



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

Corso di laurea in Medicina Veterinaria

## **ABORTO NELLA SPECIE CANINA**

## **ABORTION IN CANINE SPECIES**

Relatore:

Chiar.mo Prof. Enrico Bigliardi

Laureando/a:

Francesca Grapelli

ANNO ACCADEMICO

2021 / 2022



## Abstract

The reproductive activity of the bitch is regulated by the estrous cycle, which marks at intervals of 4-6-12 months the onset of oestrus, which usually occurs in spring and autumn; despite this, the bitch is considered a monoestrus unseasonally. The estrous cycle of the bitch is divided into follicular phase (proestrus and oestrus), lutein phase (metaestrus and diestrus) and anaestrus; ovulation occurs during oestrus, which progressively results in the bursting of the follicles and the release of the respective oocytes, which, once mature, can be fertilized by sperm. Canine pregnancy is sustained by progesterone secreted by the corpus luteum, prostaglandins, prolactin and LH and lasts 60-65 days, punctuated in the preimplantation, embryonic and fetal periods. Several causes can interfere with the physiological continuation of pregnancy, resulting in abortion. Abortion takes the form of embryonic reabsorption, i.e. reabsorption of pregnancy fluids within the first twenty-five days of pregnancy, or early or late abortion, if characterized by the expulsion of fetal structures and its adnexa within the time frame after twenty-five days after ovulation, during the embryonic or fetal period.

In this paper I have investigated one of the best-known causes of abortion in the canine species: Canid Herpesvirus-1, a sneaky virus, which, through the mechanism of latency, persists indefinitely in the host organism and, once it enters a population, is hardly eradicated. The best-known clinical forms are those in reproductive disorders such as embryonic resorptions, abortions, stillbirths, and neonatal death, but CaHV-1 is capable of manifesting itself in numerous clinical and subclinical forms due to the unpredictability with which it interfaces with the immune system. Herpetic infection is a current reality and can be found everywhere: variability in incidence of the virus worldwide has been shown to range from 60 to 85%.

# Indice

1. Fisiologia della riproduzione canina .....	5
1.1 Ciclo estrale .....	5
1.2 Gravidanza .....	10
1.2.1 Individuazione del momento dell'ovulazione.....	10
1.2.2. Fisiologia della gestazione .....	11
1.2.3 Diagnosi di gravidanza .....	17
2. Aborto .....	
2.1 Riassorbimento embrionale .....	28
2.2 Aborto precoce e tardivo.....	35
2.2.1 Cause non infettive .....	37
2.2.2 Cause infettive .....	44
2.2.3 Diagnosi di aborto.....	50
2.2.4 Prevenzione e terapia d'aborto .....	53
3. <i>Canid Herpesvirus- 1</i> .....	55
3.1 Generalità di CaHV-1 .....	55
3.2 Patogenesi .....	56
3.3 Forme cliniche e sintomatologia.....	60
3.4 Lesioni anatomo-patologiche .....	65
3.5 Diagnosi.....	69
3.6 Epidemiologia .....	75
3.7 Terapia e prevenzione .....	82
3.8 Conclusioni.....	87

# 1. Fisiologia della riproduzione canina

## 1.1 Ciclo estrale

L'attività riproduttiva della cagna è regolata dal ciclo estrale, che scandisce ad intervalli di 4-6-12 mesi la comparsa dell'estro, ossia il periodo di recettività sessuale della femmina. La variabilità della ciclicità risiede nella genetica di razza e di individuo, in particolare dal grado di risentimento del processo evuzionistico dell'addomesticamento: i canidi selvatici in natura sono dei monoestrali, presentando un solo estro all'anno, mentre nella specie addomesticata, che gode di attente cure e buona alimentazione, è possibile osservare, soprattutto nelle taglie grandi (come il Pastore Tedesco), anche la presenza di due o tre cicli estrali all'anno; nonostante ciò, comunque, la cagna è considerata una monoestrale non stagionale, con una concentrazione degli estri nei periodi primaverile ed autunnale (Sjaastad et al., 2013).

La pubertà è correlata al raggiungimento del 80% del peso corporeo, per cui compare in momenti diversi in base alla razza: i cani di piccola taglia presentano il primo estro all'età di sei o sette mesi e i cani di grande taglia fino a un anno di età. Una capacità riproduttiva ottima è però raggiunta solo al terzo o quarto calore, con un picco di fertilità a circa due anni di età, quando inizia a decrescere, con periodi interestrali più lunghi, maggiori probabilità di riassorbimenti embrionali, aborti e distocie (England e von Heimendahl, 2013).

Il ciclo estrale della cagna è suddiviso in cinque fasi: proestro ed estro, che costituiscono la fase follicolare, metaestro e diestro, che costituiscono la fase luteinica e l'anaestro. Le informazioni a proposito del ciclo estrale della cagna, esposte di seguito, sono riprese dal libro *Riproduzione e neonatologia del cane e del gatto* di Gary England e Angelika von Heimendahl, seconda edizione italiana a cura di Maria Carmela Pisu.

Queste fasi sono scandite dall'attività neuroendocrina dell'asse ipotalamo-ipofisario. Nell'ipotalamo, i neuroni endocrini, stimolati dal sistema nervoso centrale producono GnRH (Gonadotrophin Releasing Hormon). Attraverso il sistema portale ipotalamo-ipofisario, appunto, tale ormone raggiunge le cellule gonadotrope dell'adenoipofisi, che secernano così gli ormoni FSH (follicle-stimulating hormone) e LH (Luteinizing Hormone). Questi ormoni hanno come organo bersaglio le ovaie, in particolare l'FSH induce la secrezione degli estrogeni e quindi la follicologenesi, mentre l'LH determina l'ovulazione e concorrerà al mantenimento del corpo luteo.

Nel proestro, FSH e LH stimolano la crescita dei follicoli ovarici, che iniziano così la produzione degli estrogeni e dell'inibina, un inibitore selettivo della secrezione dell'FSH a livello ipofisario. Gli estrogeni follicolari promuovono l'aumento della vascolarizzazione e l'edema dell'apparato riproduttore, così come un aumento dell'epitelio ghiandolare. Ciò conduce ad una tumefazione delle vie genitali interne ed esterne, mentre all'interno dell'utero i capillari gemono in corrispondenza delle giunzioni endoteliali, determinando il passaggio di sangue. I segni clinici associati al proestro sono quindi le perdite ematiche più o meno visibili all'esterno (soprattutto se scarse, l'animale, leccandosi, le asporta completamente), l'edema della vulva e i cambiamenti comportamentali, quali eccitabilità, irrequietezza, disobbedienza, maggior attrazione del maschio, pur rifiutandolo. Il proestro dura circa nove giorni.

L'inizio dell'estro è sancito dall'inizio della prima accettazione del maschio, quando è imminente l'ovulazione, che avviene dal secondo al settimo sui nove di durata totale dell'estro; la cagna è una specie politoca onde per cui l'ovulazione si compone di più ondate ovulatorie, tante quante i follicoli maturi, distanziate da 48-72 ore. In modo peculiare nella cagna, quando inizia l'estro, il follicolo inizia a produrre già piccole quantità crescenti di progesterone che sanciscono

l'intensificazione della pulsatilità di secrezione del GnRH e quindi anche di FSH e LH (Concannon, 2009). Sotto lo stimolo ormonale, i 10-20 follicoli ovarici raggiungono la dimensione massima di 9-12 mm di diametro e producono il picco di estrogeni, che, a feedback negativo, sopprime le secrezioni di FSH e LH. A distanza di un giorno da tale picco, il progesterone ha raggiunto la concentrazione di 5-10 ng/ml e la secrezione dell'inibina inizia ad essere determinante nella maggior riduzione dell'FSH - e quindi degli estrogeni- rispetto all'LH: si innesca il picco ovulatorio dell'LH. L'ondata ovulatoria si protrae per 24-96 ore, a cui segue, per ciascun oocita, la fase di capacitazione di 24-48 ore, con la quale diventa cellula fecondante e la fase di fertilizzazione di 12-24 ore, che è l'unico intervallo di tempo in cui l'incontro tra lo spermatozoo e la cellula uovo esita in un concepimento. I sintomi clinici della fase estrale sono la progressiva diminuzione dell'edema vaginale e vulvare, la comparsa di uno scolo vulvare sieroso, di colore giallo paglierino e, eventualmente, macchiato da qualche goccia di sangue nella sola fase iniziale dell'estro. L'estro dura circa nove giorni.

Il metaestro rappresenta lo stadio iniziale della fase luteinica in cui ciò che resta del follicolo ovulatorio si trasforma in corpo luteo, ossia una ghiandola transitoria ovarica produttrice di progesterone. Tale fase luteinica è molto breve, tanto che a volte viene inglobata all'interno della fase successiva anche perché, a differenza di altre specie in cui dopo l'ovulazione c'è un improvviso declino del comportamento sessuale, che delinea in modo conclamato la fine della fase follicolare, nella cagna tale fenomeno è più diluito nel tempo.

Il diestro è la fase preponderante della fase luteinica del ciclo estrale e, eccezionalmente nella cagna, dura fino a 60-70-80 giorni, indipendentemente dall'instaurazione di una gravidanza, causando la frequente patologia della pseudogravidanza o gravidanza isterica della cagna. In questo lasso di tempo, i fattori luteotrofici, ossia l'LH e la prolattina, fanno sì che il corpo luteo si

accesca notevolmente, intensificando la sua attività secretoria. Il progesterone arriva alla concentrazione sierica di 25 ng/ml e determina quindi: il rilassamento della muscolatura liscia dell'apparato riproduttore; la secrezione di un secreto vaginale e vulvare mucoso che chiude la cervice, isolandola dall'ambiente esterno, in preparazione all'annidamento dell'embrione; la regressione dei nuovi follicoli ovarici che contemporaneamente si accrescono; la secrezione da parte delle ghiandole endometriali del latte uterino. La prolattina inizia ad essere prodotta dall'adenoipofisi a partire dal venticinquesimo giorno del diestro e, insieme al progesterone, sostiene in modo determinante l'eventuale gravidanza; è prodotta fino alla fine della lattazione poiché regola anche lo sviluppo e la maturazione della ghiandola mammaria.

Normalmente, nei mammiferi a ciclo estrale, l'esito della fecondazione determina il quadro endocrinologico della femmina: la blastocisti che si annida dà inizio al fenomeno di riconoscimento materno di gravidanza, onde per cui il corpo luteo persiste a secernere il progesterone, consentendo la portata a termine della gravidanza; il mancato annidamento invece non blocca l'attività della prostaglandina  $F2\alpha$  endometriale ( $PGF2\alpha$ ), che vasocostringe l'arteria centrale del corpo luteo facendolo regredire a corpo cicatriziale albicante. Nella specie canina invece, indipendentemente dall'instaurarsi o meno della gravidanza, la luteolisi non è immediata, ma progressiva, per cui il corpo luteo persiste per un periodo variabile - 60 giorni nelle cagne gravide e 70-80 giorni nelle cagne non gravide - per effetto della prolattina ipofisaria e per l'assenza della  $PGF2\alpha$  uterina (Kowalewski et al., 2020). Questa condizione determina la pseudogravidanza o gravidanza isterica, una patologia che comporta una scarsa o moderata galattorrea e ginecomastia e comportamenti materni più o meno spiccati (per esempio fare i buchi, creare un nido, accudire oggetti inanimati); questa peculiare patologia canina ha una eziologia probabilmente evoluzionistica, in quanto nel branco di lupi, anche le lupo non fecondate dal maschio dominante si sincronizzavano con le altre fecondate, potendo così

prendersi cura anch'esse dei cuccioli partoriti. La pseudogvidanza può risolversi autonomamente con la fine del diestro, pur aumentando le probabilità di sviluppo del complesso dell'iperplasia cistica endometriale-piometra o con un trattamento farmacologico a base di antiprolattinici, come la cabergolina.

L'anaestro segue il diestro ed è caratterizzato da un'interruzione temporanea dell'attività ovarica efficace, poiché sono presenti comunque delle fluttuazioni degli ormoni FSH e LH, ma sono talmente deboli da non riuscire a portare a maturazione le ondate follicolari. L'anaestro nella cagna gravida è l'intervallo tra il parto e il proestro, poiché comprende anche la lattazione e lo svezzamento. La durata di tale periodo varia molto in base alla razza canina: 3-4-5 mesi.

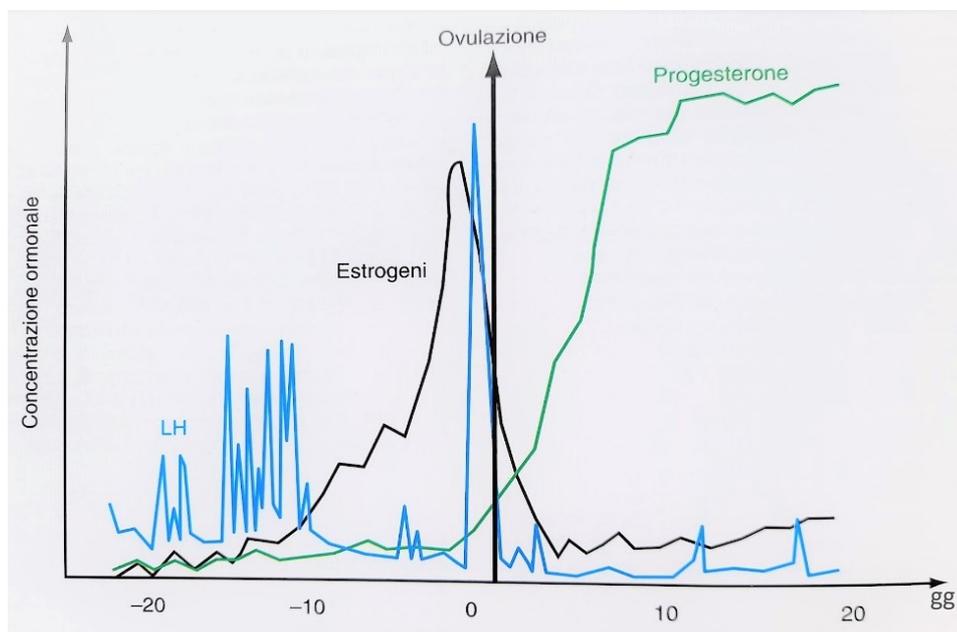


Figura 1. Schema degli ormoni durante il ciclo estrale della cagna.  
England G., von Heimendahl A., 2013 Riproduzione e neonatologia del cane e del gatto, seconda edizione, E.V. Soc. Cons. a.r.l., traduzione italiana a cura di Pisu M.C.

## 1.2 Gravidanza

### 1.2.1 Individuazione del momento dell'ovulazione

Le informazioni di seguito sono tratte dal libro *Manuale di ostetricia e neonatologia del cane e del gatto* di Manuela Farabolini.

È di fondamentale importanza conoscere il momento esatto per far coprire la cagna o per eseguire l'inseminazione artificiale. L'ovulazione avviene a distanza di uno o tre giorni dall'inizio dell'estro, ossia quando la caduta degli estrogeni ha comportato una riduzione dell'edema vulvare e vaginale, con una concentrazione di progesterone di 5-10 ng/ml e con il raggiungimento del picco dell'LH che, per quanto pulsatile, dura 24-72 ore. Il medico veterinario, per conoscere il momento più propizio per la fecondazione, ha a disposizione tre strumenti: la citologia vaginale, l'endoscopia vaginale e la misurazione della concentrazione sierica del progesterone.

La citologia vaginale si esegue inserendo un tampone nella vagina più craniale, con l'aiuto eventualmente di un forcipe cervicale e raccogliendo il materiale di sfaldamento della mucosa vaginale; poi, una volta preparato il vetrino con una colorazione senza fissazione, il campione viene osservato al microscopio: la quantità e la tipologia delle cellule dell'esfoliato vaginale permetteranno l'identificazione della fase del ciclo estrale nel quale la cagna si trova. Per opera degli estrogeni, che accelerano il turn over cellulare, nella fase dell'estro, si individuerà una maggioranza di cellule superficiali nucleate e non nucleate, senza presenza di emazie. Per ottenere un quadro chiaro, indicante sicuramente la fase estrale, è opportuno procedere alla ripetizione seriale di più citologici, così da monitorare il procedere rapido del quadro ormonale.

L'endoscopia vaginale è una tecnica oggi poco usata per scopo riproduttivo, tuttavia fornisce qualche indicazione: nella fase proestrile, si osservano le perdite ematiche e le pliche del soffitto

vaginale che raggiungono una tumefazione tale da costituire la formazione di tre tubercoli, il craniale, il mediale e il caudale; nella fase estrale, l'ipertrofia della mucosa inizia a ridursi fino a recuperare la configurazione iniziale, che permette l'ingresso del pene o del catetere di fecondazione.

Queste tecniche strumentali permettono solo di distinguere l'estro dalle altre fasi del ciclo estrale, per cui è necessaria la misurazione di un parametro ematico che fornisca un'indicazione oggettiva dell'imminente ovulazione: il progesterone è il parametro scelto, perché, rispetto all'LH, ha un'emivita lunga e una secrezione non pulsatile. Quando il progesterone è in concentrazione di 5-10 ng/ml, l'ovulazione è imminente.

### **1.2.2. Fisiologia della gestazione**

L'ovulazione non è sincrona per tutti i 10-20 follicoli, ma si distribuisce in un lasso di tempo di 24-96 ore e permette quindi alla cagna di avere più accoppiamenti fecondanti (Sjaastad et al., 2013). Dopo la sua fase di capacitazione (24-48 ore), l'oocita rimane fertilizzabile per un massimo di 48 ore, per cui, considerando che lo spermatozoo canino ha un'emivita minima di 12-24 ore se scongelato e massima di sette giorni se a temperatura ambiente (Concannon, 1989), la fecondazione sarebbe ottimale avvenisse dopo 24-36 ore dall'ovulazione e ripetuta dopo 48 ore. A livello dell'ovidutto femminile, la fusione del pronucleo dello spermatozoo con quello della cellula uovo sancisce la fecondazione e l'inizio della gravidanza. La gravidanza canina dura  $63 \pm 2$  giorni, se calcolati dal giorno dell'ovulazione o 56-72 giorni, se calcolati dal momento dell'accoppiamento. La gravidanza è sostenuta dalla secrezione di progesterone per opera del corpo luteo, sostenuto dall'attività delle prostaglandine, dalla prolattina e dall'LH. Il progesterone è presente in concentrazioni sieriche variabili tra i 40-70 ng/ml per tutta la durata della gravidanza, mentre inizia a calare fino ai valori basali di 1-2 ng/ml solo 24 ore prima del

parto; è di origine solamente ovarica: questa è una peculiarità della specie canina. Il progesterone serve al mantenimento dell'integrità placentare e allo sviluppo dell'endometrio, inibendone l'attività contrattile e stimolando la secrezione delle cellule ghiandolari endometriali, atte alla produzione del latte uterino. L'importanza del progesterone nel mantenimento della gravidanza è ulteriormente dimostrata dalla cascata ormonale preparto indotta dalla riduzione drastica della progesteronemia. Verso il sessantesimo giorno di gravidanza ha inizio nella cagna gravida un'intensa regressione del corpo luteo con calo brusco del progesterone (Nohr et al., 1993), dando inizio alla cascata luteolitica preparto. La luteolisi subisce un'accelerazione nel momento in cui l'adenipofisi fetale, sotto lo stimolo da stress per la crescita ultimata e l'ipossia, inizia a produrre alti livelli di cortisolo fetale. La lisi del corpo luteo si completa per opera essenzialmente della prostaglandina  $PGF2\alpha$ , prodotta come tale dal trofoblasto fetale e come risultato della conversione della prostaglandina  $PGE2$  placentare; l'ossitocina, oltre a determinare le contrazioni miometriali, induce anche la sintesi di queste prostaglandine (Kowalewski et al., 2020).

Nelle prime tre o quattro settimane di diestro – e quindi di possibile gestazione -, la regolazione e il mantenimento del corpo luteo sono gestite dalla funzione auto/paracrina delle prostaglandine prostaglandina sintasi 2 (COX2) e prostaglandina E2 (PGE2), che modulano la steroidogenesi luteale, l'espressione dei recettori luteali dell'endotelina (un potente vasodilatatore) e della prolattina (Kowalewski et al., 2020). Questa indipendenza transitoria dall'ipofisi è stata dimostrata *in vitro*, sfruttando tecniche diagnostiche di PCR e di citofluorimetria e *in vivo*, osservando che un'ipofisectomia in una cagna in diestro precoce ha effetti solo temporaneamente sui livelli circolanti di progesterone, che rientrano a livelli normali entro i successivi sei o dieci giorni dall'intervento (Kowalewski et al., 2020).

Dal venticinquesimo giorno di diestro, è la prolattina secreta dall'adenoipofisi a diventare un fattore luteotrofico indispensabile, tanto che la sua carenza indurrebbe l'aborto; la prolattina, tuttavia, non può essere utilizzata come marker precoce di gravidanza, poiché fino alla seconda metà della gravidanza è presente in concentrazioni uguali sia nella cagna gravida che non gravida, ossia in pseudogravidanza (Kowalewski et al., 2020).

L'LH ha un'azione importante, pare, solo dopo i primi quindici giorni di ovulazione (Farabolini et al., 2010).

