



REGIONE PUGLIA

Dipartimento Agricoltura,
Sviluppo Rurale e Tutela dell'Ambiente.
Sezione Gestione Sostenibile,
Tutela delle Risorse Naturali e Forestali.
Servizio Valorizzazione e Tutela
delle Risorse Naturali e Biodiversità



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO**



SALVAGUARDIA DELL'ASINO MARTINA FRANCA, RAZZA IN VIA D'ESTINZIONE, ATTRAVERSO NUOVE TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA ED ALCUNI ASPETTI SANITARI DELLE MALATTIE INFETTIVE LEGATE ALLA SFERA RIPRODUTTIVA

Facoltà di Medicina Veterinaria

Presidente: Prof. Augusto Carluccio, DVM PhD

Ospedale Veterinario Universitario didattico

Direttore: Prof. Augusto Carluccio, DVM PhD





REGIONE PUGLIA

Dipartimento Agricoltura,
Sviluppo Rurale e Tutela dell'Ambiente.
Sezione Gestione Sostenibile,
Tutela delle Risorse Naturali e Forestali.
Servizio Valorizzazione e Tutela
delle Risorse Naturali e Biodiversità



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO**



SALVAGUARDIA DELL'ASINO MARTINA FRANCA, RAZZA IN VIA D'ESTINZIONE, ATTRAVERSO NUOVE TECNICHE DI RIPRODUZIONE ASSISTITA ED ALCUNI ASPETTI SANITARI DELLE MALATTIE INFETTIVE LEGATE ALLA SFERA RIPRODUTTIVA

Facoltà di Medicina Veterinaria

Preside: Prof. Augusto Carluccio, DVM PhD

Ospedale Veterinario Universitario didattico

Direttore: Prof. Augusto Carluccio, DVM PhD

“Si ringraziano il dirigente del Servizio Valorizzazione
e Tutela delle Risorse Naturali e Biodiversità della Regione Puglia
Dott. Antonio **Ursitti** e i Funzionari:
Carlo **Ferrara**, Donato **Tagliente**, Giuseppe **Pane** e Raffaele **Iliceto**”

- 5 **Premessa**
A. Carluccio
- 7 Indagine per la ricerca di *Taylorella equigenitalis* nelle asine di Martina Franca
C.E. Di Francesco, F. Mosca, A. Carluccio
- 11 Management riproduttivo delle fattrici asinine destinate all'inseminazione strumentale
B.A. Giangaspero, I. De Amicis, R. Bucci, B. Saporito, A. Carluccio
- 15 Valutazione morfo funzionale dello stallone asinino e preparazione delle dosi inseminanti
R. Bucci, I. De Amicis, B.A. Giangaspero, B. Saporito, A. Carluccio
- 22 Effetti del sorting sul materiale seminale dell'asino di Martina Franca
A. Gloria, A. Contri, A. Carluccio
- 26 Il parto dell'asina e le prime ore di vita del puledro
B.A. Giangaspero, R. Bucci, D. Robbe, B. Saporito, A. Carluccio
- 32 Valutazione morfologica dei puledri asinini di razza Martina Franca, catalano per Martina Franca, puledri 3/4 Martina Franca
B. Saporito, D. Robbe, R. Bucci, B.A. Giangaspero, A. Carluccio
- 40 Studio sulla biodiversità genetica nella razza Martina Franca in comparazione con le altre razze asinine a rischio di estinzione con simile fenotipo:
Italiane (*Ragusana e Pantescia*) e Spagnole (*Catalano*) *A. Mazzatenta, C. Mariani, M. Caputo, F. De Sanctis, J. Mirò Roig, A. Carluccio*
- 49 **Linee guida per la gestione dell'allevamento asinino**
- 51 Management riproduttivo delle fattrici asinine
B.A. Giangaspero, A. Carluccio
- 53 Igiene della riproduzione dello stallone
R. Bucci, A. Carluccio
- 55 Cenni sulla gestione del parto e prime cure del neonato
B.A. Giangaspero, A. Carluccio
- 57 Gestione degli aborti
R. Bucci, A. Carluccio
- 61 Cenni di alimentazione
B. Saporito, A. Carluccio



REGIONE PUGLIA

Dipartimento Agricoltura,
Sviluppo Rurale e Tutela dell'Ambiente.
Sezione Gestione Sostenibile,
Tutela delle Risorse Naturali e Forestali.
Servizio Valorizzazione e Tutela
delle Risorse Naturali e Biodiversità



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO**



Salvaguardia dell'Asino Martina Franca,
razza in via d'estinzione, attraverso nuove tecniche di riproduzione assistita
ed alcuni aspetti sanitari delle malattie infettive legate alla sfera riproduttiva

Al presente progetto hanno collaborato:

Prof. Domenico **Robbe**, DVM
Prof. Alberto **Contri**, DVM
Prof. Jordi **Mirò Roig**, DVM
Prof. Fulvio **Marsilio**, DVM
Dott. Ippolito **De Amicis**, DVM
Dott.ssa Alessia **Gloria**, DVM
Prof. Andrea **Mazzatenta**, Biologo
Dott. Salvatore **Parrillo**, DVM
Dott. Federico **Noto**, DVM
Dott.ssa Flavia **Mariotti**, DVM
Dott.ssa Rita Giuseppina **Carluccio**, DVM
Dott. Michele Pio **Sfirro**, DVM
Dott. Maurizio **Caputo**, DVM
Dott.ssa Claudia **Mariani**, DVM
Dott.ssa Roberta **Bucci**, DVM
Dott.ssa Brunella Anna **Giangaspero**, DVM
Dott.ssa Beatrice **Saporito**, DVM
Dott.ssa Michela **D'Angelo**, Tecnico Veterinario

*Il presente progetto è stato finanziato con fondi della regione Puglia, protocollo:
A030 del 01/07/16 n. 54817*

*Tutte le foto presenti sono originali e non possono essere divulgate
senza il consenso esplicito della Regione Puglia e degli Autori.*

PREMESSA

Augusto **Carluccio**

L'Italia, secondo i più recenti dati FAO, è il Paese che presenta la maggior biodiversità animale e vegetale grazie alle sue peculiari caratteristiche climatiche ed ambientali.

La biodiversità, definita dalla Commissione Europea Agricoltura (DG AGRI, 1999) come "...la[...] variabilità della vita e dei suoi processi includente tutte le forme di vita, dalla singola cellula agli organismi più complessi, a tutti i processi, ai percorsi e ai cicli che collegano gli organismi viventi alle popolazioni, agli ecosistemi e ai paesaggi, è da considerarsi una vera e propria, se non unica, ricchezza reale (FAO, 2005).

Essa infatti è intesa come la misura della varietà di specie animali e vegetali ed è il risultato di processi evolutivi secolari influenzati dall'ambiente e dal contesto socio-economico.

Anche la variabilità genetica all'interno di una stessa specie è considerata indicativa di biodiversità. In particolare, l'Italia presenta un'ampia variabilità genetica per quanto riguarda molte specie animali di interesse zootecnico.

La specie asinina, ad esempio, può contare in Italia la presenza delle seguenti razze autoctone riconosciute o in via di riconoscimento: l'asino di Martina Franca, l'asino Ragusano, l'asino dell'Amiata, l'asino dell'Asinara, l'asino Sardo, l'asino Romagnolo, l'asino Viterbese e l'asino Grigio Siciliano.

Tuttavia nei Paesi Occidentali le tecniche di allevamento sono state progressivamente automatizzate e standardizzate, favorendo la selezione solo di poche razze ad elevata attitudine produttiva e, di conseguenza, provocando la drastica contrazione della numerosità di molte razze autoctone, meno "efficienti".

La biodiversità però è un "tesoro" di informazioni genetiche e morfologiche, indispensabile per l'evoluzione delle specie e la creazione di nuove popolazioni. Infatti è dalla variabilità genetica che scaturisce l'adattamento all'ambiente e quindi la selezione naturale di popolazioni autoctone.

La protezione della varietà genetica tipica del nostro Paese passa attraverso il recupero di popolazioni come queste, diffuse prevalentemente nel loro territorio di origine.

L'Asino di Martina Franca è originario della Puglia, in particolare della zona di confine tra le province di Bari, Brindisi e Taranto, dove è ubicata la cittadina da cui prende nome.

La storia di questa razza ha radici profonde ed è intrecciata a quella del suo territorio di origine. Infatti è già citata in testi risalenti al XVI secolo, tuttavia è solo durante il ventennio fascista che è ufficialmente riconosciuta come razza e ne è riconosciuta l'utilità per produrre muli da lavoro e da guerra.

Nel secondo dopo guerra però, la spinta alla meccanizzazione del lavoro nei campi, nei trasporti e nell'industria riduce l'utilità di questa razza e dei suoi incroci ibridi, condannandola quasi all'estinzione.

