

Elena Luchetti
Anna Pasquini
Alessandra Rota
Giovanni Cardini
Università di Pisa

Il dosaggio del Progesterone sierico nella specie canina: tre metodi a confronto



Introduzione

Nel moderno allevamento canino è sempre maggiore l'esigenza dell'intervento del veterinario nel settore riproduttivo, sia per risolvere problemi patologici che per gestire correttamente gli accoppiamenti in modo da ottenere più facilmente esiti positivi. È infatti frequente che l'allevatore decida di far riprodurre le proprie femmine con soggetti molto richiesti, o che risiedono a distanza, rendendo necessaria una pianificazione dell'accoppiamento o dell'eventuale inseminazione artificiale con seme conservato e trasportato. Il punto di partenza per raggiungere tali obiettivi è quello di conoscere e riconoscere le varie fasi del ciclo estrale della cagna.

Questo può essere suddiviso in quattro fasi: proestro, estro, diestro e anestro. Il periodo di inattività sessuale (anestro) è seguito da quello che viene comunemente definito "calore", ovvero dalle fasi di proestro ed estro. Il proestro è caratterizzato da segni fisici, più o meno evidenti a seconda dei soggetti, identificabili in edema vaginale e perdite ematiche. L'estro, il momento in cui la cagna generalmente accetta il maschio, è immediatamente successivo al proestro e l'ovulazione avviene spontaneamente all'inizio di questa fase del ciclo. La durata media di queste due fasi è di circa 9 giorni, ma con notevoli differenze tra soggetto e soggetto.

Se non si ha una gravidanza, l'estro è seguito dal diestro che passa impercettibilmente all'anestro. Durante la fase proestrale la componente endocrina predominante è rappresentata dagli estrogeni, i quali oltrepassano la soglia di 25 pg/ml nella fase iniziale per poi



raggiungere concentrazioni di 60-70 pg/ml nel proestro avanzato. Il proestro è caratterizzato oltre che dall'aumento degli estrogeni, da una concentrazione basale di progesterone ematico che risulta essere inferiore a 0,5 ng/ml.

La fine del proestro e l'inizio dell'estro sono caratterizzati dall'aumento dei livelli ematici di progesterone che superano 0,5 ng/ml, e dalla diminuzione dei livelli di estrogeni.

Nella fase estrale i livelli di progesterone aumentano durante il picco dell'ormone luteinizzante (LH), quando raggiungono per la prima volta valori superiori ad 1 ng/ml.

La concentrazione plasmatica di progesterone sale nei giorni successivi, raggiungendo nel giorno dell'ovulazione, valori di 4-8 ng/ml, e continua ad innalzarsi durante l'estro, raggiungendo il livello massimo in diestro, nei successivi 13-28 giorni.

Tradizionalmente, allevatori e proprietari fanno accoppiare due volte le cagne, tra l'undicesimo e il tredicesimo giorno dall'insorgenza del proestro, con la convinzione che gli spermatozoi siano presenti nelle vie genitali femminili nel momento di massima fertilità.

In realtà, quando l'individuazione di queste fasi si basa solo sul comportamento e sulle manifestazioni cliniche, l'ovulazione può aversi in momenti lontani da quanto atteso.

In questi casi l'accoppiamento non è seguito

da successo con una conseguente perdita di tempo che può risultare particolarmente onerosa per l'allevatore.

Lo sviluppo e l'applicazione di metodi più scientifici sono risultati utili per individuare più precisamente la fase estrale del ciclo e diventano indispensabili quando l'accoppiamento necessita un viaggio lungo e costoso. Se il momento dell'ovulazione può essere determinato più precisamente di quanto sia possibile attraverso la semplice osservazione dei segni comportamentali o esterni mostrati dalla cagna, i fallimenti nel concepimento sono meno probabili e inoltre diventa più semplice prevedere la data del parto.

Il medico veterinario dispone nella pratica essenzialmente di tre metodi per rilevare l'ovulazione: la citologia vaginale, la vaginoscopia e la misurazione dei livelli ormonali: LH e progesterone.

Nella pratica clinica la misurazione dei livelli del progesterone per individuare il miglior momento per l'accoppiamento, si rivela essere il metodo più pratico poiché è sicuramente più conveniente ed economico del monitoraggio dell'LH nel siero ed è più affidabile degli altri due.

Sia la citologia che la vaginoscopia risentono infatti di variabili soggettive legate sia all'operatore che alla cagna.

Secondo alcuni autori la determinazione del

progesterone unitamente all'esecuzione dello striscio vaginale costituiscono il metodo di individuazione dell'estro con le migliori garanzie di efficacia.

I progressi tecnologici hanno reso possibile lo sviluppo di metodologie semplici e poco costose per la valutazione dei livelli di progesterone ematico.