La gestazione è stata suddivisa da Phemister (Phemister, 1974) in tre periodi, considerando come giorno 0 il picco di LH:

- Il primo periodo va dal giorno 0 al 17°-19° giorno ed è chiamato di preimpianto;
- Il secondo periodo va dal 19° giorno al 35° giorno ed è chiamato periodo embrionale;
- Il terzo periodo va dal 35° giorno fino al parto ed è chiamato periodo fetale;

Il primo periodo inizia con le divisioni mitotiche dello zigote, che costituiscono la segmentazione, e culminano con la formazione della blastocisti espansa e si conclude con la fissazione e l'impianto della blastocisti nell'endometrio. Durante la sua migrazione lungo l'ovidutto, la blastocisti si nutre delle proprie risorse interne, dopodiché, una volta raggiunto l'utero, si alimenta del latte uterino in attesa dello sviluppo della placenta. Il periodo di preimpianto è molto delicato in quanto la blastocisti è libera, priva di protezione e strettamente dipendente dalla progesteronemia, tantoché non sono infrequenti riassorbimenti embrionali. Nella cagna le varie blastocisti, grazie alle contrazioni uterine, si ripartiscono lungo tutta la lunghezza delle corna uterine, a distanza regolare e simmetrica; una disposizione asimmetrica deve far sospettare un riassorbimento embrionale.

Nel secondo periodo, la blastocisti espansa evolve in bottone embrionale e in trofoblasto: il bottone embrionale è una struttura trilaminare da cui originano i tre foglietti embrionali (ectoderma, mesoderma, endoderma) della gastrulazione, mentre il trofoblasto è la struttura da cui originano gli annessi embrionali (corion, allantoide, amnios e sacco vitellino; figura 2), necessari alla placentazione. Al ventesimo giorno di gestazione, le estroflessioni digitiformi corioniche non sono vascolarizzate dall'allantoide, che è ancora in fase di crescita e né tanto meno è presente il cordone ombelicale formato (Migliano et al., 2006). Al ventiquattresimo giorno, l'embrione e gli annessi fetali sono ben distinguibili e la placenta, l'organo che garantisce la connessione vascolare stabile tra l'embrione e la madre, inizia a funzionare (Migliano et al., 2006). La placenta canina è una placenta zonata equatoriale (possiede agli estremi il corion liscio e all'equatore il corion villosa), endocoriale e decidua (figura 3). Ogni embrione ha la propria placenta, indipendente dalle altre. A distanza di venticinque giorni dall'ovulazione, inizia a comparire nel circolo ematico la relaxina. Il periodo embrionale termina con la fine dell'organogenesi. Il periodo embrionale è tanto importante quanto il precedente perché vede il verificarsi del fenomeno di riconoscimento materno di gravidanza. Tale fenomeno si basa sul cambiamento prima biochimico e poi morfologico delle componenti stromali endometriali, che costituiscono la decidualizzazione placentare (Kowalewski et al., 2020). In sintesi, l'erosione profonda dell'endometrio, da parte del trofoblasto fetale, garantisce un intimo rapporto tra il *conceptus* e l'utero, che, se assente, comporta l'aborto. La decidualizzazione è il risultato dell'attività coenergica tra l'attivazione dei recettori prolattinici uterini e il contatto tra l'embrione libero in procinto di annidarsi nell'endometrio: si scatena una risposta biochimica di tipo infiammatorio e/o immunomodulante. Tale risposta biochimica si basa sulla modifica delle cellule endometriali in cellule deciduali, che attivano più di quattrocento geni utili all'attività mitocondriale e di trascrizione e traduzione: le cellule deciduali esprimono ulteriori recettori per

la prolattina, ma anche per l'ossitocina e il progesterone; producono fattori di crescita insulino-simili e del sistema vascolare endoteliale VEGF; sintetizzano enzimi di sintesi per le prostaglandine; infine, liberano in circolo proteine di fase acuta (APPs), come il fibrinogeno,  $\alpha$ 2-globulina, la proteina C-reattiva e il siero amiloide, che attivano la diapedesi e il complemento. La risposta biochimica causa conseguentemente la risposta morfologica: la matrice extracellulare dell'endometrio e i collagene si rimodulano, al fine di permettere un impianto ottimale per l'embrione. La protezione degli embrioni impiantati è garantita dal passaggio di eventi pro-infiammatori ad antinfiammatori, che si realizza per gli effetti immunosoppressivi e immunomodulatori del progesterone e della prolattina, ossia con una maggior presenza di linfociti Treg, Natural Killer, una diminuzione dei livelli dei recettori MHCII o CD4 e un incremento delle interleuchine antinfiammatorie IL-4 e IL-10 (Pereira et al., 2019).

Nel periodo fetale, il feto acquisisce le caratteristiche morfologiche tipiche della specie canina: sviluppo della pigmentazione, crescita dei peli e degli artigli, chiusura della palpebra, crescita dell'orecchio esterno, allungamento del tronco e differenziazione del sesso (Miller's Anatomy of the Dog, Semantic Scholar, 1993). Al quarantacinquesimo giorno, il sacco allantoideo raggiunge dimensioni prominenti dovute all'incremento della taglia del feto e allo sviluppo della vascolarizzazione, come risposta alla maggior richiesta nutrizionale (Miglino et al., 2006).



*Figura 2*

*In figura A si osserva un feto di cane, di circa 40 giorni, dopo rimozione di membrana corion-allantoidea e amnios; si evidenzia molto bene il cordone ombelicale che si inserisce a livello della placenta.*

*Enrico Bigliardi Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie Università di Parma, 2021.*

*In figura B si osserva un feto di cane, di circa 40 giorni, avvolto nel sottile e piccolo amnios; è stata rimossa la membrana corion-allantoidea.*

*Enrico Bigliardi; Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie Università di Parma, 2021.*

### **1.2.3 Diagnosi di gravidanza**

Per ottenere una corretta e precisa diagnosi di gravidanza si dovrebbe conoscere esattamente il momento della fecondazione; si deduce che nel caso della fecondazione artificiale, con le tecniche diagnostiche prima citate, ci si baserebbe sull'individuazione del momento dell'ovulazione per il conteggio dei giorni della gravidanza, mentre nel caso della monta naturale, risalire al momento dell'accoppiamento fecondante è molto difficile, se non impossibile, considerando anche la lunga vitalità degli spermatozoi. A tale difficoltà si aggiunge il fattore genetico perché ogni razza canina ha una durata media di gravidanza: nel Boxer è di 63,5 giorni, nel Collie è di 62,4 giorni e nel Pastore Tedesco è di 62,1 giorni (Studnicki et al., 1975). La diagnosi di gravidanza quindi, soprattutto se precoce, deve essere eseguita secondo le tempistiche richieste dalle varie tecniche diagnostiche, facendo riferimento alla presunta data di ovulazione, ma aggiungendo al calcolo dell'età della gravidanza sempre tre o quattro giorni come possibile margine di errore. Per esempio, sapendo che l'esame ecografico permette il riconoscimento della gravidanza a partire dal diciannovesimo giorno circa dall'ovulazione, non trovare alcun segno ecografico di vescicola embrionale, all'intervallo indicato, in una cagna presunta gravida, non deve escludere la possibilità che possa esserlo comunque; il medico veterinario deve prescrivere un ulteriore esame ecografico dopo tre o cinque giorni per avere la certezza diagnostica. La diagnosi di gravidanza precoce viene spesso richiesta dagli allevatori per consentire loro di pianificare le vacanze con l'arrivo delle cucciolate, per decidere se accoppiare altre cagne o semplicemente per curiosità. Per diagnosi precoce si intende verso il ventesimo giorno di gravidanza.

La diagnosi di gravidanza può essere eseguita attraverso metodi diversi, ciascuno con i relativi vantaggi e svantaggi: osservazione delle modificazioni fisiche, palpazione addominale, esame ecografico, esame radiologico, esame del sangue.

L'osservazione delle modificazioni fisiche è il metodo più semplice, più economico, più rapido e alla portata di tutti. Alcuni segni precoci possono essere la tumefazione persistente della vulva con occasionale e scarso scolo vulvare mucoide od emorragico, un modico aumento dei capezzoli, che diventano più rosati e segni di malessere generale. Alla quinta settimana, le mammelle sono molto gonfie, lo scarso scolo vulvare è sieroso e trasparente, il malessere generale persiste, dovuto probabilmente all'aumento di pressione esercitata dalla distensione dei corni uterini sul diaframma e si osserva anche una notevole distensione addominale con un iniziale aumento di peso, che potrà incrementarsi fino al 50% del peso iniziale in funzione del numero di feti (Farabolini et al., 2010). Alla settima settimana, si possono percepire i primi movimenti fetali e solo sette giorni prima del parto inizia ad essere presente il colostro (England e von Heimendahl, 2013). Tanto semplici all'osservazione, tanto fuorvianti sono queste mutazioni fisiche, che si manifestano in egual modo anche nella cagna in pseudogravidanza: le modifiche fisiche della ghiandola mammaria e dell'addome non sono patognomoniche di gravidanza e per questo non possono dare diagnosi di certezza, ma solo di sospetto.

La palpazione addominale è un esame clinico attendibile e molto semplice da eseguire, anche se richiede la collaborazione e un basso o normale BCS della paziente e soprattutto una buona esperienza del medico. Una palpazione attendibile può essere eseguita solo a partire dal venticinquesimo giorno di gravidanza presunta, perché le vescicole embrionali sono circa una decina, di forma sferica con 15-30 mm di diametro, turgide e lisce al tatto e percepibili come entità separate, a disposizione simmetrica lungo i corni uterini a formare la cosiddetta "corona

di rosario". La palpazione transaddominale dell'utero a ventotto giorni ha un'attendibilità, se positiva, del 87-88% e, se negativa, del 73% (Farabolini et al., 2010): è possibile, infatti, confondere le vescicole embrionali con dei fecalomi, nonostante essi siano meno numerosi e dalla superficie meno liscia, ma come detto, l'esperienza del medico è fondamentale. Eseguendo questo esame dopo i trentacinque giorni, l'attendibilità cala drasticamente perché le camere gestazionali aumentano di volume, si avvicinano tra loro e rendono così l'utero di conformazione simile all'intestino. Questo metodo diagnostico non permette una diagnosi precoce e nemmeno di certezza e, inoltre, non fornisce indicazioni né sulla vitalità né sul numero dei feti.

L'esame del sangue nella cagna gravida è volto all'individuazione della relaxina perché nessun altro test endocrino può essere preso in considerazione, in quanto nessun altro ormone subisce delle variazioni significative per poter discriminare uno stato gravidico dalla non gravidanza (Farabolini et al., 2010). L'eccezione è appunto la relaxina, l'unico ormone conosciuto gravidanza-specifico della cagna. Sembra essere prodotto quasi esclusivamente dalla placenta al venticinquesimo giorno dall'ovulazione e alcune evidenze indicano valori più elevati nelle cagne con cucciolate più numerose, a causa del maggior volume delle placenti. Raggiunge il picco a due o tre settimane prima del parto, per poi iniziare a decadere in pochi giorni. La reale funzione di tale ormone è però limitata alla fase preparatoria del parto, perché determina l'ammorbidimento del tessuto connettivo fibroso (England e von Heimendahl, 2013). È possibile dosare la relaxina su plasma o su siero, utilizzando dei kit commerciali per il test di immunoassorbimento enzimatico (ELISA). Essendo un ormone completamente assente prima dei venticinque giorni dall'ovulazione, è molto importante ripetere il test dopo tre o cinque giorni in caso di negatività per i motivi prima detti a proposito dell'impossibilità di conoscere l'esatto momento dell'ovulazione. Questo metodo diagnostico è molto semplice ed economico, ma non fornisce alcuna informazione sullo stato di salute della gravidanza: un aborto precoce o tardivo è rilevato

come positività a relaxina, nonostante questa stia già calando in concentrazione con l'inizio della degradazione placentare.

L'esame del sangue nella cagna gravida mette in evidenza l'alterazione di altri parametri ematici: una diminuzione dell'ematocrito e un'anemia normocitica e normocromica, un modesto aumento dei leucociti e l'aumento considerevole delle proteine di fase acuta (APPs), che sono indice della decidualizzazione e quindi dell'impianto embrionale. Tra le APPs le due più interessanti sono la proteina C-reattiva, che dal punto di vista pratico è però difficile da rilevare e il fibrinogeno, che sale a concentrazioni significative a partire dalla quarta settimana dall'ovulazione (Farabolini et al., 2010). Le APPs sono state studiate come potenziali markers di gravidanza nella cagna per l'importanza che rivestono nel processo di riconoscimento materno di gravidanza, tuttavia, non si può eludere la loro mancata specificità per l'instaurazione di una gravidanza, perché sono molecole che intervengono primariamente e in gran numero anche nelle infiammazioni, di qualsiasi tipologia. Considerando quindi che i livelli delle APPs sono altamente dipendenti dallo stato di salute della cagna, per utilizzarli come fattori diagnostici dovrebbero essere accompagnati dall'esecuzione di altri esami collaterali, al fine di escludere la presenza di un'infiammazione (Kowalewski et al., 2020).

L'esame radiografico è più economico di quello ecografico e permette un conteggio piuttosto accurato del numero di feti e la determinazione della loro posizione al parto, ma è tossico, non offre certe indicazioni sulla vitalità dei feti e soprattutto è sensibile solo a partire dai quaranta o quarantadue giorni di gravidanza presunta. Già dal ventunesimo giorno di gravidanza si può osservare un aumentato profilo dell'utero, che è assimilabile però a qualsiasi altra causa di aumento di volume; una diagnosi positiva richiede la mineralizzazione dello scheletro fetale, che solo verso i quarantatré giorni di gravidanza lo rende sufficientemente radiopaco da essere individuabile in radiografia. Per il conteggio dei feti, è consigliabile la radiografia laterale così da

evitare sovrapposizioni con la colonna vertebrale materna e poter così contare i crani dei feti; solo in talune circostanze, in cui i crani non si identificano facilmente, si contano le colonne vertebrali. A proposito della vitalità dei feti, l'individuazione di gas radiotrasparente all'interno del profilo fetale e posizioni anomale assunte della colonna vertebrale possono essere indice di mortalità fetale o essere semplicemente il risultato di un limite intrinseco di una diagnostica bidimensionale, onde per cui è necessario provvedere ad ulteriori esami collaterali. Un uso frequente del radiologico veniva fatto soprattutto in passato, quando si mostravano problemi al parto, la cui natura era sconosciuta: una radiografia poteva essere eseguita in rapidità, a basso costo e con l'esclusione di una serie di problematiche gravi, ma facilmente individuabili in radiografia. La scomparsa improvvisa di cuccioli nel box parto e il rinvenimento di ossa nello stomaco sono fattori indicanti il cannibalismo; un parto che non si innesca e la difficoltà a riconoscere un feto nella sua interezza nella radiopacità uterina diffusa è un fattore indicante macerazione fetale; una distocia che rallenta l'espulsione dei feti viene compresa in radiografia come l'esito di una deformazione fetale o di una posizione anomala del feto o di mortalità fetale.



*Figura 3. Radiografia di una cagna gravida di almeno 42-45 giorni: è possibile osservare lo scheletro mineralizzato dei due feti.*

*Enrico Bigliardi; Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie Università di Parma, 2021.*

L'esame ecografico è oggi il metodo più utilizzato: a fronte di un costo maggiore rispetto alle altre tecniche diagnostiche, fornisce informazioni precise e chiare, anche a proposito della vitalità dei feti e all'organogenesi e permette, infine, di eseguire una diagnosi precoce. È un esame che acquista di sensibilità già al diciannovesimo giorno dall'ovulazione, benché possa richiedere all'operatore la pazienza di individuare le vescicole embrionali, a maggior ragione quando non si è certi del momento esatto della fecondazione, per cui ripetere l'esame una seconda volta a distanza di tre o cinque giorni è sempre consigliato. Non è un esame adatto al conteggio dei feti, che, muovendosi, sfuggono velocemente dalla finestra ecografica. La diagnosi di gravidanza ecografica ha un'attendibilità del 94-98% quando effettuata dopo ventiquattro o venticinque giorni di gestazione e del 99% se effettuata dopo il ventottesimo giorno di gravidanza; l'attendibilità nel predire il numero dei feti è solo del 31,8-36%, con una maggiore probabilità di sovrastima nelle cucciolate poco numerose e, al contrario, di sottostima nel caso di cucciolate molto numerose (Farabolini et al., 2010). Si utilizza un ecografo con scanner B-mode real time in scala di grigi, spesso associato al Color Doppler pulsato e al Power Doppler pulsato, che consentono di approfondire aspetti della vascolarizzazione, come la frequenza cardiaca o la velocità dei flussi sanguigni; le sonde sono di solito lineari, a 5 MHz o 7,5 MHz.

Con l'ecografia è possibile ottenere molte informazioni, come quelle a proposito della vitalità del feto e dell'organogenesi, però non sono ottenibili tutte fin da subito: alcune strutture vitali sono ancora in fase di sviluppo, mentre altre ancora acquisiscono determinate caratteristiche rilevabili dall'ecografo solo in un secondo momento (tabella 1).

Strutture fetali rilevate	Giorni dall'ovulazione
Blastocisti	18-20
Placenta	Linea sottile ecogena: 20-22 Inserzione placentare: 25-28
Embrione a livello dell'equatore nella camera gestazionale	25-31
Sacco vitellino	23-26
Cordone ombelicale	26-28
Battito cardiaco	21-23
Arti abbozzati	31-31
Diametro biparietale del cranio	32-33
Movimenti fetali	32-34
Stomaco	34-37
Vescica	33-37
Polmoni iperecogeni rispetto al fegato	36-40
Fegato ipoecogeno rispetto all'addome	37-45
Occhi	37-45
Intestino	55-61

*Tabella 1. Rilievi ecografici fetali ed età gestazionale corrispondente nella cagna.*

*Farabolini M., Majolino G., Spallarossa M., Zambelli D., 2010 Manuale di ostetricia e neonatologia del cane e del gatto. Milano, Elsevier Masson.*

A partire dal diciannovesimo giorno, le blastocisti hanno un diametro di circa 7 mm e una lunghezza di 15 mm, per cui è possibile individuarle: si riconoscono per la struttura circolare anecogena, limitata da un anello iperecogeno, rappresentato dall'anello trofoblastico e così inserita nella parete uterina.



*Figura 4. Vescicola embrionale di 17 giorni. Tra la parete dell'utero e la parete anecogena c'è un anello iperecogeno rispetto al liquido, che è l'anello trofoblastico.*

*Enrico Bigliardi; Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie Università di Parma, 1998*

La placenta appare all'inizio come una sottile linea iperecogena e solo al ventiseiesimo giorno di gravidanza circa si struttura come placenta zonata, con un riconoscibile corion liscio e villosa.

All'interno della placenta è possibile individuare l'embrione, che si presenta come una piccola massa ecogena ed amorfa che galleggia nel sacco allantoideo; il sacco vitellino è ormai già in fase di riassorbimento, per cui è piccolo e difficile da rilevare con l'ecografo. Il liquido allantoideo deve essere puramente anecogeno e in abbondante quantità e le camere gestazionali devono essere circa delle medesime dimensioni.

L'ecografo ha la capacità di misurare le strutture che rileva, da cui si ottengono i cosiddetti rilievi biometrici fetali, i più importanti sono il diametro interno della vescicola embrionale, il diametro biparietale del cranio, il diametro esterno dell'utero e la porzione profonda della vescicola telencefalica (tabella 1). Dopo studi statistici, sono state elaborate delle formule matematiche che consentono il conteggio dell'età gestazionale partendo dalla misurazione di tali rilievi biometrici (Lopate, 2008).

Con le misurazioni ecografiche, è molto importante ricordare che mentre all'inizio la vescicola embrionale è sferica, dopo si allunga e acquisisce una forma più allungata.

L'esame ecografico è dipendente dall'operatore, che deve avere buona esperienza, non solo per le manualità richieste, ma anche per il riconoscimento degli artefatti ecografici (England, 1998): il side lobe causa un aumento di ecogenicità ai fluidi circostanti il *conceptus*, facendo crescere erroneamente il sospetto di riassorbimento embrionale; al trentesimo giorno di gravidanza, è molto comune il collasso e il corrugamento del sacco vitellino, che assume così delle forme strane, che facilmente vengono assimilate ad una degenerazione o ad una frammentazione dell'embrione.

Con la tecnica del Color Doppler pulsato è possibile anche visionare il cuore e vasi sanguigni, studiandone direzione e velocità dei flussi; studi fatti dall'Università di Perugia nel 2006 (Di Salvo et al., 2006) hanno evidenziato che alla quinta settimana:

- le arterie utero-placentari hanno un picco di velocità sistolica (PSV: Peak Systolic Velocity) media di 23,65 cm/s, una velocità finale diastolica (EDV: End Diastolic Velocity) media di 11,89 cm/s e un indice di resistenza (RI: resistance index\*) di 0,5 cm/s.
- L'arteria ombelicale ha un PSV media di 22,04 cm/s, una EDV media di 0 cm/s e un RI di 1 cm/s
- L'aorta fetale ha un PSV media di 4,39 cm/s, una EDV media di 0,16 cm/s e un RI di 0,99 cm/s
- La vena cava caudale ha un PSV media di 14,74 cm/s, una EDV media di 0,9 cm/s e un RI di 0,94 cm/s

\*Resistance index è calcolato con la formula:  $[(PSV - EDV)/PSV]$

Il battito cardiaco rimane però il parametro più valutato al fine di comprendere la vitalità dei feti: una frequenza cardiaca media fisiologica si aggira tra i 180 e i 220 battiti al minuto.