Attualmente infatti la consistenza di questa popolazione asinina raggiunge appena i 1286 capi. Sono solo 406 fattrici e 57 stalloni, i soggetti iscritti al Registro Anagrafico al giugno 2018.

Secondo le categorie di rischio della Global Databank for Farm Animal Genetic Resources (Extint: senza riproduttori; Critical: Femmine (F) < 100 oppure maschi (M) < 5; Endangered: 10000 < F >100 oppure < 20 M), in Italia sarebbero ben 53 le razze in via o a rischio di estinzione (11 bovine, 22 ovine, 9 caprine, 2 suine, 5 equine, 4 asinine) fra le quali anche la razza asinina di Martina Franca.

Si auspica che la politica nazionale ed europea, oltre alle misure già messe in atto, si assuma la responsabilità di adottare ulteriori provvedimenti per il recupero e la salvaguardia delle biodiversità animali e vegetali che sono da considerare un patrimonio dell'umanità.



Bibliografia

1. "Rapporto sullo stato delle risorse genetiche animali in Italia", (FAO, 2005http://www.fao.org/docrep/pdf/010/a1250e/annexes/CountryReports/Italy_I.pdf)
2. Romanov, Michael N (1995) Farm animal genetic resources. The global databank for farm animal genetic resources. Breeds currently in the global databank. Ukraine. Chicken. Domestic duck. Domestic goose. Turkey. In: Scherf, B D, ed. World Watch List for Domestic Animal Diversity. Information Division, FAO, UNEP, Rome, Italy, 550-551, 602. ISBN 92-5-103729-9.

INDAGINE PER LA RICERCA DI *TAYLORELLA EQUIGENITALIS* NELLE ASINE DI MARTINA FRANCA

Cristina Esmeralda **Di Francesco**, Francesco **Mosca**, Augusto **Carluccio**

Introduzione

La Metrite contagiosa equina (MCE) è una malattia venerea contagiosa degli equidi causata da *Taylorella equigenitalis*, un batterio cocco-bacillare Gram negativo, appartenente alla famiglia *Alcaligenaceae*. L'infezione, prevalentemente asintomatica nei maschi, nelle femmine provoca vaginite ed endometrite di gravità variabile, con conseguente scolo vaginale, infertilità e aborti precoci (Timoney, 2011). Dal momento della sua identificazione (Crowhurst, 1977), la MCE ha avuto diffusione in tutto il mondo con ripercussioni pesanti sulla riproduzione e l'allevamento degli equini, a causa dell'alta contagiosità del batterio e della sua capacità di persistere per lungo tempo, non solo nei maschi asintomatici, ma anche nelle femmine (Breuil et al., 2015; Sting et al., 2016; Hickset al., 2018).

Tra il 1997 e il 1998 un organismo simile a *T. equigenitalis* è stato identificato in asini e stalloni negli USA e, sulla base delle caratteristiche tassonomiche, è stato successivamente riconosciuto come una specie distinta, denominata *T. asinigenitalis* (Jang et al., 2001). Da allora *T. asinigenitalis* è stata identificata sia in cavalli che asini, in USA e in Europa, Italia compresa (Baverud et al., 2006; Franco et al., 2009). Tuttavia, il ruolo patologico di questa specie batterica resta controverso, dal momento che non è stata documentata alcuna sintomatologia clinica associata all'infezione, anche se la sua presenza nell'apparato genitale o nel seme degli animali può interferire con la diagnosi di laboratorio di MCE, riducendo la specificità dei protocolli diagnostici applicati per il controllo dell'infezione (Petry et al., 2018).

Infatti, non essendo disponibile un vaccino efficace, il controllo della MCE è basato sull'applicazione di rigorose misure igienico-sanitarie associate all'applicazione di specifici test di laboratorio a partire da tamponi uretrali, prepuziali e campioni di liquido seminale per l'identificazione degli animali portatori, per i quali sono previste restrizioni per il loro impiego nella riproduzione e le movimentazioni nazionali e internazionali (OIE, 2018).

Le prove diagnostiche riconosciute ufficialmente a livello internazionale per la diagnosi di MCE sono, oltre all'isolamento dell'agente su terreni di coltura selettivi, anche i test di Immunofluorescenza e Agglutinazione su vetrino, per l'identificazione dell'antigene batterico, o le metodiche di amplificazione del DNA batterico mediante PCR e real time PCR (OIE, 2018).

L'obiettivo dell'indagine è stato di verificare la presenza e la relativa diffusione dell'infezione da *T. equigenitalis* e/o *T. asinigenitalis* in un allevamento di asini di Martina Franca, mediante esame batteriologico e prove di PCR eseguite a partire da tamponi mucosali prelevati in corrispondenza della fossetta clitoridea nelle femmine e del prepuzio nei maschi.

Raccolta campioni

Nel periodo compreso tra Luglio e Settembre 2018, sono stati prelevati complessivamente n. 142 tamponi mucosali secondo il seguente schema:

- N. 69 campioni prelevati dalla fossetta clitoridea laterale destra di altrettante fattrici e n. 2 tamponi uretrali prelevati da n. 2 stalloni, impiegando tamponi sterili immersi in terreno di trasporto con carbone (CharcoalAmies) (Nuova Aptaca S.r.l., Cannelli, AT. Italia).
- N. 69 campioni prelevati dalla fossetta clitoridea laterale destra di altrettante fattrici e n. 2 tamponi uretrali prelevati da n. 2 stalloni, impiegando tamponi sterili immersi in soluzione fisiologica sterile (Nuova Aptaca S.r.l., Cannelli, AT. Italia)

I tamponi in terreno CharcoalAmies sono stati trasportati e conservati alla temperatura di +4° C, fino al loro utilizzo per l'esame colturale, mentre i restanti campioni sono stati mantenuti alla temperatura di -20° C per poi essere destinati alle prove biomolecolari.

Esami di laboratorio

Esame batteriologico

Per l'esame colturale piastre di C.E.M.O. Agar (Mast Group, Ltd, UK), addizionato con sangue di cavallo (5% v/v) lisato a 80 °C, e contenente Amfotericina (5 mg/ml) sono state seminate mediante strisciamento dei tamponi mucosali. L'incubazione delle piastre è stata condotta a 35 °C per 7 giorni in atmosfera contenente il 5% di CO₂ (OIE, 2018). Le colonie con le caratteristiche morfologiche riferibili a *Taylorella* spp., sono state sottoposte a colorazione di Gram, successivamente isolate in coltura pura e sottoposte a *screening* biomolecolare mediante PCR, secondo la metodica di seguito riportata.

Esame biomolecolare

Da tutti i tamponi in soluzione fisiologica sterile, e dalle colonie sospette ottenute dall'esame colturale, è stata eseguita l'estrazione del DNA totale impiegando il kit DNeasyTissue Kit (Qiagen, Italia), seguendo le istruzioni della Ditta produttrice. Da tutti gli estratti ottenuti sono stati eseguiti due protocolli di PCR in grado di amplificare un frammento di 417 bp, dell'unità 23S di RNA ribosomiale specie-specifico per *T. equigenitalis* e *T. asinigenitalis*, rispettivamente (Duquesne et al., 2007).

In particolare, per quanto riguarda il protocollo di amplificazione di *T. asinigenitalis*, sono stati utilizzati primers appositamente disegnati mediante il programma Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (Tasini1 TAG CGG AAT GCC TTA CAC ATG C; Tasini2 CGC TCG CAC CCT ACG TAT TA).



Fig. 1: Termo ciclatore per PCR.
(BiometraTAdvanced, Analitikjena, Germania)

Risultati

Esame batteriologico

In tutti i campioni è stata evidenziata una flora microbica mista con carica complessiva da media ad elevata. Tale risultato riflette la tipologia del campione, normalmente caratterizzato da flora polimicrobica, e la natura debolmente selettiva del terreno impiegato. La presenza di polimicrobismo rende difficoltoso il riscontro dei batteri oggetti di indagine. Tuttavia, sulla base delle caratteristiche morfologiche di colonie di *Taylorella*, così come riportate in letteratura, e sulla base dei sospetti emersi dall'indagine in biologia molecolare, sono state selezionate quattro differenti tipologie di colonie, costituite da batteri coccobacilli, Gram negativi e ossidasi positivi. Tali colonie sono state quindi sottoposte ad indagine molecolare, con esito negativo. Sulla base di quanto riscontrato, è possibile ritenere che l'esame batteriologico condotto non abbia mostrato evidenze significative della presenza del microorganismo in oggetto.

