diametri della VE nelle gestazioni interspecifiche, non hanno presentato differenze significative rispetto ai dati pubblicati da altri autori per le gravidanze equine e asinine (Ginther 1995; McKinnon *et al.*, 1988; Allen 1986; Bessent *et al.*, 1988; Gastal *et al.*, 1993; Meira *et al.* 1998). I dati relativi allo sviluppo embrionale sono sovrapponibili a quelli riportati da Bessent e Ginther (1988) per la specie equina e da Meira (1998) per quella asinina. Le valutazioni del profilo biofisico, del benessere fetale, dell'UFP e del sessaggio del feto sono risultate sovrapponibili ai precedenti studi condotti sul feto equino (Renaudin *et al.*, 2000; Bucca *et al.*, 2005;). La risposta della frequenza cardiaca all'attività fetale è un indice di stress più sensibile rispetto al suo rilevamento nei periodi di riposo (Vaala e Sertich, 1994); come nella valutazione del PBF in medicina umana, anomalie nella reattività cardiaca rispecchiano fenomeni di compensazione dello stato di parziale ipossia e acidosi metabolica che s'instaurano durante le disfunzioni patologiche placentari (Manning *et al.*, 1987). Essendo l'infezione ascendente la causa più frequente della placentite (Giles *et al.*, 1993; Ousey *et al.*, 2000), i segni clinici, quali l'aumento dello spessore complessivo utero-placentare e il distacco placentare, possono essere precocemente diagnosticati. La diagnosi precoce della disfunzione placentare e dello stato di sofferenza fetale consente di migliorare il management della gravidanza, del parto e del neonato, permettendo ove siano diagnosticate condizioni patologiche reali o potenziali per il feto l'apporto preventivo delle terapie atte a compensare la fattrice e il mantenimento della gravidanza. Inoltre, con l'obiettivo di tutelare la sopravvivenza dei neonati è possibile ottenere preventivamente

informazioni sullo stadio di sviluppo del feto e quindi dell'incompatibilità alla vita extrauterina, permettendo di programmare l'assistenza al parto in una struttura Clinica dotata di un reparto di terapia intensiva neonatale. In conclusione, l'esame ultrasonografico applicato alla valutazione del PBF, dell'UFP e dell'accrescimento fetale, rappresenta un'accurata metodica per la diagnosi di una gravidanza a rischio.

L'applicazione della tecnologia GSM è un affidabile strumento nel management e nell'assistenza della bovina al momento del parto, così come riportato per la specie equina, permettendo di conoscere con attendibilità l'inizio della fase espulsiva. In confronto ai diversi protocolli elencati nell'introduzione - monitoraggio ecografico della gravidanza, modificazioni della temperatura corporea, dosaggi di ormoni e degli elettroliti - che consentono la previsione della data del parto con l'approssimazione di circa 24 ore, il sistema applicato in questo studio, permette una precisa determinazione dell'inizio del travaglio. Il pronto intervento ostetrico e l'adeguata igiene del parto hanno consentito la prevenzione delle patologie correlate al parto distocico con conseguente miglioramento delle performance riproduttive e del benessere animale. La significativa riduzione della natimortalità denota l'importanza dell'assistenza perinatale ai vitelli, in particolare della pronta assunzione del colostro e quindi del successo nel trasferimento dell'immunità anticorpale. Dove il valore economico del vitello e/o della madre sia particolarmente elevato, quali figli e madri di tori, figli di trapianti embrionali, l'applicazione della tecnologia GSM può trovare già da ora un notevole interesse zootecnico. I risultati ottenuti hanno dimostrato la possibilità negli allevamenti di ridurre i costi di gestione sanitaria correlati alle patologie del *post-partum*, di ottimizzare il management dell'applicazione delle tecnologie riproduttive e di rimonta interne e di

incrementare gli indici qualitativi e produttivi dell'azienda. Gli autori del presente studio stanno attualmente sperimentando dei sistemi alternativi a quelli impiegati che abbiano costi di acquisto, gestione e applicazione compatibili con l'industria della produzione del latte.