## **2. Aborto**

La gravidanza patologica può esitare nell'aborto. L'aborto può avvenire durante la gestazione e configurarsi come riassorbimento embrionale, aborto precoce o aborto tardivo, con la possibile ritenzione fetale; può anche avvenire al termine della gravidanza, ossia al momento del parto, e allora il feto è definito "nato morto". Il termine "aborto" non comprende la morte neonatale, che si verifica quando il cucciolo è nato sano, seppur possa aver vissuto una gravidanza patologica, e muore nell'arco dei tre giorni successivi al parto (Lamm e Njaa, 2012).

Nella specie canina politoca, ciascun embrione possiede la propria placenta ed è quindi un'entità indipendente e autonoma, per cui la gravidanza patologica di un embrione non prescinde un destino favorevole per gli altri embrioni.

### **2.1 Riassorbimento embrionale**

Il riassorbimento embrionale si riferisce alla morte dell'embrione e al riassorbimento dei fluidi della gravidanza nell'arco dei primi venticinque giorni di gravidanza (England, 1998). Il riassorbimento embrionale è l'esito di un mancato o non corretto impianto della blastocisti nell'endometrio e quindi del non compimento del fenomeno di riconoscimento materno di gravidanza; in assenza di esso, non si crea la situazione ovarica e uterina ideale al proseguimento della gravidanza, perché la progesteronemia non aumenta e gli estrogeni ricominciano a circolare, inducendo la vasodilatazione e la ripresa del tono muscolare del miometrio. La vasodilatazione indotta permette la diapedesi degli eritrociti – uno scolo vulvare emorragico evidente è comunque raro- e dei macrofagi, che fagocitano l'embrione e, inoltre, allarga le giunzioni intercellulari delle cellule endoteliali linfatiche e venose, incrementando, con la contemporanea ripresa dei movimenti dell'organo, il drenaggio dei liquidi rimasti. Il termine

“riassorbimento”, quindi, è in parte usato impropriamente perché l’utero, di per sé, non è un organo con capacità assorbente.

Prerogativa fondamentale per la sussistenza del riassorbimento embrionale è la riconferma della diagnosi di gravidanza positiva all’esame diagnostico successivo: non si può sospettare un riassorbimento embrionale sulla base di una presunta gravidanza mai confermata, difatti il riassorbimento embrionale deve essere distinto dalla mancata fertilizzazione, evento che impedisce la formazione della vescicola embrionale. La mancata fertilizzazione non è dimostrabile in quanto la diagnosi di gravidanza più precoce che possiamo effettuare è quella ecografica, a partire dal diciannovesimo giorno post-ovulazione. Il riassorbimento embrionale si deduce essere un’evenienza facilmente trascurata, tanto più perché i sintomi clinici sono, nella maggior parte dei casi, poco evidenti (England, 1998). Nella specie canina, tuttavia, gli embrioni sono tanti e tutti indipendenti gli uni dagli altri, per cui la comparazione tra le vescicole embrionali facilita la diagnosi di riassorbimento embrionale. L’asincronia di sviluppo degli embrioni è, tuttavia, fisiologicamente presente, considerando i tempi di fertilizzazione, ma è confondibile con un riassorbimento embrionale solo nei primi due o tre giorni di gravidanza, successivi ai quali la disparità verrà colmata. A far crescere il sospetto di riassorbimento embrionale può essere anche l’individuazione di un embrione troppo piccolo per l’età che ha, facendo il confronto con gli standard gestazionali (tabella 1): sono sufficienti due giorni di ritardo nello sviluppo per far crescere la probabilità di riassorbimento embrionale in corso.

La tecnica diagnostica d’elezione è appunto l’esame ecografico, che permette precocemente di raccogliere informazioni a proposito della vitalità dell’embrione: un liquido allantoideo non completamente anecogeno o in scarse quantità e le dimensioni differenti tra le varie camere gestazionali devono far sospettare un riassorbimento embrionale in atto. La regione del corno uterino coinvolta dal riassorbimento embrionale collassa per la perdita di volume e la

contemporanea pressione centripeta esercitata dalle ancora spesse pareti uterine; le pareti uterine di tale regione appaiono ipoecogene rispetto alle regioni adiacenti (England, 1998).



*Figura 5. Immagine ecografica di un riassorbimento embrionale in corso. A destra dell'immagine si vede una camera gestazionale con una parte del feto che si sta sviluppando e il cordone ombelicale. Di fianco si nota invece un'altra struttura con diametro interno molto più piccolo e con un liquido fetale non completamente anecogeno.*

*Enrico Bigliardi; Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie Università di Parma, 1998.*

Le cause che portano al riassorbimento embrionale comprendono tutte le condizioni che impediscono l'instaurarsi di un ambiente uterino e ovarico che consenta l'annidamento dell'embrione e la decidualizzazione dell'endometrio. Si riconoscono cause di natura:

- Genetica
- Ormonale-endocrina
- Nutrizionale-metabolica

- Infiammatoria e/o infettiva
- Anagrafica
- Traumatica
- Neoplastica
- Tossica
- Iatrogena

A proposito della causa genetica, la fecondazione tardiva con gameti sub-vitali porta allo sviluppo incompleto o deficiente dell'embrione, che inevitabilmente muore. I difetti congeniti, tipicamente di ordine cromosomico, molto spesso esitano in riassorbimento embrionale (Verstegen et al., 2008).

La causa endocrina principale e più frequente tra le cause non infettive è l'ipoluteinismo, una condizione per la quale il progesterone circolante non è sufficiente, nel caso del riassorbimento embrionale, all'instaurazione di una gravidanza; questa patologia può presentarsi anche durante la gestazione più avanzata e comportare quindi aborto. Nell'ipoluteinismo, i corpi lutei non funzionanti o poco numerosi, per lo scarso numero degli accoppiamenti, secernano una quantità di progesterone che non arriva alla concentrazione soglia di 2-3 ng/ml; studi sperimentali hanno dimostrato che una concentrazione di 2-3 ng/ml, mantenuta per più di 24-48 ore, esita nella perdita della gravidanza (Verstegen et al., 2008). Come detto, il progesterone è fondamentale per il mantenimento di gravidanza, seppur la progesteronemia abbia dei range molto variabili nell'arco della gravidanza: nella prima metà della gestazione, il progesterone circolante è compreso tra valori di 15-70 ng/ml, mentre negli ultimi ventun giorni, i valori scendono a 4-16 ng/ml, per ridursi fino al di sotto dei 2 ng/ml nelle 24 ore precedenti al parto. Indipendentemente da questa variabilità di concentrazione, è stato indicato un unico valore soglia, che, se non riscontrato agli esami, deve obbligare ad un trattamento ormonale (Farabolini et al., 2010). Si

consiglia di monitorare il progesterone sierico una o due volte alla settimana e prima che tale valore scenda al di sotto dei 2-3 ng/ml, si deve procedere alla somministrazione di progesterone naturale iniettabile o di sintesi per via orale. La terapia con progestinici può comportare una serie di effetti collaterali, quali la mascolinizzazione dei feti femmina, la maggiore incidenza di feti criptorchidi, l'agalassia e, poiché è un ormone a deposito, anche la possibilità di un mancato innesco del parto, se non ne viene interrotta la somministrazione prima delle 24-72 ore dal parto (England e von Heimendahl, 2013). Quando si presenta l'ipoluteinismo in una cagna per la prima volta, è facile che si riscontri anche alle gravidanze successive; si è suggerita la possibile ereditarietà genetica, sebbene non ancora sostenuta da alcuno studio, per cui, considerando l'entità anche dei possibili effetti collaterali dei progestinici, si consiglia agli allevatori di eliminare dal programma riproduttivo tali cagne (Verstegen et al., 2008).

La salute della fattrice è la prerogativa primaria per una gravidanza favorevole. Condizioni come deperimento fisico, diabete mellito, ipercortisolismo e ipotiroidismo sono più spesso causa di infertilità più che di riassorbimento embrionale, ma sono comunque da considerare nella lista delle diagnosi differenziali (Verstegen et al., 2008). La carenza di ormoni tiroidei, deputati allo sviluppo delle cellule della granulosa del follicolo ovarico e al realizzarsi del trofismo placentare, causa un'interferenza con la maturazione dei gameti (Farabolini et al., 2010). L'ipercortisolismo causa una limitazione alla produzione delle gonadotropine ipofisarie, prolungando il periodo di anaestro e, in alcuni casi, ad un eccesso di androgeni che esita nella mascolinizzazione fino all'ipertrofia clitoridea e quindi ad una più probabile vaginite mucopurulenta (Farabolini et al., 2010). L'iperglicemia elevata, causata dal diabete mellito gravidico, è causa di infertilità, di riassorbimento embrionale o di aborto; per approfondimenti, procedere al capitolo successivo (Farabolini et al., 2010). Il fattore stress non deve essere trascurato, soprattutto negli ambienti più a rischio, come l'allevamento: la libertà dalla paura, dal disagio e dallo stress rientrano tra le

cinque libertà del benessere animale, infatti, è molto importante che l'animale sia libero di esprimersi nell'ambiente in cui vive, interfacciandosi positivamente sia con gli operatori sia con gli altri animali. Alti livelli di cortisolo riferibili allo stress negativo cronico producono un ambiente uterino avverso allo sviluppo del feto. La morte fetale può verificarsi in qualsiasi stadio della gravidanza, causando riassorbimento embrionale od aborto (Verstegen et al., 2008).

L'incidenza delle cause infettive è sopra al 99% (England, 1998); i principali responsabili di riassorbimento embrionale sono (Andreani et al., 1998): i virus come l'Herpesvirus canino-1, il Parvovirus canino (CPV-1) e il virus del cimurro (CDV), i protozoi come *Toxoplasma gondii* e i batteri come *Brucella canis*, *Salmonella spp* ed *Escherchia Coli*, se associata a Herpesvirus canino-1; Micoplasmi e Ureaplasmi sono più soliti causare fenomeni di infertilità. Condizioni come l'endometrite o la metrite subclinica hanno un ruolo associato all'infertilità e al riassorbimento embrionale ancora non del tutto chiaro (Verstegen et al., 2008); in molte specie animali, l'endometrite acuta è normale dopo l'accoppiamento e, anzi, rappresenta un processo fisiologico che pulisce l'utero dai detriti, dai contaminati e dalle cellule spermatiche morte, preparando così l'utero all'entrata degli oociti maturi dall'ovidutto. Nelle cagne, invece, la presenza dell'endometrite acuta dopo il coito appare meno probabile come processo fisiologico che nelle altre specie, per il peculiare ciclo estrale caratterizzato da un periodo estrale molto lungo: l'endometrite acuta è quindi inseribile nell'elenco delle diagnosi differenziali dell'infertilità e del riassorbimento embrionale. Ormai accertato è invece il ruolo dell'endometrite cronica come ostacolo all'instaurazione della gravidanza: le deformazioni della mucosa uterina, l'ipoplasia tissutale o il tessuto cicatriziale compromettono il funzionamento della placenta (Verstegen et al., 2008).

La vecchiaia della cagna è un fattore che incide tanto sulla fertilità quanto sulla sopravvivenza dell'embrione; con l'avanzare dell'età i processi fisiologici rallentano e facilmente esitano in disordini genetici che compromettono la fisiologica attività di strutture come la placenta o l'utero. Una morte precoce dell'embrione può essere causata dal complesso dell'iperplasia cistica endometriale-piometra, una patologia molto frequente nella cagna anziana, soprattutto se trattata con progestinici o con un'anamnesi di frequenti episodi di pseudogvidanza. A livello ecografico, la si diagnostica facilmente: nello spessore dell'endometrio, si osservano multiple e piccole cisti ripiene di liquido anecogeno (di diametro massimo di 5 mm) e non è infrequente appunto osservare anche la presenza di essudato nel lume uterino (England, 1998).

Le cause traumatiche esitano più spesso nella nascita di feti nati morti o nella morte neonatale perché esitano in distocie al momento del parto; includono la torsione dell'utero, la rottura dell'utero e l'ernia perineale, addominale e inguinale. A meno che l'evento traumatico non si realizzi esattamente al momento dell'annidamento dell'embrione, le cause traumatiche di riassorbimento embrionale sono molto rare.

Esistono molte sostanze tossiche che possono inficiare negativamente sul prosieguo della gravidanza; tali sostanze appartengono alle seguenti famiglie: androgeni, steroidi estrogenici e anabolici, glucocorticoidi, antimicrobici, antifungini, antiparassitari, agenti antineoplastici, analgesici, anestetici, gastrointestinali, cardiovascolari, antinfiammatori, anticonvulsivi, sostanze endocrine. Queste sostanze chimiche, direttamente o indirettamente, possono intaccare il prosieguo della gravidanza perché interagiscono con il controllo neuroendocrino della gravidanza (per esempio gli ormoni e gli anestetici), con il feto o con il sistema vascolare placentare (come gli anestetici e gli antinfiammatori).

La causa iatrogena fa riferimento alla volontà dell'allevatore/proprietario di interrompere la gravidanza e consentire quindi la somministrazione alla propria cagna di farmaci abortivi, quali le prostaglandine (il cloprostenolo è il più conosciuto), gli antiprolattinici (come la cabergolina) o gli antiprogesterinici (il più usato è l'aglepristone). Tuttavia, nel caso del riassorbimento embrionale, è possibile anche una forma iatrogena non intenzionale causata dall'assunzione di una dei tossici prima citati senza la consapevolezza di una gravidanza in corso.

## **2.2 Aborto precoce e tardivo**

L'aborto è caratterizzato dall'espulsione delle strutture fetali e dei suoi annessi prima del termine fisiologico della gravidanza e si verifica dopo i trentacinque giorni dall'ovulazione (England, 1998). Nelle specie politoche, come quella bovina e suina, la morte fetale, in quest'epoca della gravidanza, esita nella ritenzione fetale, che si configura come macerazione o mummificazione fetale, in base alla presenza o meno di agenti microbici; nella cagna invece, queste evenienze sono molto rare (Farabolini et al., 2010). Molto comunemente, l'aborto di uno dei feti determina la sua espulsione nell'arco dei due giorni successivi e anche quella degli altri feti, non necessariamente morti, nello stesso giorno o a distanza di giorni; potrebbe accadere che il parto prematuro del primo e dell'ultimo feto avvenga anche a distanza di qualche giorno (England, 1998).

Secondo le definizioni date di riassorbimento embrionale e di aborto propriamente detto, si evidenzia l'intervallo di tempo, compreso tra i venticinque e i trentacinque giorni di gravidanza, che non è definito; una morte embrionale che si verifica in questo lasso di tempo, appena precedente al periodo fetale, nella medicina umana è riconducibile al termine "aborto precoce" e quella che si verifica durante il periodo fetale "aborto tardivo". Se si applicasse la stessa logica alla gravidanza canina, l'aborto precoce sarebbe definibile come l'espulsione di un feto nel

periodo compreso tra venticinque e i trentacinque giorni di gravidanza, quando ancora non è completamente formato, quindi di piccole dimensioni ( inferiori a 1 cm) e di consistenza gelatinosa, che la cagna potrebbe leccarsi via prima che il proprietario o l'allevatore possano accorgersene e l'aborto tardivo sarebbe invece definibile come l'interruzione di una gravidanza di almeno trentacinque giorni con l'espulsione di un feto ben formato e facilmente visibile.

La perdita di una gravidanza di oltre venticinque giorni comporta la comparsa di una sintomatologia molto evidente e persistente almeno qualche giorno. La cagna presenta sempre perdite vulvari emorragiche o purulente, nel caso di forme infettive in corso e, in base alla variabilità individuale, è possibile osservare: diminuzione della circonferenza addominale, dolori addominali, vomito e/o diarrea, disoressia, depressione e/o discomfort, disidratazione e febbre, a maggior ragione se la causa è infettiva (Verstegen et al., 2008).

Le cause determinanti l'aborto sono pressoché sovrapponibili a quelle del riassorbimento embrionale e sono quindi di natura:

- Genetica
- Ormonale-endocrina
- Nutrizionale-metabolica
- Infiammatoria
- Infettiva
- Traumatica
- Placentare
- Neoplastica
- Tossica
- Iatrogena

### **2.2.1 Cause non infettive**

Le cause tossiche e iatrogene sono le medesime del riassorbimento embrionale, per cui si rimanda al paragrafo precedente.

La causa endocrina è una delle ipotesi principali da tenere in considerazione nell'elenco delle diagnosi differenziali. L'ipoluteinismo è un'evenienza che si può manifestare a qualsiasi età della gravidanza, causando quindi riassorbimento embrionale od aborto.

Come detto sopra, la salute della fattrice è la prerogativa primaria per una gravidanza favorevole, quindi, ancora una volta, il fattore stress, nutrizionale-metabolico ed ormonale della cagna sono fondamentali. A proposito dello stress, vedere il paragrafo precedente. Le carenze energetiche e vitaminiche sono da evitarsi, al fine di garantire la sopravvivenza fetale (Verstegen et al., 2008).

Durante la gravidanza, per quanto infrequente, si potrebbe instaurare il diabete gravidico per effetto antinsulinico del progesterone durante la fase luteinica. I segni clinici sono polidipsia, poliuria e polifagia con dimagrimento e il trattamento è inizialmente solo dietetico (si consiglia una dieta ad alto contenuto in fibre), ma deve essere presa in considerazione l'ipotesi di somministrare anche dell'insulina; somministrando l'insulina occorre un attento monitoraggio quotidiano della glicemia, poiché la richiesta dell'ormone aumenta per tutta la durata della gravidanza, rendendo difficile mantenerne costante il dosaggio (Farabolini et al., 2010). L'aumentata produzione di insulina, in risposta all'iperglicemia materna, può causare la formazione di feto di dimensioni eccessive, causando distocie dovute alla sproporzione madre-feto (England e von Heimendahl, 2013). I problemi vascolari indotti dal diabete possono verificarsi a livello sia fetale sia placentare ed esitare anche nella nascita di cuccioli particolarmente deperiti o predisposti a crisi convulsive da ipoglicemia (Farabolini et al., 2010).

Solitamente il diabete gravidico si risolve con il parto (70% dei casi) e non compromette la vitalità dei feti; tuttavia, non è così rara l'indicazione di interruzione di gravidanza, qualora la situazione fosse grave e magari trattata tardivamente (England e von Heimendahl, 2013).

La tossiemia gravidica non è frequente nella cagna, occasionalmente si presenta in fase tardiva di gestazione nelle cagne di piccola taglia con cucciolate numerose; nei casi gravi può verificarsi l'aborto. L'anoressia o l'inadeguata nutrizione, sommate all'alta richiesta energetica per il mantenimento della gravidanza, causano un bilancio energetico negativo, che determina un alterato metabolismo dei carboidrati. A livello sintomatico, si osserva depressione ed astenia, con eventuale distensione e dolore addominale a livello del fegato, affetto da lipidosi epatica; la diagnosi di tossiemia gravidica si ottiene con gli esami di laboratorio, che rilevano chetonuria senza glicosuria e iperglicemia (England e von Heimendahl, 2013).

La vasculite è una condizione di ipercoagulabilità con tendenza alla trombosi, che potrebbe esacerbarsi per l'ipotiroidismo concomitante non trattato. La terapia con anticoagulanti è documentata nella donna, ma non nella cagna e può facilmente determinare difetti congeniti (per esempio la palatoschisi) o l'interruzione di gravidanza, dovuta ad emorragia placentare o fetale. Le cagne affette da questa patologia dovrebbero essere escluse dal programma riproduttivo (England e von Heimendahl, 2013).

L'eclampsia o tetania puerperale è causata da una deplezione di calcio ionizzato nel comparto extracellulare, che generalmente intercorre a distanza di tre o quattro settimane dal parto, ma che può comparire anche durante le ultime settimane di gravidanza, complicando il momento del parto con distocie e possibili nati morti o morti neonatali. Dal momento che l'aborto difficilmente è causato dall'eclampsia, non verrà discussa in questo trattato.

La causa traumatica, come descritto a proposito del riassorbimento embrionale, esita più spesso nella nascita di feti nati morti o nella morte neonatale. Traumi a grande forza d'impatto,

verificatesi durante la gravidanza, possono comunque causare danni fetali diretti o indiretti per la compromissione del sistema vascolare placentare, diventando così anche letali.

L'ambiente uterino deve essere integro e funzionale affinché il feto possa svilupparsi nei tempi e nei modi corretti, per cui condizioni come una metrite subclinica, un'endometrite cronica e probabilmente anche acuta (si rimanda al paragrafo precedente) o un'iperplasia cistica endometriale, associata o meno ad una piometra, causano inevitabilmente un ostacolo al procedere fisiologico della gravidanza.