Esame biomolecolare

Da tutti gli estratti esaminati non è stato possibile ottenere un amplificato della dimensione attesa per entrambe le specie di *Taylorella*. Analogamente lo screening delle colonie sospette ha confermato la negatività degli isolamenti batteriologici e pertanto l'assenza del microorganismo in oggetto.

Bibliografia

1. Crowhurst, R.C., 1977. Genital infections in mares. *Vet. Rec.* 100, 476.
2. Jang, S.S., Donahue, J.M., Arata, A.B., Goris, J., Hansen, L.M., Earley, D.L., Vandamme, P.A.R., Timoney, P.J., Hirsh, D.C., 2001. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 971-976.
3. Timoney, P. J., 2011. *Journal of Animal Science* 89: 1552-1560.
4. Petry S., Breuil M.F., Duquesne F., Laugier C., 2018. *Vet. Rec.* 183(3):96.
5. Sting R., Seeh C., Mauder N., Maurer M., Loncaric I., Stessl B., Kopp P., Banzhaf K., Martin B., Melzer F., Raßbach A., Spersger J. 2016. *Res. Vet. Sci.* 109:101-106
6. Hicks J., Stuber T., Lantz K., Erdman M., Robbe-Austerman S., Huang X. 2018. *PLoS One.* 27;13(3):e0194253.
7. Breuil M.F., Duquesne F., Leperchois E., Laugier C., Ferry B., Collin G., Petry S. 2015. *Vet. Rec.* 177(13): 340.
8. Franco A., Donati V., Troiano P., Lorenzetti R., Zini M., Autorino G.L., Petrella A., Maggi A., Battisti A. 2009. *Vet. Rec.* 165(18):540-1.
9. Bäverud V., Nyström C., Johansson K.E. 2006. *Vet Microbiol.* 116(4):294-300
10. Duquesne F., Pronost S., Laugier C., Petry S. 2007. *Res. Vet. Sci.* 8: 47-49.
11. OIE, Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2018. Chapter 2.5.2: 1-7.

MANAGEMENT RIPRODUTTIVO DELLE FATTRICI ASININE DESTINATE ALL'INSEMINAZIONE STRUMENTALE

Brunella Anna **Giangaspero**, Ippolito **De Amicis**, Roberta **Bucci**,
Beatrice **Saporito**, Augusto **Carluccio**

Introduzione

Il management riproduttivo delle fattrici coinvolte in un programma di salvaguardia della razza, obiettivo di questo progetto, è di fondamentale importanza per la corretta riuscita dello stesso.

Le asine coinvolte in questo lavoro (*Foto 1*) sono state infatti sottoposte a costante monitoraggio della funzionalità riproduttiva durante la stagione di monta al fine di poter stabilire il momento più idoneo per l'inseminazione strumentale (IS).

Scopo dello studio è quello di dimostrare come una corretta gestione riproduttiva delle fattrici asinine sia in grado di ridurre il numero di interventi fecondativi necessari per l'instaurarsi di una gravidanza.

Anche le prime fasi della gravidanza devono essere attentamente monitorate.

La diagnosi di gravidanza precoce, 12°-14° giorno, permette di identificare e risolvere tempestivamente problematiche come, ad esempio, la presenza di gravidanze gemellari che potrebbero compromettere il proseguimento della gestazione.



Foto 1: Gruppo fattrici asinine sottoposte al programma di inseminazione strumentale.

Materiali e metodi

La metodica descritta di seguito è stata impiegata per tutte le fattrici coinvolte nel progetto in essere. Il presente studio riporta i dati relativi alla stagione di monta 2018 per le fattrici asinine stabulate presso il fondo rustico di Chiareto di Bellante dell'Università di Teramo.

Tale programma è stato effettuato attraverso un monitoraggio costante della fattrice con una frequenza media di visite ogni 48/72 ore a partire dalla fine della fase luteinica per i soggetti che avevano già presentato dei cicli estrali regolari. Nelle fattrici che avevano

partorito è stata posta particolare attenzione alla fase successiva al parto, caratterizzata dal cosiddetto “calore di parto”. Questo compare circa 7/10gg dopo la nascita del puledro e può o meno essere sfruttato per l’IS. Tale decisione dipende dal soggetto che deve aver presentato un normale puerperio ed un’idonea involuzione dell’utero. In ogni caso un’attenta valutazione di tale calore è stata utile per pianificare i successivi monitoraggi.

Le linee guida attuate sono state quelle del riconoscimento della fase del ciclo: estro/diestro.

La valutazione delle fattrici ha previsto un esame obiettivo generale e particolare dell’apparato genitale ed un esame ecografico trans-rettale, correlando le manifestazioni cliniche delle fattrici (estro/diestro) alla valutazione ecografica delle strutture ovariche (follicolo-corpo luteo).



Le manifestazioni estrali esterne della specie asinina sono caratterizzate da: vocalizzazioni, eversione ritmica delle labbra vulvari con esposizione del clitoride associato o meno a minzione, sollevamento in punta degli arti posteriori e contemporaneo abbassamento del bacino, posizionamento delle orecchie all’indietro e frequenti movimenti verticali della mandibola, (mouthclapping), accompagnati da imponente scialorrea e dall’estensione ed abbassamento del collo e della testa (*Foto 2*).

Foto 2: mouthclapping

La valutazione ecografica in fase estrale permette di apprezzare il corno uterino in sezione trasversale con una netta plicatura, definita a ruota di carro o a sezione di arancia.

La valutazione ecografica dell’ovaio permette di valutare la presenza di un follicolo dominante, che aumenta le proprie dimensioni durante la sua maturazione, e il corpo luteo del ciclo precedente.

L’accrescimento follicolare durante l’estro porta uno o più follicoli dominanti, che andranno incontro ad ovulazione, da una dimensione di circa 30 mm di diametro nel primo giorno del calore a 40-45 mm al momento dell’ovulazione. Nel momento in cui la fattrice ha presentato ecograficamente un follicolo di dimensioni > di 3cm, associato a manifestazioni estrali esterne conclamate, i monitoraggi sono stati intensificati, con un intervallo di 24h.

In base alla tipologia di materiale seminale utilizzato (fresco o congelato), il programma di monitoraggio è stato pianificato in maniera diversa.

In caso di materiale seminale fresco o refrigerato, il programma di monitoraggio è stato quello di seguire ogni 12-24 ore l’evoluzione del follicolo dominante. Queste linee guida hanno permesso l’inseminazione 12-24 h prima della deiscenza del follicolo.

L’utilizzo di materiale seminale congelato prevede un monitoraggio molto più costante e ravvicinato, in media ogni 3-6 h, in modo che l’IS sia effettuata quanto più vicino possibile al momento dell’ovulazione. Per la minore vitalità e sopravvivenza degli spermatozoi è stato anche necessario effettuare un’inseminazione strumentale profonda che prevede di depositare il materiale seminale nella porzione apicale del corno ipsilaterale al follicolo dominante.

Le fattrici asinine prese in esame sono state sottoposte ad un programma di inseminazione strumentale profonda con materiale seminale sessato che ha previsto, allo stesso modo, uno stretto programma di monitoraggio ecografico ad intervalli di 2-4 ore.

È stato stabilito poi un protocollo di induzione così da ridurre il numero di inseminazioni necessarie, il quale ha previsto la somministrazione di Gonadotropina Corionica Umana (hCG).

La diagnosi di gravidanza è stata effettuata precocemente attraverso l'esame ultrasonografico, con una completa scansione dell'utero e delle ovaie. Durante la prima fase della gravidanza la scansione ovarica è fondamentale sia per la valutazione delle caratteristiche del corpo luteo primario che per determinare l'eventuale presenza di corpi lutei multipli. L'attento esame ecografico dell'utero ha permesso l'individuazione precoce di una doppia vescicola embrionale diagnosticando una gravidanza gemellare. Durante la visita ecografica è stato fondamentale stabilire un approccio sistematico così da poter correlare i dati delle strutture presenti (cisti endometriali) in utero alla visita ecografica, con quelli precedentemente raccolti durante il monitoraggio estrale mappando così la loro morfologia, posizione ed eventuali modificazioni, distinguendo in tal modo una vescicola embrionale da una cisti uterina. Nonostante la visualizzazione della vescicola embrionale sia possibile anche prima, il programma del presente lavoro ha previsto la diagnosi precoce di gravidanza al 14° giorno post-ovulazione, poiché la visualizzazione è più agevole e permette di evitare i falsi positivi con una probabilità di individuare la vescicola del 98%-100%. In tale fase è stata valutata la dimensione della vescicola embrionale, mentre intorno al 25°/28° giorno post-ovulazione, è stata confermata la gravidanza con la visualizzazione della camera gestazionale, il bottone embrionale con la presenza del battito cardiaco.