Il metodo più valido e accurato nel dosare il progesterone è quello radioimmunoenzimatico (RIA). La sua accuratezza e la sua precisione non compensano la difficoltà tecnica e la pericolosità di impiego da parte del personale addetto; per questi motivi, tale metodo è ad oggi sempre meno diffuso.

Un metodo più economico, meno rischioso e comunque affidabile, dotato di elevata sensibilità è quello di immunochemiluminescenza (CLIA).

Alcuni studiosi hanno messo a confronto le due metodiche, RIA e CLIA, valutando la precisione e l'accuratezza nel dosare il progesterone nel siero.

I risultati, riportati nei seguenti lavori, dimostrano che la precisione del CLIA è più bassa rispetto al RIA nel range tra 1-2 ng/ml, ma che il limite di rilevabilità è più alto nel CLIA. Queste differenze, tuttavia, non risultano clinicamente rilevanti per la riproduzione canina. Tale dosaggio può essere eseguito anche con metodi immunoenzimatici (ELISA) su piastra con lettura spettrofotometrica, che hanno mostrato una buona correlazione con i metodi sopra descritti.

Oggi sono anche disponibili in commercio numerosi kit ELISA semi-quantitativi in grado di rilevare concentrazioni inferiori a 5 ng/ml e superiori a 10 ng/ml, la cui interpretazione può essere rapidamente effettuata con l'osservazione diretta dell'intensità di colore che si sviluppa al termine della reazione. Lavori di valutazione di questi test, svolti in precedenza, riportano dati non concordanti tra loro.

Poiché il ricorso alla determinazione del progesterone ematico nella specie canina è sempre più diffuso in ambito ostetrico veterinario e può quindi risultare utile conoscere esattamente l'attendibilità di kit o strumentazioni facilmente reperibili in Italia, lo scopo

del presente lavoro è quello di valutare la precisione e l'accuratezza di due metodi ELISA commercializzati anche per la specie canina, uno semiquantitativo ed uno quantitativo, confrontandoli tra loro e correlandoli con un metodo basato su un principio diverso, l'immunochemiluminescenza (CLIA), di riconosciuta validità.

Materiali e metodi

Sono stati raccolti 36 campioni di siero refrigerato recapitati al laboratorio di analisi del Dipartimento di Clinica Veterinaria dell'Università di Pisa per il dosaggio del progesterone. Il siero proveniva da cagne esaminate, su richiesta del proprietario, al fine di individuare il momento ideale per l'accoppiamento. Dall'anamnesi tutti i soggetti si trovavano presumibilmente in fase proestrale od estrale. Tutti i campioni sono stati separati in quattro aliquote e congelati a -20°C entro 1 ora. È stato quindi dosato il progesterone utilizzando tre metodi diversi.

Una aliquota di ciascuna cagna è stata analizzata tramite immunochemiluminescenza in fase solida, la seconda aliquota è stata utilizzata per la determinazione del progesterone con metodo immunoenzimatico tramite spettrofotometro; la terza prova è stata effettuata con il kit Ovucheck Premate. Il limite inferiore di linearità è di 0,18 ng/ml per la immunochemiluminescenza e di 0,3 ng/ml per il metodo spettrofotometrico; la sensibilità è rispettivamente di 0,09 ng/ml e di 0,05 ng/ml.

Il test Ovucheck Premate è di tipo semiquantitativo con due standards di riferimento di 5 e 10 ng/ml.

I risultati ottenuti con i tre metodi sono stati comparati tra loro. I dati relativi all'immunochemiluminescenza sono stati correlati con quelli del metodo spettrofotometrico, calcolando il coefficiente di regressione r . I livelli di progesterone ottenuti sia con il metodo spettrofotometrico che con il metodo di immunochemiluminescenza sono stati confrontati con le determinazioni eseguite con Ovucheck Premate, applicando il test χ^2 (chi quadrato).

Per eseguire il test del chi quadrato è stato necessario suddividere anche i valori ottenuti dalle due metodiche quantitative in tre

gruppi: pre-ovulazione (< 5 ng/ml), ovulazione (tra 5 e 10 ng/ml) e post-ovulazione (> 10 ng/ml), in modo da verificare quanti dati si trovavano all'interno dello stesso intervallo.

Le prove spettrofotometriche sono state eseguite contemporaneamente in doppio per i tutti i campioni in modo da valutare l'accuratezza tramite il calcolo del coefficiente di variazione (CV).

Risultati

La tabella 1 contiene i valori medi e le deviazioni standard delle misurazioni del progesterone eseguite con le tre metodiche, suddivise nelle fasi estrali ed il numero dei soggetti per ogni gruppo.

Tabella 1 - Valori medi \pm deviazione standard di progesterone in 36 cagne.