L'interruzione di gravidanza nella fase media o tardiva della gestazione può essere dovuta anche al parto pretermine o prematuro, un argomento della fisiopatologia della riproduzione dei piccoli animali molto controverso, in quanto molta è la letteratura nella medicina umana, ma carente in quella veterinaria (England e von Heimendahl, 2013). Tra le cause del parto prematuro si ipotizzano l'ipoluteinismo o l'inappropriata attività uterina accompagnata da problemi della cervice, condizioni che esitano entrambe nella diminuzione della progesteronemia fino a valori inferiori a 2 ng/ml. L'inappropriata attività uterina può essere dovuta all'elaborazione precoce di prostaglandine endometriali e placentari, capaci di causare una luteolisi secondaria. La diagnosi di parto prematuro è una diagnosi di esclusione, dal momento che non è correlata ad alcuna causa metabolica, infettiva, congenita, traumatica o tossica; si riscontra un'aumentata contrattilità uterina misurata con tocodinamometria e una diminuzione della lunghezza della cervice con ecografia transvaginale. Il trattamento farmacologico per la riduzione dell'attività miometriale è consigliato, con composti progestinici e agenti tocolitici (per esempio, la terbutalina), da soli o in associazione; la terapia deve essere sospesa 24 ore prima del parto (England e von Heimendahl, 2013).

Anomalie genetiche esitano in uno sviluppo anormale del feto, che acquista caratteri fisici diversi da quelli fisiologici. Questi caratteri fisici sono facilmente reperibili con l'esame ecografico, meno con quello radiografico, che è limitato alla sola immagine bidimensionale; utilizzando quindi le formule matematiche elaborate (vedi il paragrafo 1.2.3 Diagnosi di gravidanza) e, confrontando i risultati con i modelli medi statistici della popolazione, è possibile scoprire le deformità genetiche a carico dei feti (Lopate, 2008). Alcuni feti possono apparire più piccoli del normale: è il caso dei feti mummificati, che per quanto raramente reperibili, in caso di infezione erpetica canina non sono escludibili. Un feto mummificato è un feto morto che rimane trattenuto in utero e che progressivamente si disidrata, rimpicciolendosi in una massa piccola e solida, visibilmente secca e di colore coriaceo, per effetto della emoglobina ridotta; la mummificazione è un processo lungo, che implica l'assenza di infezione batterica e di una cervice chiusa, per cui, nelle specie politoche, il feto mummificato può essere espulso insieme ai feti vivi e vitali al momento normale del parto.



*Figura 7. Feto mummificato.  
Lamm C.G., Njaa B.L., 2012 Clinical approach to abortion, stillbirth, and neonatal death in dogs and cats.*

Molto più di frequente, è possibile osservare dei feti che hanno dimensioni maggiori rispetto agli standard d'età gestazionale, che facilmente sono poi causa di distocia al parto, onde per cui si programma un parto cesareo. Le più frequenti anomalie fetali sono l'idrocefalo, l'anasarca, l'ernia toracica o l'ernia addominale (England, 1998). L'idrocefalo è l'aumento del liquido cefalorachidiano nella cavità cranica, per un patologico aumento di produzione o per un deficit di riassorbimento; questa anomalia non è sempre visibile ecograficamente perché difficilmente è possibile osservare ogni feto nel dettaglio, considerando la numerosità dei feti e i movimenti fetali continuamente in corso. L'anasarca o cucciolo edematoso è una deformità che comporta un edema generalizzato associato ad alopecia; si sospetta anasarca fetale quando si misura una lunghezza maggiore del diametro trasverso dell'addome e quando si osserva nel profilo fetale fluido nel torace, nel sacco pericardico o a livello sottocutaneo. L'ernia addominale, dovuta alla mancata fusione della linea alba e l'ernia toracica, dovuta alla mancata fusione dei due emitoraci sono patologie fetali che determinano la possibile fuoriuscita di organi; in ecografia, non è sempre possibile riconoscere queste anomalie, per gli stessi motivi prima elencati.

È fondamentale ricordare che un normale sviluppo fetale associato, però, ad una anomala posizione può indicare morte fetale; le più frequenti anomalie di posizionamento sono quelle a carico della colonna vertebrale (iperflessione) e delle zampe posteriori (iperestensione). Questa condizione è rilevabile sia ecograficamente che radiologicamente.



*Figura 8.*

*In figura A osserviamo un'ernia addominale con fuoriuscita di organi addominali.*

*In figura B osserviamo l'anasarca fetale*

*Farabolini M., Majolino G., Spallarossa M., Zambelli D., 2010 Manuale di ostetricia e neonatologia del cane e del gatto. Milano, Elsevier Masson.*

La placenta è un organo che svolge funzioni metabolico-nutritive, respiratorie, immunologiche ed endocrine ed è quindi indispensabile per l'instaurarsi e il procedere della gravidanza: un funzionamento o un'anatomia anomala della placenta possono interferire con lo sviluppo fetale, determinando anche aborto. Una prematura secrezione di  $\text{PGF2}\alpha$  può causare la lisi del corpo luteo e quindi il calo brusco del progesterone, che è un chiaro input ormonale all'interruzione di gravidanza (Kowalewski et al., 2020). Il distacco di placenta prematuro può verificarsi soprattutto nelle cagne più anziane e può essere facilmente diagnosticato ecograficamente, poiché si rende visibile una sottile linea anecogena che separa l'endometrio e la placenta; tale linea è fisiologica nelle fasi finali della gravidanza, in imminenza del parto. Una placenta che mostra una disomogeneità ecografica, con colori diversi e contorni poco definiti indica un'anatomia placentare alterata e quindi una possibile sofferenza fetale, che deve essere indagata con ulteriori esami.

La placenta deve svilupparsi in uno spazio consono all'interno del corno uterino, al fine di instaurare un sito d'attacco ottimale allo sviluppo di tutte le funzioni necessarie alla sopravvivenza del feto. Un sovraffollamento di embrioni o un posizionamento di uno di essi in eccessiva vicinanza alla cervice causa la formazione di placente che sono destinate a non formarsi del tutto, causando una perdita della gravidanza. A livello ecografico, un posizionamento non ottimale del feto può sfuggire all'osservazione (England, 1998). Un'anomalia intrinseca alla placenta o estrinseca, per un'inadeguata perfusione della stessa, causata per esempio da un'insufficienza cardiaca della madre, non garantiscono la necessaria vascolarizzazione e quindi un adeguato sostentamento fetale.



*Figura 9. L'immagine mostra una placenta dall'aspetto disomogeneo, con aspetto granuleggiante. Enrico Bigliardi; Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie Università di Parma, 2018.*

### 2.2.2 Cause infettive

L'incidenza delle cause infettive è sopra al 99% (England, 1998), comprendendo batteri, virus e protozoi. Affinché si realizzi un aborto di origine infettiva, la cagna deve infettarsi prima o durante la gravidanza, per cui essa presenterà, nella maggior parte dei casi, sintomi clinici di malessere generale, astenia, febbre e scolo vaginale muco-purulento.

La patogenesi dell'aborto infettivo può partire da un'infezione ascendente o discendente, che porta, in qualsiasi caso, il microorganismo a livello della membrana corion-allantoidea, sito ideale alla replicazione poiché ricco di nutrienti, con una temperatura elevata ed un'immunosoppressione delle cellule materne, indotta dal progesterone. A questo livello, si assiste alla necrosi cellulare per effetto citopatico diretto, se si tratta del microorganismo in sé o indiretto, se si tratta di tossine batteriche, enzimi o sostanze citotossiche ed infiammatorie. Si attiva il processo flogistico con i mediatori dell'infiammazione e le cellule fagocitarie, che esita in *rubor, dolor, calor, tumor e functio laesa*; l'alterazione anatomica dovuta alla necrosi cellulare da ipossia e ai processi trombotici, a carico della membrana corion-allantoidea, causano dapprima un rallentamento e infine, in base alla patogenicità del microorganismo, un blocco completo dell'attività placentare. Il sistema immunitario del feto possiede un'attività molto limitata ed efficace solo verso alcuni antigeni: l'immunità innata e l'acquisita sono parzialmente sviluppate, solo una piccola quantità di linfociti sono funzionali e, difatti, le quote di IgG alla nascita hanno una concentrazione di 0,3 g/L; l'immunocompetenza viene completata solo tra le sei e le dodici settimane d'età (Pereira et al., 2019). Con una risposta immunitaria praticamente assente, il feto viene sopraffatto velocemente dal microorganismo patogeno, che può oltrepassare la placenta e infettare il feto o limitarsi all'invasione placentare. In qualsiasi caso, l'ipossia e lo stress attivano la ghiandola surrenale fetale che, per quanto parzialmente formata, produce cortisolo e inducono la placenta

stessa a secernere prostaglandine; le contrazioni uterine che ne derivano causano l'interruzione di gravidanza, con l'espulsione del feto o, più raramente, la sua mummificazione o macerazione. La mummificazione si realizza quando non c'è invasione batterica, mentre la macerazione incorre quando i batteri penetrano nell'utero attraverso la cervice aperta, prima o dopo la morte fetale, causando la degradazione tissutale lenta.

A proposito dei batteri, è molto ricca e variegata la flora microbica normale della vagina della cagna, tanto che da uno studio pubblicato non è stata trovata una significativa differenza nella percentuale di isolamento di batteri tra le cagne normali fertili e cagne con un'anamnesi d'infertilità o con vaginite clinicamente manifesta (Farabolini et al., 2010). I batteri principalmente riconosciuti causa d'aborto nella cagna sono:

- *Brucella canis*
- *Campylobacter* spp
- *Salmonella* spp
- *Escherichia Coli*
- *Streptococcus* spp
- *Listeria monocytogenes*
- *Leptospira serovar Bratislava*

*Campylobacter* spp è un batterio che raramente è causa d'aborto, più spesso è riportato come responsabile di forme gastroenteriche nel cucciolo neonato, con diarrea emorragica, vomito e polidipsia; *Campylobacter* spp replica e si diffonde nel latte materno o artificiale (Andreani et al., 1998).

*Salmonella* spp causa aborti tardivi, parti prematuri o nati disvitali; tale batterio possiede un ciclo oro-fecale e la salmonellosi è una zoonosi (Andreani et al., 1998).

*Escherichia Coli* è un batterio che comunemente appartiene alla microflora intestinale del cane ed è responsabile di aborto solo in associazione ad altri agenti patogeni abortivi, come l'Herpesvirus canino-1 (Andreani et al., 1998).

*Streptococcus* spp è un batterio che comunemente appartiene alla microflora cutanea e mucosale del cane, ma in condizioni di immunodepressione spiccata, è possibile che il batterio si diffonda in altre regioni del corpo, causando ascessi, infezioni al tratto urinario e genitale (vaginite, metrite, cistite) e possibile endocardite, se l'infezione cronicizza. L'aborto causato da *Streptococcus* spp è infrequente, più spesso colpisce i neonati, ancora molto vulnerabili immunologicamente (Andreani et al., 1998).

*Listeria monocytogenes* ha un ciclo oro-fecale, che ben si è adattato alle specie bovina, ovina e avicola, per cui questo batterio può raggiungere il cane anche attraverso la via alimentare con cibi di origine animale poco cotti. *Listeria monocytogenes* causa meningite e aborto tardivo nella femmina gravida (Andreani et al., 1998).

*Brucella canis* è un batterio che, negli ultimi vent'anni, ha un'incidenza zero in Italia, mentre è presente in Cina, in Giappone e negli Stati Uniti, dove tra l'1,5% e il 6,6% dei cani ha anticorpi diagnostici (Farabolini et al., 2010). La continua movimentazione dei cani da o per l'estero, ai fini allevatoriali o agonistici e il trasporto del seme congelato, per l'inseminazione artificiale, fanno sì che tale patologia venga comunque considerata anche in Italia negli screening diagnostici in soggetti infertili o in casi di aborto. La brucellosi è una zoonosi, che si trasmette tramite il contatto diretto con il seme, lo scolo vulvare, i feti e le placente di cani infetti. *B. canis* è un coccobacillo,

Gram negativo, aerobio, che alberga tutti i membri della famiglia dei *Canidae*, tuttavia, la brucellosi si verifica più frequentemente, in forma di focolai, in grossi canili e meno nei cani di proprietà. La trasmissione avviene con l'esposizione diretta a fluidi corporei contenenti una dose infettiva dell'organismo, ossia  $2 \times 10^6$  unità formanti colonia (seme, feti abortiti e placenti, latte), per cui sia per via orale che per via venerea. La brucellosi canina si manifesta principalmente con l'interruzione di gravidanza, causata dalla necrosi dei trofoblasti placentari, che si realizza come aborto, attorno al quarantacinquesimo e cinquantacinquesimo giorno di gravidanza, ma anche come riassorbimento embrionale o parto di feti nati-morti. La brucellosi ha bassa mortalità ed elevata morbilità, giustificata dal fatto che i cani rimangono infetti anche per cinque anni, nonostante la precedente scomparsa dei sintomi. La diagnosi di brucellosi richiede un isolamento sierologico nei soggetti batteriemici. I cani infetti da *B. canis* dovrebbero essere esclusi dal programma riproduttivo, dal momento che non esiste un vaccino efficace e solo uno studio recente ha proposto l'enrofloxacin come terapia soddisfacente. Nelle zone endemiche, si consiglia uno screening per *B. canis* prima di procedere ai programmi riproduttivi (England e von Heimendahl, 2013).

Tra i protozoi responsabili di aborto, si annoverano:

- *Neospora caninum*
- *Leishmania infantum*

*Neospora caninum* è un coccidio che ha un ciclo biologico che comprende il cane come ospite definitivo e tutti i mammiferi come ospiti intermedi: il cane, quindi, oltre che diffondere nelle proprie feci le oocisti immature, che diventeranno infettanti per gli ospiti intermedi, è esso stesso vittima degli effetti di tale protozoo. Il cane può manifestare sintomi nervosi o aborto tardivo.

*Leishmania infantum* è un protozoo che ha un ciclo biologico indiretto, poiché comprende un vettore, il flebotomo o pappatacio; è una zoonosi, molto pericolosa per l'uomo, considerato lo stretto rapporto che ormai sussiste tra il cane e alcuni proprietari. *Leishmania infantum* è un parassita che causa nei suoi ospiti anoressia e dimagrimento, gravi problemi dermatologici ed articolari e, in corso di gravidanza, possibile aborto.

I virus abortivi della specie canina sono:

- *Canid Herpesvirus -1 (CHV-1 o CaHV-1)*
- *Canine Distemper Virus (CDV o virus del cimurro)*
- *Canine Parvovirus 2 (CPV-2)*
- *Canine Adenovirus - 1 (CAV-1)*

Il *Canine Distemper Virus* (virus del cimurro) causa una malattia infettiva contagiosa che presenta un'elevata mortalità. Il decorso della malattia inizia con una congiuntivite acuta, procede poi con il vomito e la diarrea emorragica e si conclude con sintomi neurologici, quali mioclonie e convulsioni; classicamente, il cimurro si manifesta o nel cucciolo o nel cane anziano. Esiste una forma atipica del cimurro, molto rara, che si manifesta nella cagna gravida con l'interruzione di gravidanza (riassorbimenti embrionali o aborti), la nascita di cuccioli nati-morti o disvitali. Il vaccino per il cimurro è un vaccino core (Andreani et al., 1998; Lamm e Njaa, 2012).

Il *Canine Parvovirus-2* causa una malattia infettiva molto contagiosa e dall'elevata morbilità, per l'estrema resistenza del virus nell'ambiente ed elevata mortalità. Questo virus colpisce in modo aggressivo i cuccioli, con forme gastroenteriche emorragiche e le cagne gravide non vaccinate, con forme di riassorbimento embrionale o nascite di feti nati-morti o disvitali. Anche in questo caso, il vaccino per la parvovirosi è un core vaccino (Andreani et al., 1998).

Il *Canine Adenovirus- 1* è il virus dell'epatite infettiva del cane, che causa sporadicamente aborto, con o senza infezione fetale. Per tale virus esiste in commercio un core vaccino (Verstegen et al., 2008).

Per quanto riguarda il *Canid Herpesvirus -1*, si rimanda al capitolo successivo.

### **2.2.3 Diagnosi di aborto**

La diagnosi di aborto si basa sui sintomi clinici e sugli esami radiografico ed ecografico.

L'esame per la relaxina non dà informazioni in tempo reale, perché inizia a calare nel circolo ematico in modo progressivo, per cui potrebbe fornire dei falsi positivi.

La palpazione addominale e le modifiche fisiche della cagna sono anch'essi esami che mostrano alterazioni riferibili ad interruzione di gravidanza tardive rispetto al momento reale d'avvenimento, per cui non sono diagnostici.

La sintomatologia classica dell'aborto persiste per almeno qualche giorno e consiste in perdite vulvari emorragiche o purulente, nel caso di forme infettive in corso e, in base alla variabilità individuale, è possibile osservare anche diminuzione della circonferenza addominale, dolori addominali, vomito e/o diarrea, disoressia, depressione e/o discomfort, disidratazione e febbre, a maggior ragione se la causa è infettiva (Verstegen et al., 2008).

L'esame radiografico, come già detto, possiede forti limiti in virtù dell'immagine bidimensionale che restituisce, per cui fornisce solo qualche indicazione grossolana di aborto, che richiede di essere indagata ulteriormente con l'esame ecografico. Con l'esame radiografico, è possibile individuare del gas radiotrasparente all'interno del profilo fetale, che è indice dell'inizio di un processo di macerazione fetale, probabilmente per opera dei *Clostridium* spp; è possibile addirittura riscontrare difficoltà nel riconoscere il feto nella radiopacità uterina diffusa, che potrebbe indicare l'esito della macerazione (in alcuni casi, rimangono visibili le sole ossa fetali).

La radiografia permette di osservare alcune deformazioni fetali, come la macrosomia fetale o l'assunzione, da parte del feto, di posizioni anomale, determinanti aborto o distocia al momento del parto.

L'esame ecografico è l'esame più completo e più preciso per fare diagnosi di morte fetale, infatti, già verso i trenta giorni di gravidanza circa, si possono raccogliere informazioni a proposito della vitalità dell'embrione: un liquido allantoideo non completamente anecogeno o in scarse quantità e le dimensioni differenti tra le varie camere gestazionali devono far sospettare un riassorbimento embrionale o un aborto precoce in atto. Inoltre, anche le caratteristiche dell'utero possono fornire indicazioni su gravidanze patologiche: la mancata crescita dell'utero o una sua decrescita rapida sono indicative di aborto o di riassorbimento embrionale, mentre la rilevazione di gas in utero deve essere approfondita da ulteriori esami collaterali. Con l'esame ecografico è possibile approfondire l'individuazione di deformazioni fetali (le più importanti sono quelle a carico della colonna vertebrale e delle zampe posteriori) e di gas all'interno del feto (dentro a vasi sanguigni, dentro al cuore o nelle cavità corporee) riscontrate nell'esame radiografico e osservare la perdita di ecogenicità, e quindi di densità, delle ossa del cranio e la perdita della definizione dell'anatomia fetale che sono segni indicanti morte fetale (Lopate, 2008). Il riscontro di questi rilievi ecografici deve essere approfondito con la rilevazione del battito cardiaco, attraverso l'utilizzo del Color Doppler pulsato: valori inferiori al limite di 180 battiti al minuto sono da considerare indice di sofferenza fetale. L'eccezione a tale limite soglia è solo nella fase del travaglio, in cui la misurazione della frequenza cardiaca media, quindi con il Color Doppler pulsato, potrebbe portare ad errori diagnostici: nel caso si volesse misurare la frequenza cardiaca fetale al momento del travaglio, tenendo conto delle fisiologiche oscillazioni della frequenza cardiaca, dovute alla ritmicità delle contrazioni uterine, si dovrebbe misurare la frequenza cardiaca istantanea, misurabile solo con i cardiocografi usati in medicina umana.

Facendo un controllo ecografico di gravidanza ancora più approfondito e conoscendo i valori medi fisiologici relativi alle velocità di flusso e ai resistance index (vedi paragrafo 1.2.3 Diagnosi di gravidanza), è possibile discriminare possibili segni precoci di aborto, valutando i vasi utero-placentari, l'ombelicale, l'aorta e la cava caudale (Blanco et al., 2011). Nello specifico:

- La frequenza cardiaca è superiore ai 220 battiti al minuto;
- L'RI (resistance index) delle arterie utero-placentari aumenta nella gravidanza patologica, quando dovrebbe invece decrescere; il PSV (peak systolic velocity) e l'EDV (end diastolic velocity) aumentano progressivamente durante la gravidanza. Nella gravidanza patologica, l'EDV cessa di crescere quando RI inizia ad aumentare, in virtù della maggior resistenza che si instaura nel microcircolo placentare;
- L'RI dell'arteria ombelicale è molto alto nella gravidanza patologica e difatti decresce invece l'EDV;
- Il flusso dell'aorta fetale dovrebbe crescere progressivamente durante la gestazione. Nella gravidanza patologica, in particolare, l'arteria renale fetale con un alto RI indica scarsa perfusione renale e l'aumento di flusso dell'arteria carotide interna indica insufficienza placentare e quindi il dirottamento di tutto il sangue agli organi vitali, tra cui il cervello (l'RI dell'arteria carotide interna, infatti, non cambia mai durante la gravidanza patologica).

Una volta accertata la sussistenza di un aborto, è necessario approfondirne le cause. Le cause d'aborto possono essere stabilite attraverso esami sierologici della cagna, esami colturali cervicali e/o isolamento microbiologico dalle membrane fetali e dagli organi interni del feto abortito; meno di frequente si eseguono degli esami colturali e/o d'isolamento microbiologico, perché si richiedono pratiche molto costose e poco comuni nella pratica veterinaria, ossia la laparoscopia e la cateterizzazione endoscopica transcervicale. A maggior ragione se si

sospettasse di un'infezione batterica abortiva, un semplice tampone vaginale darebbe risultati del tutto superflui e non diagnostici, perché più del 99% dei batteri isolabili dalla vagina sono microorganismi facenti parte di una flora microbica normale, a prescindere che siano reperiti nella vagina craniale o caudale (Farabolini et al., 2010).