Risultati

Nell'asina l'effetto della stagionalità sull'attività riproduttiva sembra essere meno rilevante rispetto alla cavalla (Contri et al. 2014), che convenzionalmente è definita come una specie poliestratale stagionale con cicli estrali della durata media di 20-23 giorni che si ripetono dalla primavera all'autunno. Durante il periodo invernale la cavalla va incontro ad un periodo di anestro caratterizzato dall'assenza di una significativa attività ovarica e dalla presenza di concentrazioni ematiche di ormoni sessuali a livelli basali. A differenza della cavalla, nell'asina è stata riscontrata la presenza di cicli estrali, seppure con durata diversa, durante tutto l'arco dell'anno. Pertanto l'asina, a queste latitudini e longitudini, può essere considerata una specie poliestratale continua.

Il programma svolto in questo studio ha dimostrato come sia fondamentale rilevare le manifestazioni estrali esterne ed interne al fine di fare diagnosi di "calore". In alcuni casi, fattrici giovani o con redo non hanno mostrato il calore così come fattrici subordinate possono essere inibite nel manifestare il comportamento estrale in presenza di fattrici dominanti.

La valutazione ecografica dell'estro ha permesso di determinare l'accrescimento follicolare medio giornaliero e la correlazione tra il grado di plicatura della sezione uterina e l'ovulazione. Inoltre il giorno prima dell'ovulazione la tensione della parete del follicolo diminuisce (follicolo fluttuante). In questo studio la fecondità, cioè la capacità dell'animale di riprodursi, è stata circa del 80% raggiunta con una media di due inseminazioni strumentali per ottenere una gravidanza. Le ovulazioni doppie sono risultate essere il 28% delle ovulazioni monitorate su tutti i soggetti durante la stagione riproduttiva, superando la percentuale descritta nel purosangue inglese, la razza equina nella quale è stata segnalata la maggiore prevalenza di questo fenomeno. Anche le gravidanze gemellari sono risultate in numero elevato, raggiungendo una prevalenza del 20,6 %.

È stato utile l'impiego di hCG per indurre l'ovulazione soprattutto in caso di utilizzo di materiale seminale refrigerato, sessato o congelato. L'utilizzo di tale presidio ha permesso di

ottenere l'ovulazione dopo 36- 48 ore dal trattamento.

La diagnosi di gravidanza precoce effettuata a 14 giorni post-ovulazione, ha evidenziato una struttura sferica di dimensione media di 14,9 mm, mentre il battito cardiaco nella diagnosi di conferma è risultato visibile nel 68% dei casi a partire dal 25° giorno di gestazione. Alla conferma di gravidanza al 28°gg posto ovulazione la presenza del battito cardiaco è risultata apprezzabile nel 100% delle vescicole embrionali (*Foto 3*).



Foto 3a: Diagnosi di gravidanza a 14°gg post-ovulazione.

Foto 3b: Gravidanza a 28 giorni post-ovulazione

Conclusioni

Questo studio dimostra come un corretto programma di inseminazione strumentale permette di raggiungere il successo riproduttivo.

La correlazione tra l'inseminazione e l'ovulazione è fondamentale ai fini prognostici soprattutto nel caso di inseminazione strumentale profonda con materiale seminale sessato o congelato.

Inoltre la diagnosi di gravidanza precoce ha permesso di identificare e risolvere le gravidanze gemellari.

Un management riproduttivo razionale delle fattrici asinine in razza permette un miglioramento delle performance di fertilità.

Bibliografia

1. Veronesi, M., Castagnetti, C., & Taverne, M. (2013). Neonatologia veterinaria. EdiSES.
2. Milonis, E., & Polidori, P. (2011). Latte di asina. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche- Brescia, 82, 130-137.
3. Carluccio A., Robbe D, Veronesi M.C, Verni F, Amendola S, De Amicis I, Contri A (2009). Il parto dell'asina e le prime ore di vita del puledro: osservazioni. In: Atti del VII Congresso Nazionale della Società Italiana di Riproduzione Animale, Messina, 2-3 luglio 2009
4. Carluccio, A., Gloria, A., Robbe, D., Veronesi, M. C., De Amicis, I., Cairoli, F., & Contri, A. (2017). Reproductive characteristics of foalheat in female donkeys. *animal*, 11(3), 461-465.
5. Carluccio, A., Panzani, S., Tosi, U., Riccaboni, P., Contri, A., & Veronesi, M. C. (2008). Morphological features of the placenta at term in the Martina Franca donkey. *Theriogenology*, 69(8), 918-924
6. Carluccio, A., Villani, M., Contri, A., Tosi, U., & Veronesi, M. C. (2005). Rilievi ecografici della gravidanza precoce nell'asina di Martina Franca. *Ippologia*, 16(4), 31-35.
7. Contri, A., Robbe, D., Gloria, A., De Amicis, I., Veronesi, M. C., Carluccio, A. (2014). Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. *Theriogenology*, 81(5), 657-661.

VALUTAZIONE MORFO FUNZIONALE DELLO STALLONE ASININO E PREPARAZIONE DELLE DOSI INSEMINANTI

Roberta **Bucci**, Ippolito **De Amicis**, Brunella **Giangaspero**,
Beatrice **Saporito**, Augusto **Carluccio**

Introduzione

L'asino di Martina Franca, per la scarsa numerosità della popolazione, è considerato una razza a rischio di estinzione.

Il progetto di ricerca sviluppato dalla Regione Puglia in collaborazione con il Servizio di Riproduzione Grandi Animali dell'Ospedale Veterinario Universitario Didattico (OVUD) dell'Università degli Studi di Teramo ha come obiettivo la salvaguardia della razza, custodendo la biodiversità nel patrimonio zootecnico.

In quest'ottica è importante la selezione accurata dei riproduttori ed, in particolare, la scelta di stalloni sani e di comprovata fertilità.

Materiali e metodi

Animali

Presso il Fondo Rustico dell'Università di Teramo, sito in Chiareto di Bellante (Te) è stato utilizzato, per la stagione di monta 2018, lo stallone Benny, di proprietà dell'Ufficio Incremento Ippico di Foggia. Esso è di razza Martina Franca ed approvato dall'Associazione Nazionale Allevatori del Cavallo delle Murge e dell'Asino di Martina Franca (ANAMF).

Allo stallone sono state destinate 12 fattrici stabulate presso la stessa struttura dal marzo 2017.

Valutazione morfo funzionale dello stallone asinino

All'inizio della stagione di monta, lo stallone è stato sottoposto a visita clinica per la funzione riproduttiva.

Come ogni anno, sono stati ripetuti, con esito negativo, gli esami di laboratorio per le più comuni malattie infettive della sfera genitale e non: Anemia Infettiva, Arterite Virale, Encefalite Virale, Morbo Coitale Maligno, Morva, Metrite Equina Contagiosa, Rinopolmonite Infettiva di cui alla legge 30/1991 e successive modifiche.

L'Esame Obiettivo Generale (EOG) è risultato nella norma. Particolare attenzione è stata rivolta ad eventuali anomalie e/o lesioni che potrebbero compromettere l'abilità alla monta (piaghe estive, patologie del treno posteriore ecc.).

Per l'esecuzione dell'ispezione e palpazione degli organi genitali esterni, lo stallone è stato esposto ad una fattrice in calore, in modo tale da rendere possibile l'esame. Sempre in sede di Esame Obiettivo Particolare (EOP), è stata recuperata la frazione pre-eiaculatoria per gli esami di laboratorio routinari ed effettuato un tampone uretrale.

L'ispezione e la palpazione dell'apparato genitale sono state effettuate dopo il "salto", quando l'animale era più docile ed incline alle manipolazioni sanitarie.

L'esposizione alla fattrice ha permesso di valutare anche il comportamento sessuale dello stallone ed i tempi di reazione: sono infatti stati registrati il tempo di reazione minimo che intercorreva fra l'avvicinamento all'asina, una parziale erezione della verga e l'accenno alla prima impennata. L'accurata valutazione degli organi interni (ghiandole annesse all'apparato genitale) è stata effettuata tramite esame ecografico per via rettale, con l'animale adeguatamente contenuto nel travaglio.

Raccolta del materiale seminale

La raccolta del seme è stata effettuata in un'area opportunamente dedicata (*foto 3a*) da personale esperto, autorizzato ed in possesso di adeguati dispositivi di protezione individuale (DPI).

Le raccolte sono state eseguite sempre in presenza di una fattrice in calore ed adeguatamente preparata per la raccolta del materiale seminale (*foto 1*). Essa è infatti contenuta con balze ostetriche agli arti posteriori, per evitare traumatismi allo stallone, e protetta con una coperta in cuoio applicata su collo e garrese, per ripararla da lesioni accidentali e morsi tipici del comportamento sessuale dello stallone asinino. La coda della fattrice è avvolta con una fascia da riposo e la zona perineale opportunamente detersa.