Fasi del ciclo	N soggetti (ng/ml)	CLIA (ng/ml)	ELISA	Kit rapido (ng/ml)
Pre-ovulazione	10	0,2 \pm 0,09	0,5 \pm 0,56	< 5
Ovulazione	12	7,3 \pm 2,22	6,3 \pm 2,57	5 - 10
Post-ovulazione	14	21,4 \pm 4,6	19,7 \pm 4,9	> 10

Nella tabella 2 sono riportati i valori di r (coefficiente di regressione) e i valori di χ^2_{calc} (chi quadrato calcolato) ottenuti dal confronto tra i tre metodi.

Tabella 2 - Valori di r (coefficiente di regressione) e χ^2_{calc} (chi quadrato calcolato) ottenuti dal confronto tra i tre metodi.

ELISA	CLIA	Kit Rapido
CLIA $r = 0,85^*$	ELISA $r = 0,85^*$	ELISA $\chi^2 = 0,09$
Kit Rapido $\chi^2 = 0,09$	Kit Rapido $\chi^2 = 0,00$	CLIA $\chi^2 = 0,00$

* Differenza statisticamente significativa per $p < 0,05$;

Distribuzione di χ^2 tabulato = 5,99 con 2 gradi di libertà per $p < 0,05$.

Per valutare la precisione del metodico quantitativo ELISA è stato calcolato il coefficiente di variazione (CV %) tra i due risultati ottenuti analizzando in doppio lo stesso campione e la medie di questi è risultata uguale a 2,68 %.

Per quanto riguarda il kit rapido, le prove eseguite in doppio hanno dato lo stesso esito in tutti i casi, ma non



è stato possibile valutare la precisione tramite il calcolo di un coefficiente trattandosi di misurazioni semi-quantitative.

Conclusioni

Ad oggi il medico veterinario ha una opportunità in più per bene operare nella gestione della riproduzione canina. Infatti è possibile ricorrere al dosaggio del progesterone come un valido aiuto per l'individuazione del momento ideale per l'accoppiamento o la fecondazione artificiale ed anche per una previsione della data del parto. I metodi utilizzati per questo scopo sono molteplici ed è importante prima di rivolgersi assicurarsi della loro validazione in ambito veterinario ed in particolare per la specie in esame.

In questo lavoro sono stati considerati due metodi ELISA, uno semiquantitativo ed uno quantitativo, confrontandoli tra loro e correlandoli con un terzo metodo basato sull'immunochemiluminescenza (CLIA).

I valori medi e le deviazioni standard relative ai tre metodi riportati in tabella 1 evidenziano la differente sensibilità dei metodi, essendo il metodo semi-quantitativo solo in grado di identificare la giusta fase del ciclo, mentre tramite gli altri due è possibile rilevare anche piccole variazioni nel tempo all'interno della stessa fase. È importante sottolineare che tali differenze sono particolarmente interessanti all'interno delle fasi del proestro e dell'estro, dove l'eventuale aumento del livello di progesterone può indicare l'avvicinarsi del momento atteso.

Dall'osservazione della tabella 2 emerge che esiste un'ottima accuratezza per entrambi i metodi ELISA rispetto al metodo di riferimento (CLIA).

Il metodo ELISA quantitativo ha dimostrato un'ottima precisione con un valore medio di CV % inferiore a tre e quindi molto buono. Il kit rapido esaminato è risultato di esecuzione estremamente semplice e con livelli di accuratezza e precisione buoni ma limitati poiché le determinazioni sono di tipo semi-quantitativo.

Il metodo ELISA quantitativo è di facile esecuzione e fornisce risultati precisi ed accurati con costi contenuti, offrendo il miglior rapporto qualità-prezzo.

Alcune importanti avvertenze riguardano: la curva di taratura da eseguire almeno una volta al mese e la stabilità dei pozzetti e degli standard da conservare con la massima attenzione secondo le modalità riportate nelle istruzioni d'uso.

Il metodo CLIA, di riferimento per i massimi livelli di precisione ed accuratezza, può essere impiegato solo in laboratori veterinari specializzati per i costi estremamente elevati della strumentazione.

In conclusione, in base alle esigenze del caso, è possibile scegliere uno dei tre metodi per dosare il progesterone nelle cagne, conoscendo i vantaggi e i limiti di ogni metodica.

La bibliografia è consultabile sul sito
www.ilprogressoveterinario.it

l'ultima
innovazione
nella
micologia
veterinaria

MARCHIO REGISTRATO

Triazolico di ultima generazione

Specifico per gatti, facile somministrazione

Ampio spettro: testato su 252 specie fungine

Bassa tossicità

Prolungata persistenza, effetto long acting



057 g04

Via M. Buonarroti, 23
Cologno Monzese - MI

JANSSEN
ANIMAL HEALTH
Divisione della Janssen-Cilag SpA