#### **2.2.4 Prevenzione e terapia d'aborto**

Le variabili che possono incidere negativamente sul buon esito della gravidanza sono innumerevoli e per questo impossibili da prevedere ed eliminare tutti e completamente; tuttavia, alcune accortezze di base possono costituire una buona prevenzione:

- Igiene e buona gestione dell'ambiente in cui la cagna vive;
- Igiene e buona gestione del box parto: una temperatura di 30°C almeno è consigliata;
- Vaccinazioni per i principali agenti abortivi: esistono in commercio i vaccini per il *Canine Parvovirus-2*, per il *Canine Adenovirus-1*, per il *Canine Distemper Virus* e per il *Canid Herpesvirus- 1*;
- Controllo della progesteronemia: si rimanda al capitolo 2.1 Riassorbimento embrionale

Una gestione terapeutica ed immediata è invece da preferire quando si è già elaborata una diagnosi di certezza d'aborto in corso. Una volta che si è elaborata una diagnosi di certezza d'aborto in corso, è consigliato accelerare il processo di svuotamento del contenuto uterino, al fine di evitare la ritenzione fetale o la sofferenza e la morte degli altri feti vivi (Farabolini et al., 2010). La terapia può prevedere l'uso di aglepristone e/o ossitocina e prostaglandine, oltre a fluidoterapia e antibioticoterapia (si preferisce l'applicazione topica, attraverso l'utilizzo di un catetere endoscopico transcervicale). L'utilizzo dell'aglepristone è in funzione del fatto che la morte fetale sia avvenuta nonostante una corretta progesteronemia; tale molecola ha un effetto

antagonista diretto del progesterone, poiché, spiazzandolo dai suoi siti recettoriali, per maggior affinità, ne inibisce l'attivazione.

### **3. Canid Herpesvirus- 1**

#### **3.1 Generalità di CaHV-1**

Il *Canid Herpesvirus-1* (o *Canine Herpesvirus- 1*) appartiene alla famiglia degli *Herpesviridae*, sottofamiglia degli  $\alpha$ -*Herpesvirinae* e possiede quindi un DNA lineare e a doppia elica, contenuto entro il capsid, un guscio proteico e a simmetria icosaedrica; all'esterno, il virione completo è rivestito dall'*envelope*, che è composto da glicoproteine e lipidi e dal quale emergono delle proiezioni superficiali esterne. Le dimensioni del virione sono comprese tra 120-200 nm (Andreani et al., 1998). Il ciclo replicativo è rapido, si realizza in sede nucleare e determina la formazione di sincizi ed inclusi nucleari, che esitano in necrosi cellulare; il virus predilige cellule giovani e in attività moltiplicativa (Andreani et al., 1998). Si tratta di un virus specie-specifico, infatti lo spettro d'ospite è rappresentato dalla sola specie canina, sia domestica che selvatica, anche se sono stati trovati anticorpi neutralizzanti contro questo virus anche nelle lontre in Nord America (Kimber et al., 2000), nell'orso bruno in Slovacchia (Vitásková et al., 2019) e nella volpe europea in Australia e in Germania (Buonavoglia e Martella, 2007). La peculiarità della sottofamiglia degli  $\alpha$ -*Herpesvirinae* è la latenza, principalmente nei gangli sensoriali degli organismi infetti, che ne garantisce la sopravvivenza e la persistente diffusione tra individui: gli *Herpesvirus* sono tra i patogeni più diffusi e di più ampio successo che infettano sia l'uomo che gli animali. Il virus è stato isolato e identificato per la prima volta, quasi simultaneamente, da tre diversi gruppi di ricerca, nel 1965, da casi di morte neonatale, aborti e dalle cellule renali canine (Carmicheal et al., 1965; Spertzel et al., 1965; Stewart et al., 1965). *In vitro*, l'CaHV-1 replica solo sulle cellule derivate dal cane e a temperature comprese tra i 35-36°C, cioè al di sotto della temperatura interna del cane adulto, ma equivalente a quella del neonato. Il CaHV-1 è molto labile nell'ambiente esterno, in particolare, viene disattivato a partire dalla temperatura di 37°C

ed è sensibile ai comuni disinfettanti e ai solventi lipidici (etere e cloroformio) (Andreani et al., 1998).

### **3.2 Patogenesi**

Il CaHV-1, data la sua instabilità relativa nell'ambiente, necessita di un contatto stretto con l'ospite, in particolare nei siti corporei dove la temperatura è al di sotto dei 37°C, ossia le membrane esterne nasali e del tratto genitale del cane adulto; nei neonati, che normalmente hanno una temperatura corporea inferiore di 1-1,5°C rispetto all'adulto e un immaturo sistema immunitario e di termoregolazione, sono gli ospiti d'elezione del virus, che opera una diffusione sistemica (Bottinelli et al., 2016).

Il CaHV-1 è responsabile di diverse forme cliniche e subcliniche, differenti in base all'età dell'animale e variamente associate tra loro (Farabolini et al., 2010; Bottinelli et al., 2016); si riconoscono:

- Nel cane adulto:
  - Forme subcliniche asintomatiche: sono le più frequenti e riguardano gli animali infetti con il virus in latenza (Kustritz, 2005);
  - Forme cliniche acute o subacute a carico delle alte vie respiratorie, degli organi genitali, dell'occhio e del sistema nervoso centrale; nel caso di gravidanza in corso si può presentare riassorbimento embrionale, aborto e possibile mummificazione, nascita di feti nati-morti o disvitali;
- Nel cucciolo:

- neonato, ossia di tre giorni, si registra soprattutto la forma clinica acuta, con esito mortale; su un'intera cucciolata si può arrivare al 100% della mortalità (Farabolini et al., 2010);
- di almeno due o tre settimane di vita, si registrano forme cliniche subacute e forme subcliniche, a carico delle alte vie respiratorie, degli organi genitali, dell'occhio e del sistema nervoso centrale.

La trasmissione virale avviene per via inalatoria, diaplacentare, venerea o per ingestione. Il principale sito di replicazione del virus è rappresentato dalla mucosa nasale, tonsillare e faringea, nonostante il CaHV-1 non sia considerato un principale agente patogeno respiratorio (Lavan e Knesl, 2015). Nei siti primari di replicazione, il virus si estende fino in profondità, coinvolgendo anche la sottomucosa e quindi gli endoteli capillari: veicolato dai linfociti, il virus finisce nel torrente circolatorio e raggiunge i siti di localizzazione secondaria, quali gli organi genitali, tra cui l'utero gravido, le alte vie respiratorie, l'apparato gastroenterico e il sistema nervoso centrale; nel neonato, il virus si dissemina in tutti i distretti del corpo. La fase viremica non determina febbre, probabilmente per la scarsa quota virale nel sangue. Una via alternativa di disseminazione del CaHV-1 potrebbe essere rappresentata dai nervi cranici, poiché è noto che, dopo l'inoculazione per via nasale al cucciolo, è possibile osservare lesioni di meningoencefalomielite non precedute da viremia (Andreani et al., 1998). Il decorso e l'esito della malattia risultano strettamente correlati con l'età, in particolar modo, poiché si osserva mortalità elevata nel corso della vita intrauterina e immediatamente dopo la nascita, mentre, con il progredire dell'età, la malattia assume gravità decrescente, fino alla forma asintomatica. Sono le forme asintomatiche e paucisintomatiche dell'adulto e la latenza del virus che perpetuano il ciclo naturale dell'infezione. Uno dei motivi per i quali la malattia del neonato assume un andamento più grave rispetto all'adulto potrebbe appunto essere riferito al fatto che

il primo si trova in uno stato di ipotermia fisiologica, che consente la rapida replicazione del virus in tutti i distretti corporei. Il CaHV-1 è poco immunizzante, infatti gli anticorpi neutralizzanti iniziano a circolare tra i sette e i quattordici giorni dall'infezione primaria e rimangono circolanti per circa due o tre mesi, con un massimo di quindici mesi, sebbene a basso titolo (Bottinelli et al., 2016; Yeşilbağ et al., 2012); per quanto tardivi riescono poi a permettere la guarigione clinica. La diffusione del virus nei secreti può essere continuativa o intermittente (Evermann et al., 2011) per un periodo variabile di mesi o addirittura di anni (Decaro et al., 2008). Come accennato in precedenza, la peculiarità e la strategia di sopravvivenza del virus è la latenza: quando iniziano a circolare gli anticorpi per l'infezione primaria, il virus si "nasconde", ossia penetra in una cellula ospite eucariotica, integra il proprio genoma nel DNA della cellula ospite, sottoforma di episomi o di plasmidi extra-cromosomici, così da assicurarsi la sopravvivenza, nonostante l'assenza di replicazione; solitamente il periodo della latenza è molto lungo, caratterizzato dalla produzione di proteine della latenza, che gli permettono di convivere indisturbato con il sistema immunitario (Andreani et al., 1998). Nel caso del CaHV-1, le cellule ospiti sono rappresentate dalle cellule dei gangli sensoriali (ganglio del trigemino, ganglio lombo-sacrale, ganglio vestibolare), delle tonsille, del timo, dei linfonodi (linfonodo retrofaringeo, ipogastrico, polmonare) (Bottinelli et al., 2016); alcuni autori riferiscono anche latenza nelle cellule del fegato e delle ghiandole salivari (Kustritz, 2005; Pratelli et al., 2014). La riattivazione del virus, che prevede la ripresa della sua replicazione cellulare, si pensa che sia il prodotto di una serie di fattori che includono l'età, la gravidanza, l'estro, lo stress, le terapie immunosoppressive e le malattie concomitanti. Da uno studio recente del 2012 (Ström Holst et al., 2012), sebbene gli stessi autori abbiano riconosciuto di aver studiato una popolazione molto piccola di cagne gravide, la gravidanza, se associata ad una gestione buona e in totale benessere, non è risultata come fattore di rischio per la riattivazione virale, in quanto il titolo anticorpale è rimasto costante durante tutta la gravidanza. Nello studio del 2011,

Evermann e i suoi colleghi (Evermann et al., 2011) hanno precisato che una terapia a base di immunosoppressori, come i corticosteroidi, per essere capace di indurre la riattivazione del virus debba essere di tipo sistemico, poiché l'applicazione di prednisolone topico, a livello oculare, non ha causato alcuna riattivazione virale. Anche la chemioterapia, in un soggetto con un'infezione latente da CaHV-1, può determinarne la riattivazione (Mundy et al., 2012). Uno studio belga del 2004 (Ronsse et al., 2004) ha analizzato più nel dettaglio i fattori di rischio per l'infezione dell'CaHV-1, associando ciascuno di esso alla crescita o alla decrescita anticorpale: la gestione e le condizioni igieniche dell'allevamento o del canile sono risultate come il maggior fattore di rischio impattante sulla comparsa della malattia, a maggior ragione se di dimensioni molto estese o se in concomitanza della sindrome CIRDC (canine infectious respiratory disease complex), chiamata volgarmente "tosse del canile" (Lavan e Knesl, 2015); l'estro e la gravidanza, a dispetto di quanto la letteratura tradizionale abbia sempre descritto, non hanno determinato la comparsa di segni clinici riferibili ad una riattivazione virale, nonostante i titoli anticorpali siano leggermente aumentati nella fase dell'estro; cani più giovani di sei mesi non mostrano alcuna sieropositività, infatti il titolo anticorpale dipende dall'età: gli anticorpi iniziano a formarsi e a crescere in particolare verso la pubertà, proprio quando risulta possibile l'instaurazione di una gravidanza e quindi di un habitat ideale per il virus. La riattivazione del virus è un evento acuto, che ha una durata molto breve, ma potrebbe costituire una recrudescenza della patologia virale, a causa delle possibili mutazioni virali che, solitamente, avvengono nei successivi due o sei giorni (Evermann et al., 2011) e alla risposta tardiva del sistema immunitario, perché il titolo anticorpale aumenta solo nei successivi sette giorni dalla riattivazione, per tornare a decrescere in pochi giorni (Bottinelli et al., 2016). Sono noti casi di riattivazione virale che non hanno comportato la comparsa di alcun sintomo, difatti è sospettata una predisposizione individuale (Pratelli et al., 2014); è possibile che una nuova viremia consegua alla riattivazione del virus, qualora non ci fosse

una sufficiente risposta immunitaria volta al contenimento del virus nel sito della latenza (Evermann et al., 2011). I gangli lombosacrali sono importanti come sito di latenza e come fonte di potenziale riattivazione del virus per l'infezione venerea e per quella del cucciolo che attraversa il canale del parto; la riattivazione del virus a livello delle ghiandole salivari e delle tonsille è fondamentale, invece, per la contaminazione dei secreti oro-nasali, nella trasmissione orale ed inalatoria (Evermann et al., 2011). Il soggetto portatore che possiede il CaHV-1 in latenza, non può trasmettere il virus perché esso, essendosi messo in quiescenza, non opera né la trascrizione, né la traduzione, per cui, bloccata la replicazione virale, nessun virus maturo è in circolo e nessuna secrezione contaminata può essere eliminata. La riattivazione del virus determina la ripresa della replicazione virale e la contagiosità del soggetto infetto, pur con una diffusione del virus di minore gravità e durata (*Overview of Canine Herpesviral Infection*, Merck Veterinary Manual, 2016).

### **3.3 Forme cliniche e sintomatologia**

I caratteri della malattia sono diversi in base a vari fattori di predisposizione:

- Età del soggetto: i neonati e i cuccioli di età inferiore alle due o tre settimane sono i più suscettibili all'infezione; la letalità può raggiungere il 100%;
- Stato di salute e sistema immunitario: i soggetti deperiti e/o malati sono più suscettibili a contrarre l'infezione o a permettere una riattivazione del virus; il soggetto più a rischio è però la femmina gravida, soprattutto a trenta giorni dal parto, che ha un sistema immunitario alterato a causa della tolleranza immunitaria indotta dalla prolattina e dal progesterone (Evermann et al., 2011);

- Virulenza del virus: nonostante sia un virus a DNA, l'CaHV-1 mantiene comunque la capacità di mutare, potendo quindi determinare anche una grave recrudescenza della malattia;
- Fattori di rischio ambientali e individuali: si rimanda al paragrafo precedente.

Il virus colpisce l'adulto *in primis*, che può manifestare essenzialmente la forma clinica o la subclinica, entrambe riconducibili all'infezione primaria o alla riattivazione del virus.

La forma subclinica è quella asintomatica ed è la più frequente (Farabolini et al., 2010; Verstegen et al., 2008), soprattutto durante la fase di latenza (Kustritz, 2005).

La forma clinica è solitamente subacuta e si manifesta a livello dell'apparato riproduttore, dell'apparato respiratorio o dell'occhio.

A livello dell'apparato riproduttore, si sviluppa vaginite nella femmina e balanoposte nel maschio, nello specifico, infiammazioni caratterizzate dalla comparsa di lesioni vescicolo-bollose, noduli linfoidi multipli, iperemia e sporadiche essudazioni a carattere sieroso (Verstegen et al., 2008; Andreani et al., 1998). Condizioni infiammatorie acute, che facilitano la sovrainfezione batterica, o croniche, che esitano nella perdita di tessuto funzionale, possono esitare nell'infertilità o nella sterilità dell'animale (Kustritz, 2005).

A livello dell'apparato respiratorio, si sviluppa una lieve o moderata rinite, faringite e tracheobronchite ed una polmonite bronco-interstiziale, che nei casi complicati è stata anche fatale (Gadsden et al., 2012); lo scolo nasale è sporadico e di tipo sieroso, è stata riportata la letargia, la febbre e la tosse secca di breve durata (Decaro et al., 2008). Tradizionalmente, l'CaHV-1 veniva inserito nell'elenco degli agenti infettivi responsabili del CIRDC (Canine infectious respiratory disease complex), insieme a *Bordetella bronchiseptica*, *Canine Adenovirus-2*, *Canine Distemper virus* e *Canine Parainfluenza virus*, tuttavia, uno studio americano del 2015 (Lavan e Knesl, 2015) dimostra che l'CaHV-1 non è considerabile come patogeno primario, ma piuttosto

come opportunistica, che, eventualmente, si riattiva durante la malattia respiratoria esacerbando il quadro clinico.

La superficie oculare, tipicamente di entrambi gli occhi, può essere variamente compromessa e coinvolgere le palpebre, la cornea o la congiuntiva; quando il soggetto è immunocompetente compare, eventualmente, una forma clinica molto lieve, che però potrebbe diventare assai aggressiva, persistente e refrattaria ai trattamenti, tanto da cronicizzare e causare lesioni poi permanenti (Evermann et al., 2011). La congiuntivite è il sintomo clinico più frequente, che compare sia in occasione dell'infezione primaria che dopo la riattivazione del virus ed è quindi molto importante inserire questa eziologia virale nell'elenco delle diagnosi differenziali di congiuntivite. La congiuntivite erpetica è caratterizzata da iperemia, chemosi ed essudazioni mucose; nei casi gravi, la congiuntivite può esacerbarsi in ulcera. Anche la cheratite è un sintomo oculare molto frequente, che può comparire in qualsiasi fase dell'infezione erpetica canina e può evolvere nella forma più grave, l'ulcera. La cheratite causata dall'CaHV-1 presenta fotofobia, lacrimazione eccessiva, prurito e, in maniera peculiare, delle ulcere corneali ramificate, evidenziabili con tecniche di immunofluorescenza (basate sull'utilizzo del rosa Bengala o della fluoresceina sodica) e la prominente terminale dei bulbi terminali di Krause. A livello palpebrale si riporta blefarospasmo con fotofobia e blefarite focale o generalizzata con eritema, iperemia, edema, essudato e formazione di croste; le lesioni palpebrali possono risultare dall'auto-traumatismo secondario al discomfort percepito a livello di cornea o di congiuntiva. Solitamente, la severità della forma clinica oculare raggiunge il suo picco dai sette ai dieci giorni dall'infezione e si risolve nell'arco di due settimane. Si riportano anche forme di cataratta, panuveite, retinite e neurite del nervo ottico con possibile perdita parziale o totale della vista (Evermann et al., 2011).

Per quanto il ganglio vestibolare sia stato individuato come sito di latenza del virus, anche il recente studio tedesco (Parzefall et al., 2011), ha concluso che l'CaHV-1 non è causa di alcun segno clinico rilevante a carattere uditivo.

La conseguenza più grave di un'infezione virale in un adulto è nel caso della gravidanza, poiché il virus, per quanto possa non dare alcuna manifestazione clinica alla madre, va a replicare nella mucosa genitale del canale del parto e/o nel trofoblasto placentare, infettando il feto (Andreani et al., 1998). Il CaHV-1 è conosciuto soprattutto per le forme cliniche che colpiscono i feti e i neonati. L'infezione viene trasmessa ai cuccioli perché le madri gravide contraggono il virus o per la prima volta, sono cioè naïve o sviluppano l'infezione per la riattivazione del virus: quando la madre non ha una copertura anticorpale sufficiente per proteggersi dal virus, inevitabilmente questo trova nei feti l'habitat ideale per replicare liberamente. Il CaHV-1, durante la gravidanza, si diffonde alla placenta ed eventualmente anche nel circolo sistemico del feto stesso (Ström Holst et al., 2012; Greene, 2003); in base allo stadio della gravidanza, le conseguenze sono diverse e comprendono (Evermann et al., 2011):

- Riassorbimenti embrionali
- Aborti con possibile mummificazione
- Nascita di feti nati-morti

Solitamente, dopo l'episodio acuto di una gravidanza patologica, la cagna acquisisce l'immunocompetenza, onde per cui le gravidanze successive con più probabilità avranno successo, a condizione che non si presentino i fattori di rischio (*Overview of Canine Herpesviral Infection*, Merck Veterinary Manual, 2016). Uno studio svedese del 2012 (Ström Holst et al., 2012) riporta una variabile correlazione tra il titolo anticorpale e l'esito della gravidanza: su un gruppo di dodici cagne gravide, due hanno presentato un episodio di morte embrionale e

possedevano un titolo anticorpale scarso-moderato per CaHV-1, quando se ne prevedeva una crescita per lo stato stesso di gravidanza, invece un'altra cagna vaccinata ha riassorbito l'embrione e, infine, altre due, nonostante non fossero state vaccinate e possedessero un elevato titolo anticorpale, riferibile ad un'infezione acuta recente, non hanno avuto nessun effetto negativo sulla gravidanza; anche lo studio di Ronsse (Ronsse et al., 2004) giunge alla conclusione che, al di là della maggior tendenza all'aborto nelle cagne sieropositive, non sia convincente l'associazione tra i disordini riproduttivi e i titoli anticorpali per CaHV-1. In contrapposizione a queste conclusioni, si pone lo studio finlandese del 2009, che attesta che i cani che derivano da canili affetti da disordini riproduttivi hanno un titolo anticorpale significativamente più alto rispetto ai cani che provengono da canili che non possiedono alcuna problematica riproduttiva (Dahlbom et al., 2009).