Foto 1: Asina preparata per la raccolta del seme



Foto 2: Vagina artificiale



Foto 3- Fasi della raccolta del materiale seminale: a) avvicinamento alla fattrice; b) raccolta del materiale seminale; c) disimpegno dello stallone.

La raccolta del materiale seminale è stata effettuata mediante l'utilizzo di una Vagina Artificiale (VA) modello Missouri preparata "lege artis" (foto 2).

Lo stallone, controllato tramite il chifney è condotto dal groomer verso la fattrice. (foto 3).

Valutazione del materiale seminale

Tutti i campioni raccolti prodotti durante la stagione sono stati sottoposti ad analisi macroscopica ed analisi microscopica a fresco.

L'analisi macroscopica dell'eiaculato permette la valutazione del colore, dell'odore, della consistenza e del volume.

Il volume dell'eiaculato nella sua totalità è stabilito utilizzando la scala graduata sul biberon di raccolta. Dopo filtrazione con garze sterili in una provetta graduata sterile è possibile calcolare il volume dell'eiaculato privo della frazione gel.

L'analisi microscopica a fresco ha fornito indicazioni sulla concentrazione, sulla motilità e sul pH del campione.

Per l'osservazione al microscopio, munito di tavolino riscaldato per una valutazione attendibile, è stato allestito un vetrino con una goccia di seme tal quale.

Una conta spermatica più accurata è effettuata mediante camera conta globuli di Burker (Camera di Burker, Merck, Belgio) (Foto 8) sul materiale filtrato, mentre il pH è stato determinato con l'uso di un pH metro (PH210, Hanna Instr. Ltd. Uk).

Per ogni campione raccolto, un'aliquota è stata destinata ad approfondite indagini di laboratorio. Queste hanno previsto l'utilizzo di un analizzatore di tipo CASA IVOS 12.3 (Hamilton-Thorne Bioscience, Beverly, MA, USA) (Foto 7) per ottenere parametri riguardanti la motilità totale, progressiva, la velocità e un'ulteriore stima della concentrazione oggettiva (Contri et al. 2010). L'integrità di membrana degli spermatozoi è stata invece valutata mediante colorazione fluorescente con sonde SSBYB-14 e PI come descritto da Contri et al.(2010).



Foto 7: analizzatore CASA

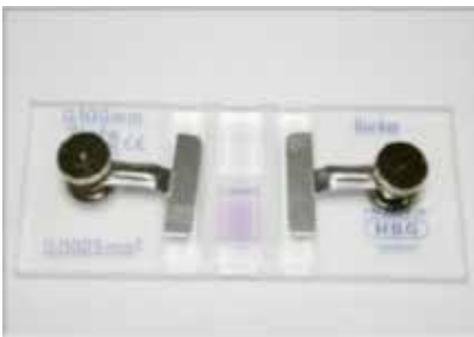


Foto 8: camera di Burker

Preparazione dose inseminante

Le fattrici asinine coinvolte nel presente progetto sono state sottoposte ad inseminazione strumentale (I.S.) con seme fresco e/o refrigerato.

Il metodo dell'I.S. è stato preferito rispetto alla monta naturale in quanto presenta innumerevoli vantaggi. Infatti, da una sola raccolta di materiale seminale è possibile produrre più dosi e di conseguenza “coprire” più asine senza sfruttare in modo eccessivo uno stallone di elevato valore genetico.

Inoltre è possibile valutare la qualità del materiale seminale utilizzato con analisi macro- microscopiche e limitare la trasmissione di malattie veneree.

La dose inseminante prevede almeno una concentrazione di 500×10^6 spz/tot dotati di movimento progressivo rettilineo.

La preparazione di dosi di materiale seminale di buona qualità prevede l'utilizzo di un mestruo diluente (o medium), ricco in sostanze nutritive, isotonic, dotato di sistema tampone e di attività batteriostatica, caratteristiche ideali per mantenere stabile il seme e aumentarne la conservabilità. Sono state inoltre prodotte delle paillettes di materiale seminale criopreservato con l'obiettivo di mettere a punto una metodica mirata alla creazione di una banca del seme di stalloni M.F. Questa tecnica permette di preservare il materiale genetico di stalloni asinini di alto valore, ma anche di poter trasportare tale materiale, con contenitori appositi, in modo da favorire la diffusione di materiale seminale di buona qualità anche in territori molto lontani da luogo di origine dello stallone.

Materiale seminale fresco

L'I.S. con materiale seminale fresco consiste nella fecondazione dell'asina in calore con del materiale seminale “tal quale” dopo filtrazione o diluito in mestruo a base di latte parzialmente scremato.

Queste dosi sono prodotte subito dopo la raccolta del materiale seminale raccogliendo in una provetta sterile o in una siringa non spermicida un'aliquota dell'ejaculato filtrato in una quantità tale da avere una concentrazione totale di spermatozoi adeguata per l'I.S..

Tale dose deve necessariamente essere utilizzata il giorno stesso della produzione e non può essere conservata in quanto non sono presenti integratori per la vitalità del seme ed antibiotici.

Materiale seminale refrigerato

Dall'ejaculato raccolto, dopo valutazione della concentrazione del campione gel-free, è stata prelevata una quantità di seme tale da avere una concentrazione totale di spermatozoi non inferiore a 600×10^6 spz/tot.

A tale campione è stato successivamente aggiunto il mestruo diluente INRA96 (INRA-IMV Tech. Francia), fino ad ottenere un volume totale di 10-25 ml. L'obiettivo è stato quello di ottenere una dose con una concentrazione non inferiore a 20×10^6 spz/ml di diluente.

La dose preparata è stata raccolta in una provetta sterile od in una siringa non spermicida sterile. Nella creazione della dose è stata posta particolare attenzione a ridurre la quantità di aria presente nel raccogliatore utilizzato, poiché ha effetti deleteri per gli spermatozoi, riducendone la longevità.

Il campione è stato refrigerato gradualmente e portato alla temperatura di 4°C.

La dose così preparata può essere conservata anche per 2-3 giorni.

Materiale seminale criopreservato

Per procedere alla criopreservazione del materiale seminale, è necessario dividere in aliquote il materiale seminale raccolto, diluirlo con un medium (INRA-Freeze, IMV Tech, Francia) con caratteristiche specifiche per il congelamento e sottoporlo ad una prima centrifugazione.

L'extender utilizzato per il congelamento è dotato di sostanze nutritive, azione tampone ma soprattutto è ricco di sostanze ad azione crioprotettrice, fondamentali per mantenere l'integrità della cellula spermatica.

Il passaggio successivo prevede la risospensione del pellet di seme ottenuto, utilizzando lo stesso mestruo diluente con un rapporto tale da ottenere una concentrazione di $100-250 \times 10^6$ spz/ml, in accordo con Contri et al. (2013) secondo cui questa concentrazione permette di ottenere i migliori risultati sulla vitalità del seme allo scongelamento.

Il passaggio dalla temperatura di lavorazione a quella di stoccaggio deve essere graduale come descritto da Vidament et al., (2000) per lo stallone asinino, fino a raggiungere i -196°C.

I campioni, stoccati in azoto liquido, possono essere conservati per un tempo indefinito.

Per la preparazione della dose inseminante propriamente detta, è stato necessario scongelare 8 paillettes alla volta, per ottenere una dose da 4 ml. Ciò è stato ottenuto immergendo le paillettes in un bagno maria a 35°C per circa 60 secondi.

Il contenuto delle paillettes è quindi svuotato in una provetta sterile e pronto per l'I.A..

Inseminazione strumentale

Le operazioni di inseminazione strumentale con materiale fresco, refrigerato o congelato, possono essere eseguite soltanto in centri autorizzati e che si occupino in maniera elettiva di riproduzione equina, sotto la responsabilità di un Medico Veterinario.

A prescindere dal tipo di seme utilizzato, la fattrice deve essere accuratamente preparata per l'operazione in modo da limitare al minimo il passaggio di germi dall'esterno lungo il canale vaginale.

La fattrice è adeguatamente contenuta in un travaglio, la coda è fasciata con bende da riposo e spostata lateralmente per rendere direttamente accessibili i genitali esterni. Questi sono accuratamente detersi con soluzioni iodate saponose, risciacquati abbondantemente con acqua tiepida ed asciugati.

Poiché l'I.S. prevede che il materiale seminale sia depositato in utero, bisogna porre attenzione alla sterilità del materiale utilizzato.

Per l'I.S. con materiale fresco e refrigerato è possibile effettuare un'inseminazione superficiale, cioè depositare il seme nel corpo dell'utero.