Molto più frequente è la forma clinica neonatale (Evermann et al., 2011). I neonati di tre giorni e i cuccioli di meno di tre settimane si infettano dalla madre dopo aver attraversato il canale del parto contaminato e/o per via orizzontale tramite i secreti materni; ovviamente, anche in questo caso, la madre deve avere nel circolo il virus attivo, in assenza di anticorpi neutralizzanti. I cuccioli, a causa dell'immaturità del sistema immunitario, dell'assenza della protezione passiva colostrale e dell'ipotermia costante, per l'immaturo sistema di termoregolazione, diventano gli ospiti ideali per la replicazione del virus, che, in breve tempo, causa una setticemia acuta e letale, nella maggior parte dei casi (Decaro et al., 2008). Nella cucciolata infetta possono esserci anche dei cuccioli che riescono a sopravvivere, nonostante le lesioni cardiache e neurologiche che ne esitano, magari anche senza alcun sintomo o, almeno, fino a quando il virus non muta (Verstegen et al., 2008). L'esito dell'acuta viremia neonatale dipende molto dalle condizioni ambientali: una temperatura ambientale elevata e il buono stato igienico della sala parto sono fattori fondamentali per inibire la crescita virale. I cuccioli e i neonati infetti, dopo un periodo di

incubazione di 3-8 giorni (Andreani et al., 1998), iniziano a presentare una sintomatologia molto vasta, che rivela la compromissione di più apparati e sistemi dell'organismo (Andreani et al., 1998; Farabolini et al., 2010; Decaro et al., 2008):

- Forme gastroenteriche: enterite con diarrea con feci pastose, inodori, di colore giallo-verdastro, con anoressia e forti dolori addominali;
- Forme neurologiche: encefalomielite con depressione del sensorio e letargia, guaiti indicativi di sofferenza grave e disinteresse verso i fratelli e verso la madre; è descritta anche incoordinazione motoria;
- Forme vascolari: edema sottocutaneo; petecchie cutanee; eritema e papule cutanee;
- Forme respiratorie: rinite con dispnea e scolo nasale sieroso o emorragico;
- Ipotermia

La morte solitamente incorre, per i soggetti più gravi, in 48 ore dall'aggravamento dei sintomi; coloro i quali sopravvivono, come detto precedentemente, sviluppano una forma di solito asintomatica correlata alla latenza del virus, che una volta riattivato (di solito dopo le tre settimane di vita), potrà causare nuovamente forme subcliniche o cliniche, che comprendono l'apparato respiratorio, i genitali e l'occhio. I cuccioli che nascono da una madre sieropositiva sono protetti dall'infezione grazie all'assunzione degli anticorpi materni tramite la placenta, parzialmente, e il colostro.

### **3.4 Lesioni anatomopatologiche**

Il CaHV-1 ha un'attività essenzialmente di necrosi cellulare diretta, caratterizzata dalla formazione di corpi inclusi intranucleari eosinofili (Larsen et al., 2015); a livello macroscopico, si osservano lesioni focali o multifocali di tipo necrotico-emorragico, circondate, alla periferia, da

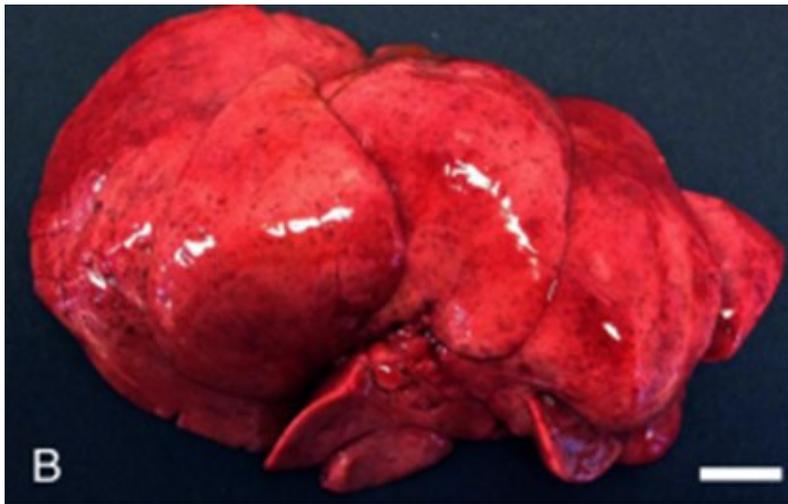
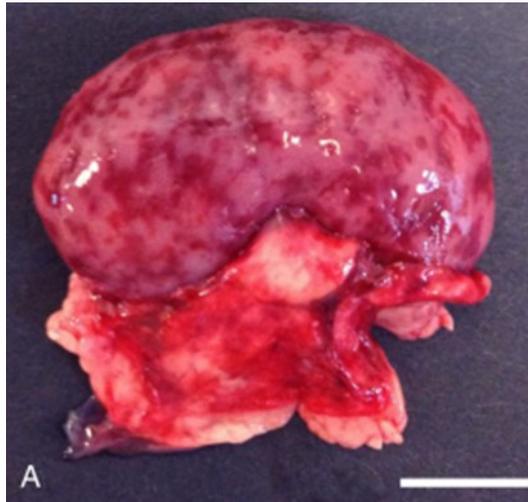
vescicolo-bollose. Sulla base delle forme cliniche e indipendentemente dall'età del soggetto, questi quadri anatomopatologici compaiono su parenchimi diversi (Andreani et al., 1998). A livello dell'apparato respiratorio, si reperta polmonite interstiziale, con necrosi multifocale degli alveoli e segni di flogosi nel tratto delle alte vie respiratorie con edema e iperemia. A livello dei genitali, si rilevano noduli linfoidi e lesioni vescicolo-bollose. A livello oculare, segni di infiammazione sono diffusi a tutte le componenti dell'occhio, soprattutto alle palpebre, alla cornea e alla congiuntiva; segni caratteristici dell'infezione erpetica sono l'ulcera corneale ramificata e la prominente terminale dei bulbi terminali di Krause. A livello cerebrale, i cuccioli e i neonati possono presentare fatti necrotici e degenerativi dei neuroni con microgliosi, infiltrazione perivascolare da mononucleati, emorragie e inclusi nucleari negli astrociti. Anche il tratto intestinale, il fegato, il miocardio, la corticale del rene e il surrene possono presentare lesioni focali o multifocali di tipo necrotico-emorragico; possono presentarsi versamenti pleurici e/o addominali (Kustritz, 2005) e incremento di volume del fegato, del rene, della milza e dei linfonodi (Decaro et al., 2008; Larsen et al., 2015). È possibile riscontrare delle lesioni anatomopatologiche che si riferiscono a lesioni da stress intrauterino, come l'aspirazione di liquido amniotico in polmoni con atelettasia congenita o lesioni legate alla presenza di batteri, patogeni primari o secondari, come attestano i reperti di essudati suppurativi: ulteriore dimostrazione della correlazione biunivoca tra il CaHV-1 e l'immunodepressione, perché il CaHV-1 è opportunistica e contemporaneamente capace di predisporre ad altre infezioni o al loro peggioramento, se già esistenti (Larsen et al., 2015). Esistono casi, in letteratura (Larsen et al., 2015; Ström Holst et al., 2012), che riportano di nati-mortalità e morte neonatale in cucciolate provenienti da madri infette da CaHV-1, ma in totale assenza di lesioni anatomopatologiche caratteristiche.

Aree di necrosi diffuse sono visibili nelle placenti delle cagne infette (Decaro et al., 2008).

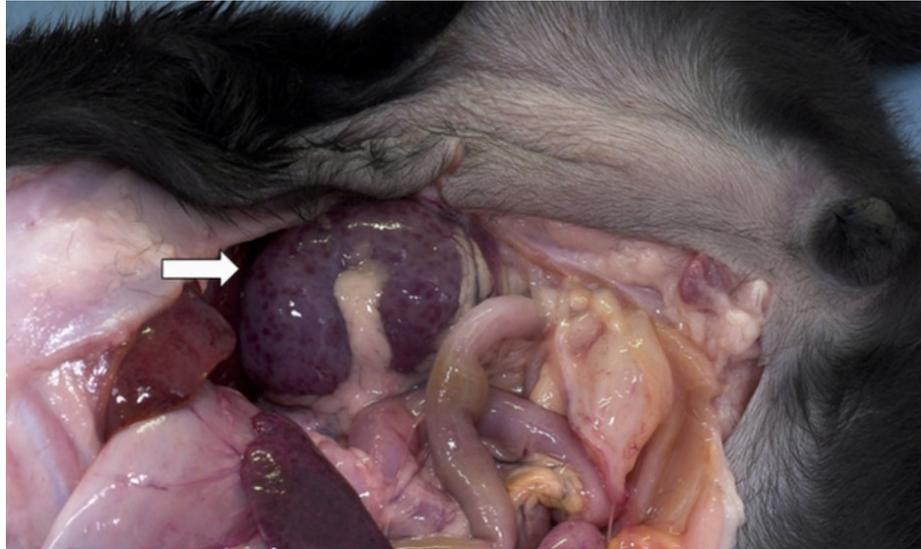
Nei rari casi di guarigione, i cuccioli colpiti presentano reliquati che si traducono in meningoencefalomielite granulomatosa, polmonite e pleurite fibrinosa (Andreani et al., 1998).



*Figura 10. Polmone di un cane neonato infetto da CaHV-1. Il polmone non è collassato e con lesioni multifocali pallide e rotondeggianti, suggestive di necrosi interstiziale. Evermann James F., Ledbetter Eric C., Maes Roger K. 2011 Canine reproductive, respiratory and ocular diseases due to Canine Herpesvirus*



*Figura 11. Rene (A) e fegato (B) di cane neonato infetto da CaHV-1. Gli organi mostrano innumerevoli petecchie emorragiche e il fegato è inoltre aumentato di volume.  
Larsen Rikke W., Kiupel Matti Kiupel, Balzer Hans-Jörg and Agerholm Jørgen S, 2015  
Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark.*



*Figura 12. Cane neonato infetto da CaHV-1. Tutti gli organi (la freccia indica il rene) hanno delle lesioni focali necrotico-emorragiche.  
Lamm C.G., Njaa B.L., 2012 Clinical approach to abortion, stillbirth, and neonatal death in dogs and cats.*

### 3.5 Diagnosi

L'anamnesi, i sintomi clinici e le lesioni anatomopatologiche possono far sospettare la presenza di CaHV-1, senza fornire alcuna certezza, poiché sono assenti elementi patognomonic. La diagnosi clinica è tuttavia agevolata dal comportamento della malattia in funzione dell'età, essendo dimostrato che le infezioni da CaHV-1 assumono in prevalenza andamento grave ed esito letale in soggetti di età inferiore alle tre settimane. Peraltro, nel caso di animali vivi in collettività, la contemporanea presenza di malattia letale nel cucciolo e di disturbi a carico dell'apparato riproduttore negli adulti è altamente indicativa di infezione da CaHV-1 se si considera la sua diffusione mondiale (Andreani et al., 1998).

Non è infrequente che l'anamnesi sia muta e cioè che la cagna sia asintomatica dal principio o lo sia diventata dopo una prima fase di blanda sintomatologia passata inosservata, per cui è chiaro che anche altre cause, di natura non infettiva, debbano essere prese in considerazione, come

quelle di natura traumatica *intra partum* o ambientale (ossia dipendente dai fattori temperatura ed igiene).

A livello anatomopatologico, la prominente terminale dei bulbi terminali di Krause e le lesioni necrotico-emorragiche sono piuttosto aspecifiche, seppur quelle petecchiali della corticale del rene siano caratteristiche, una volta osservata la normale anatomia della cistifellea, perché le petecchie della corticale del rene sono le stesse dell'epatite infettiva canina, che però, in aggiunta, rende la cistifellea ispessita ed edematosa (*Overview of Canine Herpesviral Infection, Merck Veterinary Manual, 2016*). A livello istologico, i corpi inclusi intranucleari possono essere non semplici da individuare (England e von Heimendahl, 2013). Inoltre, è noto il ruolo di sinergia o di opportunismo del CaHV-1, per cui è facile che gli altri agenti patogeni confondano il quadro clinico e anatomopatologico.

In conclusione, la diagnosi per il CaHV-1 può essere raggiunta solo con una diagnosi di laboratorio, che può essere una diagnosi diretta o indiretta:

- Diagnosi diretta: isolamento virale, reazione a catena della polimerasi (PCR), ibridazione in situ (ISH), tecniche di immunofluorescenza diretta (IFD) e di immunoperossidasi;
- Diagnosi indiretta: tecnica di immunofluorescenza indiretta (IFI), tecnica ELISA o sieroneutralizzazione (SN);

Per la diagnosi diretta si utilizzano campioni cellulari negli adulti, ottenibili con tamponi vaginali o prepuziali o campioni tissutali dei feti morti (come ad esempio, polmone, fegato, rene, milza) non in stato di decomposizione, per cui nemmeno mummificati, refrigerati o fissati in formalina 10% (*Overview of Canine Herpesviral Infection, Merck Veterinary Manual, 2016*). La placenta, per quanto sia il tessuto più indicato per raccogliere informazioni diagnostiche, è il più difficile da reperire poiché solitamente è consumato dalla cagna appena terminato il parto (Lamm e Njaa,

2012). La diagnosi diretta, nel caso degli  $\alpha$ -*Herpesvirus*, trova una scarsa applicazione perché questa famiglia di virus si caratterizza proprio per la latenza e le forme subcliniche e asintomatiche, che determinano un'assente o minima escrezione virale. La diagnosi diretta, sfruttando i tessuti fetali, è utilizzata quando si vuole comprendere la causa dell'aborto, che più difficilmente può essere indagato con una diagnosi indiretta sui fluidi fetali, che, appunto, sono spesso immediatamente consumati dalla cagna.

L'isolamento virale è una metodica ottimale in ottica di identificazione del virus e di produzione vaccinale, in quanto garantisce la presenza del virus vivo e replicante; richiede un substrato, che, nel caso del CaHV-1, è la coltura cellulare derivata dagli organi dei cani venuti a morte o sacrificati e incubata alla temperatura di circa 34-35°C. Un forte orientamento all'identificazione di CaHV-1 è dato dal fatto che tale virus ha capacità replicative attive solo sulle cellule dei canidi, oltre a formare dei sincizi di leucociti attorno alla cellula ospite e a riempirla di inclusi intranucleari, a possedere un nucleocapside con un DNA a doppia elica e di forma icosaedrica, ricoperto da un'*envelope* e con dimensioni comprese tra 120 -200 nm (Andreani et al., 1998; Decaro et al., 2008). L'isolamento virale è una diagnosi confirmatoria (G. C. W. England et al., 2013), che tuttavia viene oggi poco utilizzata perché richiede tempi molto lunghi, come giorni o settimane.

Un'altra metodica poco impiegata è l'immunofluorescenza diretta (IFD), che ha alta specificità, costi e tempi limitati, ma una scarsa sensibilità. Questa tecnica prevede di aggiungere al campione di tessuto fresco un siero marcato con una molecola fluorescente, cosicché, una volta sottoposto alla luce ultravioletta, possano illuminarsi i coniugati formati tra l'anticorpo marcato e il virus (Andreani et al., 1998).

Il test dell'immunoperossidasi è basato sullo stesso principio della IFD, con l'unica differenza che il marcatore dell'anticorpo è un enzima che, una volta formatosi il coniugato, reagisce con il substrato cromogeno.

La tecnica della PCR (reazione a catena della polimerasi) permette di amplificare segmenti specifici di genoma, al fine di dimostrarne semplicemente la sussistenza, ottenerne in quantità dell'ordine dei  $\mu\text{g}$  o di riconoscerne le caratteristiche. La PCR è uno dei metodi più utilizzati per fare diagnosi di *Herpesvirus* poiché possiede un'elevata sensibilità, come attestano la gran parte degli studi epidemiologici di CaHV-1 dell'ultimo ventennio (Bottinelli et al., 2016; Pratelli et al., 2014; Decaro et al., 2008; Evermann et al., 2011; Yeşilbağ et al., 2012). Si sono registrati, tuttavia, casi in cui la PCR ha fornito risultati negativi alla presenza del virus in soggetti provenienti da canile o da allevamento con un'anamnesi di disordini riproduttivi e con un'alta sieroprevalenza di anticorpi contro CaHV-1, in piena discordanza con i dati epidemiologici che attestano una diffusione mondiale del virus; i ricercatori hanno ipotizzato che potesse essere la tecnica stessa della PCR non capace di rilevare i geni virali presenti nell'organismo qualora la riattivazione del virus durasse molto poco (Bottinelli et al., 2016); un'altra ipotesi è che non sempre l'CaHV-1 attraversi la placenta o comunque solo in quota minore, lasciando residui di DNA minimi e difficilmente rilevabili (Larsen et al., 2015; Greene, 2003). La PCR è impiegata tipicamente per riscontrare il virus dal tampone vaginale, che, con la riattivazione del virus dal sito di latenza dei gangli lombosacrali, è teoricamente contaminato con il genoma virale (Bottinelli et al., 2016; Pratelli et al., 2014; Ström Holst et al., 2012); è possibile applicare la PCR su qualsiasi tipo di campione cellulare perché è noto il pantropismo del CaHV-1 (Evermann et al., 2011).

Un'altra tecnica per la diagnosi diretta è l'ibridazione in situ (ISH), che fonde le caratteristiche della PCR con quelle dell'IFD: tale tecnica, infatti, consente la localizzazione precisa di uno

specifico segmento di acido nucleico all'interno di una sezione istologica. Questa metodica si basa sul fatto che gli acidi nucleici, se conservati adeguatamente all'interno di un campione istologico, possono essere rilevati attraverso l'applicazione di un filamento complementare di acido nucleico a cui è attaccata una molecola reporter, resa visibile utilizzando isotopi radioattivi o sostanze fluorescenti (Brown, 1998).

La diagnosi indiretta è eseguibile sul siero o sui fluidi fetali, che possono contenere gli anticorpi specifici per CaHV-1. Come anticipato, gli anticorpi neutralizzanti per l'CaHV-1 iniziano a comparire tra i sette e i quattordici giorni dall'infezione primaria, in quantità modesta poiché CaHV-1 è poco immunizzante e rimangono circolanti per circa due o tre mesi, con un massimo di quindici mesi sebbene a basso titolo (Bottinelli et al., 2016; Yeşilbağ et al., 2012); a seguito invece di una riattivazione virale, gli anticorpi compaiono solo dopo sette giorni e scompaiono in qualche settimana (Bottinelli et al., 2016). Rimanendo gli anticorpi circolanti per un periodo così breve, se si considera una popolazione di cani limitata, è possibile che risulti difficile la rilevazione di una positività sierologica, che è più facile trovare, anche per due anni consecutivi, in una popolazione grande e strutturata come collettività (canile o allevamento), perché se il virus è costantemente presente grazie al ricircolo tra gli animali, attraverso le frequenti riattivazioni e reinfezioni (Bottinelli et al., 2016). Un incremento del titolo anticorpale è possibile osservarlo in corrispondenza dell'estro (Ronsse et al., 2005) e nel caso dell'infezione secondaria dopo riattivazione, con una maggioranza di IgM (Università di Siena, 2016). Una diagnosi indiretta non permette tuttavia di distinguere con certezza un'infezione acuta primaria da un'infezione ricorrente secondaria e non permette nemmeno la distinzione tra gli anticorpi vaccinali e quelli naturali (England e von Heimendahl, 2013).

L'immunofluorescenza indiretta (IFI) dimostra l'esistenza del virus quando si rende visibile alla luce ultravioletta il coniugato formato dall'epitopo virale, il relativo anticorpo primario e l'anticorpo secondario marcato per l'anticorpo primario. Questa metodica diagnostica ha alta specificità, basso costo economico e tempi molto brevi d'esecuzione, ma la sensibilità è bassa. Paragonata alle altre tecniche di diagnosi indiretta, l'IFI non è tra le tecniche d'elezione.

Molto più spesso, per verificare il grado di infezione da *Herpesvirus* in una popolazione canina, si esegue la tecnica ELISA indiretta (enzyme-linked immunosorbent assay), che evidenzia la presenza o meno di anticorpi virali nel siero raccolto. È una metodica dal costo economico limitato, che si esegue in breve tempo e che fornisce una risposta anche in termini quantitativi.

La specificità più alta è posseduta dalla tecnica della sieroneutralizzazione (SN) (Bottinelli et al., 2016), che fornisce anche un'indicazione quali-quantitativa degli anticorpi neutralizzanti presenti e funzionali a debellare il virus. Per fare diagnosi di infezione in una popolazione è sufficiente eseguire un solo esame sierologico, mentre per eseguire una diagnosi di malattia si deve procedere all'effettuazione di due esami sierologici, uno in fase acuta, ossia al momento della comparsa dei sintomi e uno una volta raggiunta la convalescenza, quando c'è la remissione della sintomatologia, che di solito sopraggiunge dopo due o tre settimane, al fine di dimostrare la sieroconversione; tuttavia, tale accorgimento dell'esame del doppio campione di siero non si applica alla diagnosi sierologica di aborto, che si verifica a distanza di settimane o di mesi dalla localizzazione primaria del CaHV-1 e quindi non costituisce l'evento acuto come prima citato (Andreani et al., 1998). Il test della sieroneutralizzazione, quando usato per fare diagnosi d'infezione, può essere associato al complemento, aumentando così il livello di sensibilità.

Il test di sieroneutralizzazione è stato considerato da Ronsse e dal suo gruppo di ricercatori come il metodo di scelta per la sierologia di CaHV-1, nonostante la tecnica ELISA indiretta si sia dimostrata più sensibile e con maggiori vantaggi pratici (Ronsse et al., 2004; Ronsse et al., 2002).