L'I.S. con materiale congelato dev'essere invece profonda, in quanto il seme decongelato ha una vitalità minore rispetto al fresco ed è necessario depositarlo quanto più vicino possibile alla sede dell'ovulazione, per aumentare le probabilità che avvenga il concepimento.

L'operatore utilizza un guanto zootecnico sterile e monouso, lubrificato con gel non spermicida per procedere all'interno del canale vaginale. Il catetere sterile è quindi fatto passare attraverso la cervice ed arrivare in utero. A questo punto, il seme fresco/refrigerato può essere immesso. Se invece è utilizzato seme congelato, l'operatore, aiutandosi con l'esplorazione trans rettale, introduce il catetere, di tipo non traumatico, in profondità nell'utero e solo a questo punto può immettere il materiale seminale dopo aver raggiunto l'apice del corno.



Foto 9. Materiale necessario per IS

Risultati

Foto 9. Materiale necessario per IS

Durante la stagione di monta 2018, lo stallone Benny è stato sottoposto a raccolta del materiale seminale per 18 volte.

L'eiaculato è stato utilizzato sia per effettuare prove di congelamento che per la produzione di dosi inseminanti.

Sono state infatti prodotte 270 paillettes di materiale seminale congelato e 20 dosi di materiale seminale fresco e refrigerato, utilizzate per l'IS.

I campioni analizzati sono sempre risultati uniformi tra loro ed in linea con i parametri descritti per gli animali sani (Carluccio 2013), infatti sono stati raccolti campioni di colore bianco- grigiastro, mediamente viscosi e privi di flocculi, senza tracce di sangue o urine.

Il volume medio ottenuto è stato di circa 80- 100 ml per l'eiaculato tal quale, e di 70-90 ml gel free, in accordo con la bibliografia.

La concentrazione spermatica media rilevata sui campioni raccolti durante la stagione riproduttiva è stata di $200-250 \times 10^6$ spz/ml per eiaculato filtrato, mentre il pH è risultato essere di 7.2-7.7.

Il campione fresco, analizzato mediante l'uso del CASA ha sempre presentato una motilità totale non inferiore all'80%, mentre i motili progressivi (spermatozoi che mostrano un andamento rettilineo) erano circa il 70% del campione.

La colorazione con sonde fluorescenti ha rilevato che gli spermatozoi con membrana integra rappresentavano circa l'80% del campione mentre le cellule anomale in media sono risultati il 3%. Questi parametri, sovrapponibili alla bibliografia prodotta sull'asino di Martina Franca, hanno confermato la fertilità dello stallone utilizzato per il presente progetto di ricerca.

Bibliografia

1. Kenney, R. M., J. P. Hurtgen, and R. Pierson. "Manual for Clinical Fertility Evaluation of the Stallion. Hastings, NE." *Proc Soc Theriogenology* (1983).
2. Vidament, M., Ecot, P., Noue, P., Bourgeois, C., Magistrini, M., & Palmer, E. (2000). Centrifugation and addition of glycerol at 22 C instead of 4 C improve post-thaw motility and fertility of stallion spermatozoa. *Theriogenology*, 54(6), 907-919.
3. Contri, A., Valorz, C., Faustini, M., Wegher, L., & Carluccio, A. (2010). Effect of semen preparation on casa motility results in cryopreserved bull spermatozoa. *Theriogenology*, 74(3), 424-435.
4. Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Sfirro, M. P., & Carluccio, A. (2012). Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *Animalreproduction science*, 136(1-2), 74-80.
5. Carluccio, A., Panzani, S., Contri, A., Bronzo, V., Robbe, D., & Veronesi, M. C. (2013). Influence of season on testicular morphometry and semen characteristics in Martina Franca jackasses. *Theriogenology*, 79(3), 502- 507.
6. LEGGE 15 gennaio 1991, n. 30 (GU Serie Generale n.24 del 29-01-1991)

EFFETTI DEL SORTING SUL MATERIALE SEMINALE DELL'ASINO DI MARTINA FRANCA

Alessia Gloria, Alberto Contri, Augusto Carluccio

Introduzione

Uno degli obiettivi del progetto di ricerca è stato quello di creare una banca del seme di stalloni di Martina Franca. Parallelamente a questo sono state condotte delle prove al fine di individuare le metodiche ed i medium migliori in grado di preservare le caratteristiche degli spermatozoi durante il trasporto e durante il sortaggio del seme.

Per raggiungere questi obiettivi è stato raccolto il materiale seminale da stalloni asinini Martinesi, presenti presso il Fondo Rustico di Chiareto dell'Università di Teramo, che è stato sottoposto ad attenta valutazione in laboratorio sia dal punto di vista macroscopico che microscopico mediante un accurato spermiogramma.

Valutazione del materiale seminale fresco

Il materiale seminale fresco, appena raccolto, ha avuto un volume totale medio di 106 ± 17.7 ml ed un volume gel free medio di 95 ± 20.1 ml. La concentrazione dei campioni, valutata tramite camera di Burker, è stata in media di 247 ± 59.5 cellule per ml mentre il pH ha mostrato un range di valori tra 7.2 e 7.7. I campioni appena raccolti sono stati sottoposti anche a valutazione della motilità tramite analizzatore computerizzato CASA. La motilità totale ha avuto un valore medio di 92.25 ± 2.09 % mentre la media della percentuale di cellule progressive è stata di 51.3 ± 11.8 %.

La valutazione della vitalità è stata effettuata attraverso la valutazione dell'integrità della membrana nemaspermatica, mediante colorazione fluorescente, impiegando ioduro di propidio e SYBR-14. Dopo colorazione, i campioni sono stati valutati mediante microscopio a fluorescenza andando a valutare 200 cellule per campione. Sui campioni appena raccolti l'integrità di membrana è stata dello 89 ± 3.1 %. Anche la funzionalità della membrana valutata con l'hypoosmotic swelling test (HOS) ha mostrato risultati simili, 88.5 ± 2.9 % cellule reattive allo stimolo osmotico. Tutte le analisi sono state condotte su un totale di 200 cellule. La valutazione della morfologia è stata effettuata mediante analizzatore computerizzato della morfologia (ASMA), in questo caso i campioni hanno mostrato percentuali di cellule anomale sempre al di sotto del 10 %, con alterazioni per lo più di natura secondaria.

Valutazione del materiale seminale criopreservato

Prima di sottoporre i campioni al processo di crioconservazione è stata eseguita una centrifugazione degli stessi; successivamente sono stati diluiti con medium INRA freeze (INRA-IMV Tech. Francia) e refrigerati ed equilibrati alla temperatura

di 4°C. A questo proposito sono state saggiate diverse concentrazioni cellulari per effettuare la crioconservazione, al fine di avere i migliori risultati al momento dello scongelamento. La concentrazione migliore è stata quella di 250 milioni di cellule per ml. I campioni sono stati valutati al termine dell'equilibratura mostrando una motilità totale media di 89.25 ± 3.7 % ed una motilità progressiva del 69.75 ± 6.9 %. La vitalità dei campioni valutati in questa fase è stata del 85 ± 4.3 %. Per la crioconservazione sono state impiegate paillettes da 0.5 ml. Al momento dello scongelamento, dopo diverse prove, sono stati raggiunti buoni risultati arrivando ad avere una percentuale di cellule motili totale del 57 % ed una percentuale di cellule motili progressive del 40%. In media i risultati sono stati del 41.75 ± 11.2 % per la motilità totale e 26.93 ± 9.3 per la motilità progressiva. La vitalità valutata al momento dello scongelamento è stata in media del 39 ± 3.1 % di cellule integre, raggiungendo percentuali più alte, 52 %, in linea con percentuali di motilità più alta. Sui campioni scongelati sono state eseguite anche le valutazioni della percentuale di spermatozoi capacitati effettuata mediante clortetraciclina e la determinazione della percentuale di spermatozoi con acrosoma integro eseguita con colorazione FITC-PSA (Foto 1). In entrambi i casi i campioni sono stati analizzati mediante microscopio a fluorescenza su un campione di 200 cellule. I dati, con una media di 3 ± 1.9 % di cellule positive, hanno mostrato che il processo di crioconservazione non induce la capacitazione delle cellule, processo che avviene fisiologicamente nell'apparato riproduttore femminile. Mentre, come già dimostrato per altre specie, la crioconservazione può determinare una reazione acrosomiale crio-indotta. In questo caso la percentuale di cellule positive è stata in media del 23 ± 4.1 %.