### **3.6 Epidemiologia**

L'intera letteratura è concorde nell'affermare che il CaHV-1 sia diffuso in maniera rilevante in tutto il mondo: è stata dimostrata una variabilità d'incidenza del virus compresa tra 60-85%, dipendente dal Paese considerato, attraverso l'utilizzo, principalmente, di test sierologici; questa incidenza è, tra l'altro, sottostimata perché questo tipo di metodica diagnostica, come detto, è capace di rilevare solo i cani con infezione acuta primaria o con riattivazione virale in corso (Verstegen et al., 2008). La conservazione di CaHV-1, in natura, è opera del meccanismo di latenza messo in atto dal virus, che gli consente la sopravvivenza nell'ospite all'infinito: anche dopo la guarigione clinica, l'ospite rimane un potenziale diffusore del virus, che può riattivarsi dal sito di latenza, indisturbato, perché il sistema immunitario ha un tempo di risposta molto lento e non pienamente efficiente (Andreani et al., 1998). La presenza del virus nell'organismo non necessariamente comporta la comparsa di una sintomatologia significativa o costante e regolare nel tempo e ciò è irrilevante dal punto di vista epidemiologico, ma non per i clinici e i detentori dei cani infetti, che tendono a sottovalutare o, addirittura, a non riconoscere i piccoli segnali di infezione erpetica; il risultato è lo scarso approfondimento di episodi di disordini riproduttivi sporadici ed irregolari nel tempo, che vengono ritenuti casuali, e per questo non accompagnati da indagini diagnostiche e di forme cliniche inusuali, come quella oculare, che rimangono prive di diagnosi e trattate unicamente con una terapia sintomatica (Krogenæs et al., 2014; Decaro et al., 2008).

Studi recenti, relativi all'ultimo ventennio, permettono di percepire la diffusione del virus nei vari Paesi, considerando sempre la sottostima delle percentuali. In tutti questi studi la popolazione scelta è un canile o un allevamento da riproduzione, perché si tratta di ambienti ampi e ad alta densità, che facilitano la rilevazione degli anticorpi per il CaHV-1 – dato il continuo ricircolo del virus (Bottinelli et al., 2016; Rota et al., 2020) – costituendo così un campione, relativamente, rappresentativo; inoltre, l'allevamento da riproduzione ha anche maggior interesse nel perseguire un'indagine diagnostica a fronte di problemi riproduttivi multipli, rispetto ad un proprietario, che possiede solitamente uno o due cani.

A proposito dell'Italia, si attesta una diffusione di CaHV-1 diversa nelle tre macroregioni del Nord, del Centro e del Sud Italia. Lo studio di Bottinelli e colleghi (Bottinelli et al., 2016) registra una totale assenza di CaHV-1 nell'Italia Centrale, dimostrata con l'utilizzo di un test di SN con doppio campione di siero e con PCR eseguita sui tessuti fetali; considerando l'alta densità di popolazione del canile scelto, i numerosi problemi di ordine riproduttivo e la nota diffusione del virus a livello globale, i ricercatori concludono affermando che il virus sia in realtà presente in canile, ma che la scarsa immunogenicità del CaHV-1 e la decrescita rapida del titolo anticorpale appena dopo l'esposizione, non abbiano permesso la rilevazione degli anticorpi e che la breve riattivazione del virus non abbia permesso alla PCR di rilevare alcun residuo genomico. Lo studio di Tempesta e colleghi (Tempesta et al., 1998) registra una sieroprevalenza del 27,9% in Puglia e, a distanza di anni, Pratelli e colleghi (Pratelli et al., 2014) hanno registrato il 14,6% nel Sud Italia, testando 865 cagne con due test a diagnosi indiretta ( i positivi al test SN venivano poi sottoposti al test di IFI), sebbene le sedici cagne d'allevamento testate con PCR siano risultate negative; anche quest'ultimo studio rileva, quindi, la diffusione del virus in Italia, in concordanza con i dati globali, sebbene i titoli anticorpali trovati siano medio-bassi, ma ciò viene motivato dalla scarsa emivita degli anticorpi, che declinano in pochi mesi. Rota e colleghi, sfruttando il test sierologico della

SN, hanno raccolto dati sulla diffusione del CaHV-1 nel Nord Italia (Rota et al., 2020), arrivando a dimostrarne un'incidenza del 50,3% nel quasi 70% dei canili e allevamenti piemontesi, con alto titolo anticorpale derivante da un'infezione naturale; si è osservato, inoltre, che la maggior parte degli animali sieropositivi, tra l'altro anche ad alto titolo, sono di età superiore all'anno e mezzo: ciò è il risultato di una progressiva sieroconversione che evolve dai ripetuti contatti tra gli animali durante la loro vita.

In Belgio è stimata una sieroprevalenza del 45,75% nella popolazione canina, saggiata tramite test ELISA, con una somiglianza tra quella di canile e quella di proprietà (Ronsse et al., 2002).

In Inghilterra, gli ultimi dati sulla diffusione del CaHV-1 risalgono al 1998 (Reading e Field, 1998) e attestano un'incidenza del 88% nella popolazione domestica di cani, applicando il test ELISA, SN e SN con l'aggiunta del complemento.

Nei Paesi Bassi, 224 cani da diversi canili sono stati testati con ELISA e il 39,3% sono risultati positivi, per cui anche questo paese europeo riscontra una significativa diffusione del virus (Rijsewijk et al., 1999).

Nell'est della Norvegia, si è riscontrata un'alta prevalenza del virus (Krogenæs et al., 2014): l'80% nelle cagne di proprietà e l'85,5% delle cagne d'allevamento sono risultate positive al test dell'immunoperossidasi, con un picco di titolo anticorpale raggiunto durante l'estate, quando sono più frequenti gli incontri con altri cani in passeggiata, al parco, alle manifestazioni o alle competizioni sportive. Come si nota, la differenza di sieroprevalenza tra le due popolazioni di studio è quasi nulla e questo sembrerebbe in disaccordo con quanto detto in precedenza, tuttavia, i ricercatori precisano che, in Norvegia, il numero di cani riproduttori nei canili è molto inferiore a quello che si riscontra nel resto d'Europa, tanto da rendere questo dato non

confrontabile. Nessuno dei cani a titolo positivo aveva manifestazioni cliniche, seppur, nei casi sporadici di aborto, nessuna indagine diagnostica è stata perseguita per motivi economici dai proprietari e questo lascia presagire che il risultato epidemiologico norvegese ottenuto sia sottodiagnosticato; da sottolineare anche che, durante la raccolta anamnestica, si sono riscontrate una buona igiene e gestione della sala parto e bassi livelli di stress nelle madri: questi sono due fattori che abbassano il rischio di impatto della malattia erpetica. Lo studio norvegese conclude affermando che, per quanto sia alta la sieroprevalenza nei riproduttori per CaHV-1, i problemi di fertilità e di morte neonatale dovuti a CaHV-1 non sono di grande importanza in Norvegia.

In Germania, nell'anno 2004, König e colleghi hanno riscontrato nei canili tedeschi una percentuale del 26% di positivi a CaHV-1 (König et al., 2004).

I dati francesi sono meno recenti, tuttavia riportano una moderata sieroprevalenza, con un 75-80% di allevamenti infetti (Lacheretz A. e Cognard S., 1998; England e von Heimendahl, 2013).

Dopo un passato in cui il CaHV-1 aveva causato grandi disastri nel settore della riproduzione, in Repubblica Ceca è attivo il monitoraggio del virus sul territorio: lo studio del 2020 ha riportato una prevalenza del 37% dei 68 cani testati con tecnica ELISA (Čonková-Skybová et al., 2020).

A proposito della diffusione del CaHV-1 in Danimarca, si riporta uno studio del 2015 (Larsen et al., 2015) che stima una prevalenza del 22,7% in una popolazione di 57 cuccioli nati morti o morti nelle tre settimane successive al parto, dimostrata con l'utilizzo della PCR sui tessuti fetali (polmone o fegato o milza o reni). Il risultato più interessante è che dei tredici cuccioli positivi a PCR, solo uno presentava lesioni istopatologiche caratteristiche e una forte positività a ISH, per cui se ci si fosse interrotti nella procedura diagnostica alla necropsia, non si sarebbe trovato il

risultato ottenuto: questo studio, oltre a considerare l'*Herpesvirus* come fattore predisponente o aggravante di una patologia (vedi paragrafo 3.4 Lesioni anatomopatologiche), dimostra anche come sia facile sottodiagnosticare la presenza, e quindi la reale diffusione, del CaHV-1 in una popolazione, qualora non si disponesse dell'interesse scientifico o della necessaria disponibilità economica.

Lo studio finlandese di Dahlbom e colleghi (Dahlbom et al., 2009) saggia, con il test dell'immunoperossidasi, una popolazione canina derivante da 94 canili diversi, sparsi sul territorio e trova una sieroprevalenza del 81,5%; nel dettaglio, i cani provenienti da canili con problemi riproduttivi avevano tutti un alto titolo anticorpale, superiore a 1:160, mentre solo il 65% dei cani provenienti da canili senza problemi riproduttivi mostravano un moderato titolo anticorpale (1:80).

Lo studio svedese di Ström Holst e colleghi (Ström Holst et al., 2012) ha analizzato venti cagne, di cui tre vaccinate per CaHV-1, eseguendo la PCR sui tamponi vaginali e la tecnica dell'immunoperossidasi sul siero. Nonostante l'obiettivo dello studio non fosse l'epidemiologia dell'infezione erpetica, è interessante osservare che tutti gli animali erano sieropositivi, che non tutte le madri sieropositive hanno abortito feti, che all'esame necroscopico, poi, non hanno mostrato alcun segno anatomopatologico caratteristico dell'CaHV-1 ed infine, che il titolo anticorpale non ha subito alcun aumento significativo durante la gravidanza, situazione che la letteratura ha da sempre indicato come fattore predisponente la riattivazione virale.

Ampliando la visione al resto del globo, consideriamo i dati epidemiologici più recenti riferibili al resto degli altri grandi continenti.

Negli Stati Uniti d'America, dove per la prima volta è stato scoperto il CaHV-1, non è nota una prevalenza del virus che sia rappresentativa di tutto il Paese e, difatti, si possiedono solo una serie di scarse e imprecise informazioni. Dati molto vecchi, relativi all'anno 1969, stimano la presenza dell'CaHV-1 pari al 13% (Lundgren D.L. e Clapper W.E., 1969) e Fulton e colleghi hanno trovato una sieroprevalenza di anticorpi per CaHV-1 del 6% nella città di Washington (Fulton et al., 1974). Dati più recenti sulla diffusione del CaHV-1 in USA sono assenti, per quanto siano numerosi gli studi che ne dimostrano la presenza sul territorio: anticorpi contro CaHV-1 sono stati trovati nelle lontre a New York (Kimber et al., 2000) e nel lupo (Brandell et al., 2021); è stato identificato il CaHV-1 nel complesso della malattia infettiva respiratoria (CIRDC) con un ruolo di opportunista e di esacerbazione della malattia stessa (Lavan e Knesl, 2015); episodi di viremia acuta letale da infezione erpetica si sono registrati sia in animali adulti in Michigan (Gadsden et al., 2012) che nei neonati (Muro et al., 2015); lo studio di Kapil attesta la persistenza, per almeno tre anni, di CaHV-1, in un allevamento di Bulldog in Arkansas (Kapil, 2015); molte ricerche in materia oculistica sono state fatte dal dottor Ledbetter della Cornell University (Ledbetter et al., 2009; Mundy et al., 2012; Evermann et al., 2011), che dimostrano l'importanza di inserire l'infezione da CaHV-1 tra le diagnosi differenziali per i disturbi oculari, a maggior ragione nei soggetti immunocompromessi per le terapia prolungate con corticosteroidi o chemioterapici.

Un 87% di sieroprevalenza è stata stimata, con test ELISA, nei canili dell'area metropolitana di Città del Messico nel 2016 (Lara et al., 2016).

In Giappone, la presenza di CaHV-1 è comune e da uno studio del 2010 (Kawakami et al., 2010) è emersa la presenza di anticorpi per CaHV-1 nel 21.7% dei cani testati con PCR e SN con l'aggiunta di complemento.

Lo studio di Babaei e colleghi (Babaei et al., 2010) prende in esame una popolazione totale di 82 cani, di cui 47 domestici e 35 da canile, apparentemente sani e distribuiti su un territorio ampio del sud-est dell'Iran; dal duplice test diagnostico, eseguito con ELISA e SN, i ricercatori hanno trovato una sieroprevalenza totale del 20,7%, senza significative differenze tra i due sottogruppi. Nonostante siano consigliate ulteriori ricerche di approfondimento, lo studio conclude che molto probabilmente il CaHV-1 è endemico in Iran.

Una prevalenza moderatamente alta è stata rilevata con la tecnica ELISA e la SN, in Turchia, pari al 62% della popolazione di cani domestici e da canile, con un titolo anticorpale basso (1:16), ma è comprensibile, considerando la rapida decrescita degli anticorpi; i soggetti più a rischio sono risultati essere quelli che vivono in condizioni di scarsa igiene, che hanno già delle problematiche respiratorie e riproduttive in corso o che sono in stato di gravidanza (Yeşilbağ et al., 2012).

Nonostante il crescere della temperatura ambientale, anche nel sud dell'Africa, precisamente nella provincia di Gauteng in Sud Africa, il virus circola nei canili e negli allevamenti, con un'incidenza del 43%, riscontrata con tecnica ELISA e SN; nello studio, i ricercatori sollecitano al tempestivo intervento, per garantire la sopravvivenza dei neonati e la fertilità delle cagne, onde per cui si augurano che, presto, una compagnia farmaceutica introduca un vaccino usufruibile anche in Sud Africa (Nöthling et al., 2008).

Nello stato di Parà, in Brasile, utilizzando la PCR, è stata trovata una sieroprevalenza del 8,2% (Castro et al., 2022); considerando l'alta densità di cani in stato di randagismo, le scarse condizioni igieniche e le dimensioni decisamente ridotte del Parà rispetto all'intero territorio brasiliano, è altamente probabile che questa percentuale sia solo la "punta dell'iceberg".

### 3.7 Terapia e prevenzione

Non esiste un trattamento farmacologico specifico per l'infezione erpetica da CaHV-1 e, in realtà, non sussiste nemmeno l'interesse sanitario né economico per trovarlo, perché numerosi, nell'adulto, sono i casi asintomatici o paucisintomatici e perché, nel cucciolo, è troppo tempestiva l'evoluzione dell'infezione per permettere un intervento terapeutico e sperare nella guarigione clinica – se il virus va in latenza -, che comunque, se raggiunta, comporta danni cardiaci, neurologici, epatici e renali rilevanti (Andreani et al., 1998; *Overview of Canine Herpesviral Infection*, Merck Veterinary Manual, 2016). In letteratura, esiste, tuttavia, la segnalazione di qualche trattamento efficace con i farmaci antivirali aciclovir e vidarabina (England e von Heimendahl, 2013; Evermann et al., 2011) e cidofir per la malattia oculare (*Overview of Canine Herpesviral Infection*, Merck Veterinary Manual, 2016). Per il trattamento delle forme cliniche ai genitali e all'apparato respiratorio, è indicato un trattamento puramente sintomatico, mentre per la forma clinica oculare è consigliato, oltre al trattamento sintomatico, anche l'uso di un antivirale oftalmico, dell'atropina e di un antimicrobico (Evermann et al., 2011). Il trattamento con siero immune della madre infetta è stato descritto da alcuni autori come inefficace nei cuccioli infetti (England e von Heimendahl, 2013) e capace invece di diminuirne la mortalità da altri (Evermann et al., 2011). È noto invece che l'assunzione di colostro possa fornire l'immunità passiva necessaria alla protezione dei cuccioli, qualora la madre avesse raggiunto l'immunocompetenza. Il ruolo fondamentale del colostro, nella prima alimentazione del cucciolo, è garantito non solo dalla presenza degli anticorpi neutralizzanti della madre, ma, in parte, anche dalla lattoferrina, la proteina che impedisce al virus di ancorarsi alle cellule bersaglio e di replicare, legandosi anche al ferro, metallo fondamentale alla crescita virale (Masson e Heremans, 1971). Uno studio giapponese del 2003 (Tanaka et al., 2003) ha dimostrato sperimentalmente che la lattoferrina, indipendentemente dalla specie d'origine, è capace di

inibire l'infezione e la replicazione del CaHV-1 nelle cellule canine, se presente con un range di concentrazione tra 0,125-1 mg/ml. Nel colostro della cagna, tuttavia, la lattoferrina è presente alla concentrazione di 0,5 mg/ml, per cui, i ricercatori giapponesi, suggeriscono la possibilità che, anche solo un'integrazione di lattoferrina, data ai cuccioli il prima possibile, possa apportare buoni risultati; ovviamente, questo rappresenterebbe solo l'inizio di una ricerca più approfondita per trovare un farmaco naturale e poco dispendioso contro l'infezione erpetica.

Ad oggi, comunque, non esiste un trattamento farmacologico pienamente efficace, per cui l'unico strumento in essere contro il CaHV-1 è la prevenzione, intesa come profilassi vaccinale e come maggior cura e attenzione da parte dell'allevatore/proprietario/detentore per la riduzione dei fattori di rischio (Andreani et al., 1998; Farabolini et al., 2010; Evermann et al., 2011). Quest'ultimo concetto è utile non solo alla prevenzione del CaHV-1, ma è trasversale a tutti i campi in cui è minacciato lo stato di gravidanza e la cucciolata. Nel dettaglio, si consiglia di:

- Avere una scrupolosa attenzione alle condizioni ambientali: considerando che il virus erpetico si diffonde con le secrezioni, è importante organizzare, con regolarità, le pulizie degli ambienti, soprattutto quando più animali condividono un comune spazio. Una cura maggiore dev'essere tenuta nella sala parto, che deve ospitare delle creature molto fragili, sensibili alle basse temperature e carenti di un sistema immunitario competente. Sapendo, inoltre, che il virus non tollera le alte temperature, la temperatura della sala parto dovrà tenersi tra i 28-30°C durante la prima settimana, tra i 24-26°C durante la seconda e, infine, intorno ai 21°C durante la terza settimana e il tasso di umidità ottimale dovrebbe aggirarsi tra il 55% e il 60%. I manuali di ostetricia (Farabolini et al., 2010) consigliano di usufruire di tappeti scaldanti, piuttosto che di lampade a infrarossi, poiché il calore da contatto è migliore di quello da irradiazione;

- Screening delle cagne da riproduzione: se si tratta di un allevamento da riproduzione, è consigliato eseguire uno screening anticorpale a tutte le cagne fertili, al fine di individuare le infette ed eliminarle dal programma riproduttivo; tuttavia, se l'allevamento fosse endemico per CaHV-1, è bene comunque considerare che, di solito, dopo la prima cucciolata infetta, già la successiva è normale, grazie all'immunità anticorpale raggiunta, a meno che non si esaurisca prima o incorra una riattivazione del virus (Kustritz, 2005);
- Separare le cucciolate: qualora si trattasse di un allevamento, è molto importante evitare delle contaminazioni tra le varie cucciolate, a maggior ragione se le madri riportano un'anamnesi di infezione da CaHV-1. In tutti i casi, nonostante alcuni studi rivelino il contrario (Ström Holst et al., 2012), la bibliografia attuale attesta che la gravidanza, soprattutto se associata ad altri fattori stressanti, può indurre la riattivazione del virus in latenza e causare non solo la comparsa, magari, di una forma clinica recrudescente, ma soprattutto l'escrezione del virus nell'ambiente;
- Far assumere il colostro ai cuccioli: è fondamentale, qualora la cagna abbia raggiunto la guarigione clinica, che i cuccioli assumano il colostro contenente gli anticorpi contro il CaHV-1, così da godere, per un paio di settimane, di una buona protezione immunitaria (*Overview of Canine Herpesviral Infection*, Merck Veterinary Manual, 2016).

Queste manovre preventive è bene che vengano comunque rafforzate ulteriormente dalla vaccinazione. È fornito dalla Boehringer Ingelheim Animal Health France il vaccino Eurican Herpes 205, un vaccino inattivato che contiene antigeni glicoproteici di *Canid Herpesvirus-1* ceppo F205 adiuvati con olio leggero di paraffina; il protocollo vaccinale prevede una duplice iniezione sottocutanea, la prima da eseguirsi durante il calore o dai sette ai dieci giorni dopo la data presunta dell'accoppiamento, mentre la seconda dopo una o due settimane prima della data prevista per il parto; sono previsti richiami durante ogni gravidanza, seguendo lo stesso schema

(Eurican Herpes 205, European Medicines Agency, 2021). Il vaccino mira all'immunizzazione delle cagne gravide per prevenire nei cuccioli, attraverso l'immunità passiva, la mortalità, i sintomi e le lesioni causate dall'infezione erpetica del cane contratta nei primi giorni di vita; è fondamentale che il cucciolo assuma, quindi, una sufficiente dose di colostro, che lo protegge per almeno un paio di mesi (Eurican Herpes 205, European Medicines Agency, 2021). La vaccinazione induce la formazione di un'immunità specifica contro CaHV-1, ma non impedisce comunque l'instaurarsi di un'infezione latente, la parziale escrezione, e quindi diffusione, del virus (Andreani et al., 1998) e, purtroppo, come si deduce dal contenuto del foglietto illustrativo, non impedisce completamente la possibilità che si verifichino aborti e riassorbimenti embrionali (Eurican Herpes 205, European Medicines Agency, 2021), nonostante studi di campo attestino un abbassamento della probabilità (Greene, 2003). Lo studio di Ström Holst e colleghi (Ström Holst et al., 2012) riferisce di un caso di riassorbimento embrionale anche in una cagna vaccinata. Lo studio di Larsen e colleghi (Larsen et al., 2015) riferisce addirittura di una cagna vaccinata, secondo protocollo – almeno in base all'anamnesi raccolta –, che ha partorito dieci cuccioli, di cui tre sono morti neonati, per cui, i ricercatori ipotizzano che la motivazione di tale conseguenza inaspettata sia l'assunzione di scarse quantità di colostro, avendo questi avuto problemi di allattamento nelle prime 24 ore; interessante anche il fatto che solo due di questi tre cuccioli siano risultati positivi a PCR: questa è la dimostrazione che il vaccino non impedisce l'instaurarsi di una infezione latente causata da CaHV-1, entrato nell'organismo durante la copertura vaccinale e nemmeno l'evoluzione in infezione latente da CaHV-1, già presente al momento della vaccinazione; questa conclusione è formulata alla luce del fatto che è impossibile un'interferenza tra la vaccinazione della cagna e il rilievo di DNA di CaHV-1 nei cuccioli, perché il vaccino contiene delle glicoproteine del virus che non riescono a passare l'utero o la placenta (Larsen et al., 2015). Uno schema di vaccinazione alternativo è stato proposto dai ricercatori dello studio di Verstegen e colleghi

(Verstegen et al., 2008), dopo sperimentazioni in laboratorio, che mira alla protezione non solo dei neonati, ma anche della fattrice nel periodo dell'estro, che spesso vede la riattivazione del virus: una prima iniezione è prevista entro il mese prima dell'estro e una seconda al momento dell'accoppiamento; una terza iniezione è da eseguirsi qualora, al controllo sierologico con tecnica SN o ELISA, in prossimità dei trenta giorni di gravidanza, risultasse un titolo anticorpale non superiore a 1:128.

La casa farmaceutica di Eurican Herpes 205 consiglia di vaccinare animali sani. Il foglio illustrativo registra ridotte reazioni avverse: comunemente il vaccino può provocare edema transitorio – sette giorni al massimo - nel punto di inoculo e le reazioni di ipersensibilità sono rare (ossia più di 1, ma meno di 10 animali su 1000 animali trattati) (Eurican Herpes 205, European Medicines Agency, 2021). Il vaccino è disponibile solo sul mercato europeo. È stato ottenuto *in vitro* un CaHV-1 mutato, attenuato da una serie di passaggi ad alte temperature, che è stato poi proposto come vaccino MLV (Modified Live Virus) (Carmichael e Medic, 1978), ma la sua efficacia e sicurezza non sono ancora state testate, per cui non è ancora disponibile in commercio.

Per i Paesi che ne hanno disponibilità, molti autori (Pratelli et al., 2014; Decaro et al., 2008; Rota et al., 2020) ne sollecitano l'utilizzo, soprattutto laddove sussiste una storia di disordini riproduttivi, nonostante possa già esistervi un buon livello di immunità di popolazione, non è mai ottimale perché rimane sempre la possibilità che una cagna gravida sieronegativa possa esporsi all'alto rischio di infezione, considerando l'alta diffusione erpetica; addirittura, in queste collettività, sarebbe bene prendere in considerazione l'opzione di vaccinare tutti i soggetti, indipendentemente dal sesso e dallo stato gravidico, al fine di contenere il più possibile il virus. Essendo un vaccino non core, non si conosce la reale diffusione di questa pratica, tuttavia lo studio di Rota e colleghi del 2020 (Rota et al., 2020) ha stimato, nel Nord Italia, una percentuale di 21,2% di cani domestici vaccinati e una del 8,4% di cani in canile vaccinati. Nel loro studio del

2014, Krogenæs e colleghi (Krogenæs et al., 2014) sostengono che, in Norvegia, i problemi di infertilità e di aborti non siano dovuti principalmente all'CaHV-1, nonostante una sieroprevalenza rilevata dell'80%; in qualsiasi caso, comunque, ritengono che una seppur parziale immunità di popolazione ci sia e che l'eventuale riattivazione del virus, qualora si verificasse, contribuirebbe ad aumentare il livello di immunità, quindi la vaccinazione appare, secondo i ricercatori, superflua, se non per le cagne da riproduzione più anziane – di oltre sei anni d'età- che, per problemi legati all'età, potrebbero avere una più lenta e scarsa risposta immunitaria.

### **3.8 Conclusioni**

Il CaHV-1 è un virus subdolo, che, una volta entrato in una popolazione, non viene più eradicato e questo grazie al meccanismo di latenza che gli permette di persistere all'infinito nell'organismo ospite. L'ospite ha una risposta immunitaria poco duratura, debole e poco numerosa, in termini di produzione di anticorpi, essendo il virus poco immunogeno, onde per cui la guarigione clinica è permessa, ma non la sterilizzazione dell'organismo dal virus. Trascurando le forme cliniche dell'adulto a carico dell'apparato respiratorio, riproduttore e dell'occhio, che rivestono una minor importanza in termini di gravità e di incidenza, i disordini riproduttivi di infertilità, di aborti, di riassorbimenti embrionali e di mortalità neonatale si esplicano, solitamente, durante l'infezione primaria, mentre, già alla successiva gravidanza, l'immunità è spesso conservata. Il problema è la riattivazione del virus, in situazioni di fragilità sistemica, che inevitabilmente travolge il sistema immunitario, che non risponde in modo né repentino né efficace e permette così al virus di ricircolare liberamente: la slatentizzazione del virus causa la possibile recrudescenza dell'infezione, ma avvenendo con minor frequenza e gravità, la conseguenza peggiore della riattivazione virale è l'escrezione del virus nell'ambiente, che in poco tempo si rende endemico. È quindi opinione comune che il CaHV-1 abbia un'enorme diffusione globale,

seppur non attestata, per problemi di sottostima: lo scarso numero di anticorpi e il loro declino rapido nel circolo, la difficoltà della PCR nel rilevare residui di DNA virale quando è breve la riattivazione, lo scarso interesse scientifico, e i mancati quindi fondi economici, per un'infezione spesso asintomatica o gravemente sintomatica, ma a frequenza così sporadica nella vita riproduttiva di una cagna, da non essere riconosciuta, hanno reso l'infezione da CaHV-1 sottodiagnosticata. È, comunque, opportuno sottolineare che molti scienziati (Larsen et al., 2015; Ström Holst et al., 2012; Farabolini et al., 2010) sono concordi nell'affermare che il CaHV-1 non è sempre la causa primaria dei disordini riproduttivi delle cagne da riproduzione; ciò viene anche attestato dai dati da loro raccolti, che riportano di nati-mortalità e morte neonatale in cucciolate provenienti da madri infette da CaHV-1, che hanno assenza di lesioni anatomopatologiche caratteristiche, bassi livelli di infezione e negatività a PCR per CaHV-1. La tecnica evuzionistica (e affascinante) dell'*Herpesvirus* è proprio la variabilità e l'imprevedibilità con la quale si interfaccia al sistema immunitario: l'attività virale del CaHV-1 si esplica in modi diversi, in base al momento temporale dell'esposizione virale, da cui deriva la diversa dose virale, al tempo di incubazione del virus, all'assunzione o meno di colostro e alla qualità dello stesso, in virtù della concentrazione di anticorpi passivi, ai concomitanti fattori ambientali e di salute dell'organismo, comprendendo anche l'ingresso di altri agenti patogeni capaci di causare delle sovrainfezioni (Larsen et al., 2015; Ronsse et al., 2004; Ström Holst et al., 2012).

## Bibliografia

Andreani E., Farina R., Scatozza F., 1998 *Trattato di malattie infettive degli animali*, UTET, seconda edizione.

Babaei H., Akhtardanesh B., Ghanbarpour R., Namjoo, A., 2010 *Serological evidence of canine herpesvirus-1 in dogs of Kerman City, south-east of Iran. Transboundary and Emerging Diseases*, 57(5). <https://doi.org/10.1111/j.1865-1682.2010.01155.x>

Blanco P. G., Rodríguez R., Rube A., Arias D. O., Tórtora M., Díaz J. D., Gobello C., 2011 *Doppler ultrasonographic assessment of maternal and fetal blood flow in abnormal canine pregnancy. Animal Reproduction Science*, 126(1–2).

Bottinelli M., Rampacci E., Stefanetti V., Marenzoni M. L., Malmlov A. M., Coletti M., Passamonti F., 2016 *Serological and biomolecular survey on canine herpesvirus-1 infection in a dog breeding kennel. Journal of Veterinary Medical Science*, 78(5).

Brandell E. E., Cross P. C., Craft M. E., Smith D. W., Dubovi E. J., Gilbertson M. L. J., Wheeldon T., Stephenson J. A., Barber-Meyer S., Borg B. L., Sorum M., Stahler D. R., Kelly A., Anderson M., Cluff H. D., MacNulty D. R., Watts D. E., Roffler G. H., Schwantje H., Hudson P. J., 2021 *Patterns and processes of pathogen exposure in gray wolves across North America. Scientific Reports*, 11(1).

Brown C., 1998 *In situ hybridization with riboprobes: An overview for veterinary pathologists. Veterinary Pathology*, 35(3), 159–167

<https://doi.org/10.1177/030098589803500301>

- Carmichael L. E., Medic B. L. S., 1978 *Small-plaque variant of canine herpesvirus with reduced pathogenicity for newborn pups*. *Infection and Immunity*, 20(1), 108–114
- Castro M. D. S., David M. B. M., Gonçalves E. C., Siqueira A. S., Virgulino R. R., Aguiar D. C. F., 2022 *First molecular detection of canine herpesvirus 1 (CaHV-1) in the Eastern Brazilian Amazon*. *Journal of Veterinary Science*, 23(2), 1–10
- Čonková-Skybová G., Ondřejková A., Mojžišová J., Bárdová K., Reichel P., Korytár Ľ., Drážovská M., Prokeš M., 2020 *Herpesvirus diseases of domestic animals and game species in the Slovak Republic*. *Acta Virol.*, 409-416
- Dahlbom M., Johnsson M., Myllys V., Taponen J., Andersson M., 2009 *Seroprevalence of canine herpesvirus-1 and Brucella canis in Finnish breeding kennels with and without reproductive problems*. *Reproduction in Domestic Animals*, 44(1)
- Decaro N., Martella V., Buonavoglia C., 2008 *Canine Adenoviruses and Herpesvirus*. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 38, Issue 4)
- Di Salvo P., Bocci F., Zelli R., Polisca A., 2006 *Doppler evaluation of maternal and fetal vessels during normal gestation in the bitch*. *Res Vet Sci*, 81, 382-8.
- EMA, 2021 *Eurican Herpes 205*, *European Medicines Agency*
- <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/eurican-herpes-205>
- England G. C., 1998 *Ultrasonographic assessment of abnormal pregnancy*. In *The Veterinary Clinics of North America. Small animal practice* (Vol. 28, Issue 4).

- England G. C. W., Heimendahl A. von., 2013 *Riproduzione e neonatologia del cane e del gatto*, Edizioni veterinarie, seconda edizione, edizione italiana a cura di Pisu M.C.
- Evermann J. F., Ledbetter E. C., Maes R. K., 2011 *Canine reproductive, respiratory, and ocular diseases due to canine herpesvirus*. In *Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice* (Vol. 41, Issue 6)
- Farabolini M., Majolino G., Spallarossa M., Zambelli D., 2010 *Manuale di ostetricia e neonatologia del cane e del gatto*, Elsevier.
- Fulton R., Ott W., Duenwald JC, 1974 *Serum antibodies against canine respiratory viruses: prevalence among dogs of eastern Washington*. *Am J Vet Res*, 853–855.
- Gadsden B. J., Maes R. K., Wise A. G., Kiupel M., Langohr I. M., 2012 *Fatal canid herpesvirus 1 infection in an adult dog*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 24(3)
- Greene E. C., 2003 *Malattie infettive del cane e del gatto*, Antonio Delfino Editore, seconda edizione, edizione italiana a cura di Vitali E., 960
- Kapil S., 2015 *Canid herpesvirus 1 (CHV-1)-related disease in older puppies and CHV-1 shedding in the vagina of adult pregnant dogs*. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 27(6).
- Kawakami K., Ogawa H., Maeda K., Imai A., Ohashi E., Matsunaga S., Tohya Y., Ohshima T., Mochizuki M., 2010 *Nosocomial outbreak of serious canine infectious tracheobronchitis (kennel cough) caused by canine herpesvirus infection*. *Journal of Clinical Microbiology*, 48(4), 1176–1181

- Kimber K. R., Kollias G. V., Dubovi E. J., 2000 *Serologic survey of selected viral agents in recently captured wild north american river otters (Lontra canadensis)*. In Journal of Zoo and Wildlife Medicine (Vol. 31, Issue 2).
- Krogenæs A., Rootwelt V., Larsen S., Renström L., Farstad W., Lund A., 2014 *A serological study of canine herpesvirus-1 infection in a population of breeding bitches in Norway*. Acta Veterinaria Scandinavica, 56
- Kustritz M. V. R., 2005 *Pregnancy diagnosis and abnormalities of pregnancy in the dog*. Theriogenology, 64(3)
- Lacheretz A., Cognard S., 1998 *Epidemiology and serological diagnosis of canine herpesvirus infection*. Revue de Medecine Veterinaire, 149
- Lamm C. G., Njaa B. L., 2012 *Clinical approach to abortion, stillbirth and neonatal death in dogs and cats*. In Veterinary Clinics of North America - Small Animal Practice (Vol. 42, Issue 3)
- Lara E. G. V., Solis J. I. Á., Verde C. C., Crespo J. A. M., Marín L. C., García J. C. D. R., Anda G. V., 2016 *Canine herpesvirus seroprevalence and associated factors in dogs of Mexico*. Open Journal of Veterinary Medicine, 06(10), 149–162.
- Larsen R. W., Kiupel M., Balzer H. J., Agerholm, J. S., 2015 *Prevalence of canid herpesvirus-1 infection in stillborn and dead neonatal puppies in Denmark*. Acta Veterinaria Scandinavica, 57(1)
- Lavan R., Knesl O., 2015 *Prevalence of canine infectious respiratory pathogens in asymptomatic dogs presented at US animal shelters*. Journal of Small Animal Practice, 56(9).

Ledbetter E. C., Dubovi E. J., Kim S. G., Maggs D. J., Bicalho R. C., 2009 *Experimental primary ocular canine herpesvirus-1 infection in adult dogs*. American Journal of Veterinary Research, 70(4)

Lopate C., 2008 *Estimation of gestational age and assessment of canine fetal maturation using radiology and ultrasonography: A review*. Theriogenology, 70(3).

Lundgren D.L., Clapper W.E., 1969 *Neutralization of canine herpesvirus by dog and human serums: a survey* - PubMed

Masson P. L., Heremans J. F., 1971 *Lactoferrin in milk from different species*. Comparative Biochemistry and Physiology, 39(1).

[https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90258-6](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90258-6)

König M., Neiseke J., Thiel H.J., 2004 *Prevalence of canine herpesvirus I (CHV-1) in German kennels*. Tierärztliche Umsch, 559–565.

Miglino M.A., Ambrósio C.E., dos Santos Martins D., Wenceslau C.V., Pfarrer C., Leiser R., 2006 *The carnivore pregnancy: the development of the embryo and fetal membranes*. Theriogenology, 66, 1699-702.

*Miller's anatomy of the dog*, Semantic Scholar. (n.d.). Retrieved April 25, 2022

[https://www.semanticscholar.org/paper/Miller's-anatomy-of-the-dog-](https://www.semanticscholar.org/paper/Miller's-anatomy-of-the-dog-Evans/e5f052609c6080a3a7ec6ff89ee39f706487234d)

[Evans/e5f052609c6080a3a7ec6ff89ee39f706487234d](https://www.semanticscholar.org/paper/Miller's-anatomy-of-the-dog-Evans/e5f052609c6080a3a7ec6ff89ee39f706487234d)

Mundy P., Da Silva E. C., Ledbetter E. C., 2012 *Effects of cyclophosphamide myelosuppression in adult dogs with latent canine herpesvirus-1 infection*. Veterinary Microbiology, 159(1–2)

Muro S. M., Jugan M. C., Ruoff C., Pashmakova M. B., Young B. D., Scott K. D., 2015 *What Is Your Diagnosis? Canine herpesvirus-1 infection*. Journal of the American Veterinary Medical Association, 247(7), 747–749

Nohr B., Hoffmann B., Steinetz B.E., 1993 *Investigation of the endocrine control of parturition in the dog by application of an antigestagen*. J Reprod Fertil Suppl, 47, 542-543

Nöthling J. O., Hüsey D., Steckler D., Ackermann M., 2008 *Seroprevalence of canine herpesvirus in breeding kennels in the Gauteng Province of South Africa*. Theriogenology, 69(3).

*Overview of Canine Herpesviral Infection*, Merck Veterinary Manual, 2016

<https://www.merckvetmanual.com/generalized-conditions/canine-herpesviral-infection/overview-of-canine-herpesviral-infection>

Parzefall B., Fischer A., Blutke A., Schmahl W., Matiasek K., 2011 *Naturally occurring canine herpesvirus-1 infection of the vestibular labyrinth and ganglion of dogs*. Veterinary Journal, 189(1)

Pereira M., Valério-Bolas A., Saraiva-Marques C., Alexandre-Pires G., Da Fonseca I. P., Santos-Gomes G., 2019 *Development of Dog Immune System: From in Uterus to Elderly*. Veterinary Sciences, 6(4)

Phemister R. D., 1974 *Nonneurogenic reproductive failure in the bitch*. The Veterinary Clinics of North America, 4(3), 573–586

Pratelli A., Colao V., Losurdo M., 2014 *Serological and virological detection of canine herpesvirus-1 in adult dogs with and without reproductive disorders*. Veterinary Journal, 200(2)

- Reading M. J., Field H. J., 1998 *A serological study of canine herpes virus-1 infection in the English dog population*. Archives of Virology, 143(8).
- Rijsewijk F. A. M., Luiten E. J., Daus J., Van der Heijden R. W., Van Oirschot J. T., 1999 *Prevalence of antibodies against canine herpesvirus 1 in dogs in The Netherlands in 1997-1998*. Veterinary Microbiology, 65(1), 1–7
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Farnir F., Poulet H., 2004 *Risk factors and reproductive disorders associated with canine herpesvirus-1 (CHV-1)*. Theriogenology, 61(4)
- Ronsse V., Verstegen J., Onclin K., Guiot A. L., Aeberlé C., Nauwynck H. J., Poulet H., 2002 *Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in the Belgian dog population in 2000*. Reproduction in Domestic Animals, 37(5)
- Ronsse V., Verstegen J., Thiry E., Onclin K., Aeberlé C., Brunet S., Poulet H., 2005 *Canine herpesvirus-1 (CHV-1): clinical, serological and virological patterns in breeding colonies*. Theriogenology, 64(1), 61–74
- Rota A., Dogliero A., Biosa T., Messina M., Pregel P., Masoero L., 2020 *Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in breeding dogs with or without vaccination in Northwest Italy*. Animals, 10(7)
- Sjaastad O. V., Sand O., Hove K., 2013 *Fisiologia degli animali domestici*, CEA, edizione italiana a cura di Tamanini C.
- Ström Holst B., Hagberg Gustavsson M., Grapperon-Mathis M., Lilliehöök I., Johannisson A., Isaksson M., Lindhe A., Axné E., 2012 *Canine Herpesvirus During Pregnancy and Non-Pregnant Luteal Phase*. Reproduction in Domestic Animals, 47(SUPPL. 6).

- Studnicki W., Krzyzanowski J., Malinowski E., 1975 *Examination on the period of pregnancy in dogs of same breeds*. *Medycyna Weterynaryjna*, 31, 373–374.
- Tanaka T., Nakatani S., Xuan X., Kumura H., Igarashi I., Shimazaki K. I., 2003 *Antiviral activity of lactoferrin against canine herpesvirus*. *Antiviral Research*, 60(3).
- Tempesta M., Buonavoglia D., Sagazio P., Pratelli A., Buonavoglia C., 1998 *Natural reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats*. *The Veterinary Record*, 143(7), 200
- Università di Siena, 2016 *Virologia- diagnostica*  
[https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/28-04-2016/06\\_diagnostica.pdf](https://www.dbcf.unisi.it/sites/st13/files/allegatiparagrafo/28-04-2016/06_diagnostica.pdf)
- Verstegen J., Dhaliwal G., Verstegen-Onclin K., 2008 *Canine and feline pregnancy loss due to viral and non-infectious causes: A review*. *Theriogenology*, 70(3).
- Vitásková E., Molnár L., Holko I., Supuka P., Černíková L., Bártová E., Sedlák K., 2019 *Serologic survey of selected viral pathogens in free-ranging Eurasian brown bears (Ursus arctos arctos) from Slovakia*. *Journal of Wildlife Diseases*, 55(2)
- Yeşilbağ K., Yalçın E., Tuncer P., Yılmaz Z., 2012 *Seroprevalence of canine herpesvirus-1 in Turkish dog population*. *Research in Veterinary Science*, 92(1)