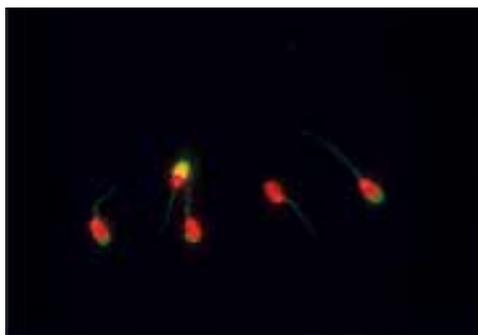


Foto 1: colorazione FITC-PSA

Valutazione del materiale seminale sessato

Relativamente al processo di sessaggio sono state condotte numerose prove.

Mentre nella specie bovina la tecnica del sessaggio del materiale seminale è stata studiata e messa a punto ormai da diversi anni, per cui l'impiego di seme sessato è entrato nella routine della fecondazione artificiale, nella riproduzione equina sono stati mossi i primi passi, per cui sono pochissimi gli studi in proposito. Nella specie asinina non esistono ancora studi che riportino dei processi di sorting effettuati con successo.

Attualmente il seme sessato è prodotto utilizzando la citofluorimetria a flusso, dopo fluorocromatizzazione degli spermatozoi e loro *sortin gin* base alla quantità di DNA posseduto (Balduzzi, 2007). Differentemente da quanto avviene nel bovino, in cui il

plasma seminale è molto scarso, nella specie equina ed ancor di più nella specie asinina una volta determinata la concentrazione del campione è stata necessaria una fase di centrifugazione, fase non prevista nella procedura effettuata per il bovino. Inoltre per effettuare il sorting il campione deve essere diluito a basse concentrazioni, intorno a decine di milioni di cellule per ml. Una volta diluito il campione è stato quindi incubato con una sonda fluorescente Hoechst 33342. In questo caso sono state necessarie diverse prove sia per determinare la concentrazione ottimale di colorante sia il tempo migliore di incubazione. Una volta colorato il campione è stato fatto passare attraverso il citofluorimetro a flusso a 60 psi. Questo passaggio all'interno della macchina determina una maggiore fragilità della cellula una volta che è stata separata e raccolta. Per effettuare le prove di sorting i campioni una volta raccolti sono stati prontamente trasferiti in laboratorio e processati come detto precedentemente. Inoltre sono stati testati vari medium per effettuare il processo di sorting valutando quello che desse i risultati migliori. Una volta centrifugato il campione è stato diluito con INRA per effettuare la colorazione, ma durante il passaggio all'interno della macchina il campione è stato diluito con soluzione phosphate buffer solution al 20% risultando il medium con migliori risultati al momento della raccolta.

Dopo il processo di sorting la media della motilità totale è stata dell' 83.16 ± 4.8 % mentre la motilità progressiva del 75.6 ± 3.32 %. Inoltre dopo il sorting i campioni sono stati sottoposti ad un processo di refrigerazione a 4°C per 16 h mostrando, dopo tale periodo, una motilità totale e progressiva rispettivamente del 45.5 ± 4.9 % e del 28 ± 1.4 %. Come per la specie bovina, un grande limite di questo processo è legato alla percentuale di cellule recuperate. La separazione delle popolazioni spermatiche ed il processo in se fa sì che la quantità di cellule recuperate sia notevolmente bassa per cui il numero di cellule presenti in una dose inseminante è notevolmente ridotto rispetto a quello mediamente contenuto in una dose di seme non sessato. Nel bovino si passa da circa 20 milioni di cellule per dose a circa due milioni nella dose sessata. Nelle prove effettuate, la percentuale di cellule recuperate è stata altrettanto bassa, recuperando in media circa 1 milione di cellule/ora di processazione.

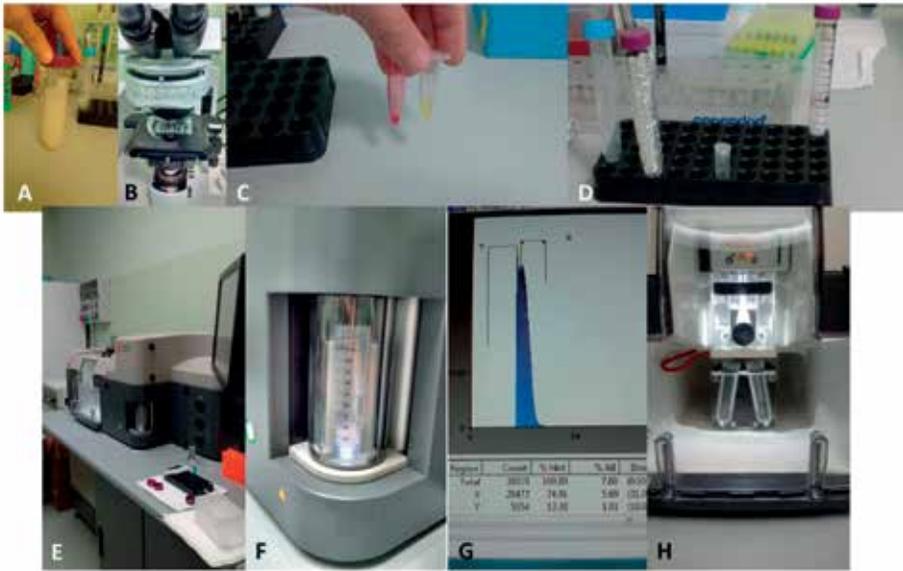
Dopo sorting il materiale seminale fresco è stato confezionato all'interno di paillettes medie per essere impiegato per l'inseminazione artificiale di alcune asine (n° 4) presenti presso il Fondo Rustico di Chiareto dell'Università di Teramo. In questo caso le diagnosi di gravidanza sono risultate negative.

Anche nel bovino l'impiego di materiale seminale sessato ha un tasso di fecondazione più basso. Inoltre saranno necessarie ulteriori prove ed una numerosità di animali maggiore per verificare l'efficacia di questo processo.

Un'ulteriore prova eseguita è stata quella di sottoporre i campioni dopo sorting al processo di crioconservazione. In questo caso i risultati non sono stati soddisfacenti in quanto al momento dello scongelamento la percentuale di cellule motili è stata in media del 4.16 ± 2.28 %. Il sessaggio del seme nella specie asinina si è dimostrata una procedura particolarmente invasiva che impatta negativamente sulla vitalità degli spermatozoi e sulla longevità, rispetto alla normale crioconservazione del seme. Per questo saranno necessari ulteriori studi finalizzati ad individuare i fattori che incidono negativamente sul processo di crioconservazione, definendo procedure atte a migliorare tale processo.

I risultati ottenuti sono stati comunque soddisfacenti in quanto i dati sul materiale fresco e refrigerato a breve termine nel post- sorting hanno mostrato delle ottime

percentuali sia di motilità totale che progressiva come riportato precedentemente.



Immagini dei passaggi di preparazione dei campioni per il sorting. (A) Campione dopo tre filtrazioni con garza sterile. (B) valutazione della concentrazione tramite camera di Burkner. (C) sonde fluorescenti: in rosso ioduro di propidio, in giallo Hoechst 33342. (D) incubazione del campione protetto dalla luce. (E) Cell Sorter, MofloAstrios (BeckmanCoulter). (F) campione pronto per il sorting. (G) citogramma delle due popolazioni da separare. (H) tubi di raccolta delle due popolazioni cellulari.

Bibliografia

1. Contri, A., Gloria, A., Robbe, D., Sfirro, M.P., Carluccio, A. Effect of sperm concentration on characteristics of frozen-thawed semen in donkeys. *AnimalReproduction Science* 2012; 136:74-80
2. Contri, A., De Amicis, Veronesi, M.C., Faustini, M., Robbe, D., Carluccio, A. Efficiency of different extenders on cooled semen collected during long and short day length seasons in Martina Franca donkey. *AnimalReproduction Science*, 2010; 120: 136-141.
3. Flores, E., Taberner, E., Rivera, M.M., Peña, A., Rigau, T., Miró, J., Rodríguez-Gil, J.E., 2008. Effects of freezing/thawing on motile sperm subpopulations of boar and donkey ejaculates. *Theriogenology* 70, 936-945.
4. Miró, J., Lobo, V., Quintero-Moreno, A., Medrano, A., Peña, A., Rigau, T., 2005. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology* 63, 1706-1716.
5. Oliveira, J.V., Alvarenga, M.A., Melo, C.M., Macedo, L.M., Dell'Aqua Jr., J.A., Papa, F.O., 2006. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezability and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 94, 82-84.
6. Santos, G.F., Henry, M., Sampaio, I.B.M., Gastal, E.L., 1995. Effect of cooling system and rate of cooling on sperm quality of donkey semen preserved at 5°C. *Biol. Reprod. Mono.* 1, 761-767.
7. Trimeche, A., Renard, P., Tainturier, D., 1998. A procedure for poitou jackass sperm cryopreservation. *Theriogenology* 50, 793-806.
8. Balao da Silva CM, Ortega-Ferrusola C, Morrell JM, RodriguezMartinez H, Peña FJ. Flow Cytometric Chromosomal Sex Sorting of Stallion Spermatozoa Induces Oxidative Stress on Mitochondria and Genomic DNA. *ReprodDomestAnim.* 2016 Feb;51(1):18-25.
9. Garner DL, Evans KM, Seidel GE. Sex-sorting sperm using flow cytometry/cell sorting. *MethodsMolBiol.* 2013;927:279-95. Review

IL PARTO DELL'ASINA E LE PRIME ORE DI VITA DEL PULEDRO

Brunella Anna **Giangaspero**, Roberta **Bucci**, Domenico **Robbe**, Beatrice **Saporito**,
Augusto **Carluccio**

Introduzione

La nascita di un puledro vivo e vitale rappresenta un evento di fondamentale importanza in particolar modo nei soggetti di elevato valore genetico o a rischio di estinzione. Il monitoraggio delle gravidanze e l'assistenza al parto permettono di salvaguardare la salute della fattrice e del puledro neonato, riducendo in maniera significativa la mortalità neonatale.

La conoscenza dei parametri fisiologici del parto nell'asina e la normale successione di eventi legati al puledro nelle prime ore di vita potrebbero permettere di riconoscere e correggere prontamente le alterazioni causa di rischio per la salute della fattrice e del puledro. Lo scopo di questo lavoro, parte integrante del progetto, è stato quello di monitorare costantemente le fattrici asinine a termine di gravidanza effettuando un'assistenza continua dai segni prodromici del parto fino al secondamento ed alla stabilizzazione delle condizioni cliniche del puledro.

Materiali e metodi

Sono stati assistiti 19 soggetti, di razza Martina Franca di età compresa fra 4 e 11 anni, con anamnesi riproduttiva nella norma.

Le fattrici durante tutta la durata della gravidanza sono state stabulate in paddock nel gruppo appositamente formato e sono state monitorate costantemente attraverso un Esame Obiettivo Generale (EOG) e, periodicamente, con un Esame Obiettivo Particolare (EOP) dell'apparato riproduttore attraverso un esame ecografico per via trans-rettale prima e successivamente trans- addominale per la valutazione del battito cardiaco.

Condizione fondamentale della fattrice a termine è l'assoluta tranquillità, per cui l'assistenza è stata effettuata attraverso monitor (*foto 1*) ed intervenendo solo in condizioni di insorgenza di complicazioni.

Foto 1: sistema di video sorveglianza dell'asina gravida a termine



Venti giorni prima della presunta data del parto, calcolata a partire dalla data di ovulazione, considerando una durata standard di 373 ± 5 giorni, le asine sono state trasferite in un box parto appositamente preparato allo scopo e dotato di un sistema di videosorveglianza a circuito chiuso. Dopo l'isolamento in box, le fattrici sono state sottoposte ad uno stretto monitoraggio giornaliero al fine di poter identificare i principali segni che caratterizzano la fase di preparazione al parto. Una volta apprezzati i segni prodromici di un parto imminente, le fattrici sono state monitorate h24 dall'inizio della fase di espulsione fino al secondamento. I parametri raccolti sono stati suddivisi in eventi riguardanti il parto e riferiti all'intervallo di tempo tra la valutazione dei segni prodromici (lassità legamentosa, edema dei genitali esterni e viraggio del secreto mammario) ed il parto stesso, la sua durata complessiva riferita all'intervallo di tempo compreso fra la rottura del corion allantoide ed il secondamento. Sono state appuntate poi le necessità di intervento da parte del personale addetto all'assistenza del parto e le distocie. Inoltre sono stati valutati parametri riguardanti la fattrice come il tempo di assunzione della stazione quadrupedale ed il tempo di secondamento. Il puledro è stato valutato attraverso il sistema Appearance Pulse Grimace Activity Respiration (APGAR).

Sono stati, altresì, studiati i parametri riguardanti il suo comportamento: l'intervallo di tempo tra la fine della fase di espulsione primo tentativo di assunzione della stazione quadrupedale; prima poppata; espulsione del meconio; peso del puledro alla nascita (Bru)

Risultati

Il box parto, dotato di un sistema di videosorveglianza a circuito chiuso, ha permesso di monitorare a distanza il parto delle 19 fattrici asinine senza interferire con il suo normale svolgimento, se non in caso di necessità e nel momento più idoneo. I valori medi dei parametri considerati sono riportati nella tabella 1.

Valutazione segni prodromici	32 ore
Durata parto	46 minuti
Necessità di intervento	43%
Distocie	8%

APGAR	9.1
Primo tentativo di alzata	16 minuti
Prima poppata	47 minuti
Espulsione di meconio	52 minuti
Peso medio alla nascita	36 kg

Stazione quadrupedale fattrice	11 minuti
Tempo di secondamento	52 minuti

Tabella 1. Dati delle fasi del parto, della fattrice e dei parametri neonatali

In prima istanza è stato necessario identificare i segni clinici di parto imminente che permettono di identificare le fattrici prossime al parto, in modo tale da intensificare la videosorveglianza.

Tali segni sono rappresentati dall'aumento di volume della mammella, l'abbassamento ventrale dell'addome ed il progressivo rilascio dei legamenti sacroischiatici, l'edema e l'allungamento della rima vulvare. Inoltre durante gli ultimi giorni di gestazione è stato possibile notare un'accentuazione delle fosse del fianco, lo scioglimento del tappo mucoso cervicale la presenza di gocce di colostro sui capezzoli (imperlatura) ed una conformazione più allungata del capezzolo stesso (*Foto 1*). Nelle ultime 24-36 ore prima del parto nella maggior parte dei casi, il secreto mammario vira divenendo meno denso e più biancastro. Esistono differenti test di tipo quantitativo che permettono di avere una previsione delle ore che separano la fattrice al parto, basati sulle concentrazioni elettrolitiche presenti nel secreto mammario. Negli Equidi il test utilizzato con maggior frequenza ed attendibilità è il Foal Watch (CHEMetrics, Inc.) il quale, attraverso il dosaggio del calcio contenuti nel secreto mammario, è in grado di stimare se il parto è imminente o se si presenterà nelle prossime 12, 24 o 48 ore. Il test è stato applicato in modo sperimentale su tutte fattrici di specie asinina con risultati sovrapponibili a quelli della cavalla (*Foto 2*).



Foto 2: mammella imperlata nelle ultime ore che precedono il parto. Lettura della scala volumetrica di un esame del Foal Watch (CHEMetrics, Inc.).

Il primo stadio del parto (fase dilatante) ha una durata variabile di 1-4 ore ed è caratterizzato dall'innescarsi di contrazioni uterine (doglie), associate ad un'importante dilatazione cervicale e alla rotazione del feto da una posizione ventrale ad una posizione dorsale. Clinicamente in questa fase le fattrici hanno presentato: dolori colici, sudorazione, aumento della frequenza cardiaca, osservazione del fianco, minzione e defecazione, irrequietezza, nervosismo, movimenti in circolo all'interno del box. Caratterizza il termine della fase dilatante la rottura del corion allantoide e la fuoriuscita del liquido allantoideo, ovvero la cosiddetta rottura delle acque. A tale condizione segue la fase espulsiva dominata da contrazioni di origine uterina associate a contrazioni molto più imponenti dell'addome, (premiti). Questa fase, molto rapida negli equidi, ha una durata complessiva inferiore ai 30 minuti; nella maggior parte dei casi la fattrice ha compiuto tale fase posizionandosi in decubito latero-laterale ed effettuando il parto da terra, mentre in rari casi l'espletamento è avvenuto in stazione quadrupedale.

In tutti i parti monitorati, entro 5 minuti dalla rottura delle acque è avvenuto il passaggio della testa e degli arti attraverso il canale del parto e la fuoriuscita dalla rima vulvare; per poterlo definire normale, all'inizio della fase espulsiva gli arti devono presentarsi in atteggiamento di estensione con uno dei due sopravanzato rispetto all'altro, così da determinare una leggera rotazione delle spalle riducendo il diametro del cinto scapolare al passaggio nel canale (Foto 3).

In questo studio, risultante dal progetto, nel 43% dei casi il personale addetto è dovuto intervenire durante l'espulsione. Le cause che hanno determinato l'intervento sono state: la necessità di lacerare il sacco amniotico integro così da poter liberare le prime vie aeree dalla membrana e permettere una normale respirazione; la trazione del feto per una macrosomia relativa.



Foto 3: Fattrice asinina in decubito latero-laterale durante la fase di espulsione del parto.

Nell'8% dei casi, condizioni di distocia hanno reso necessario l'intervento del Medico Veterinario che, diagnosticando preventivamente la condizione patologica, è stato in grado intervenire garantendo la nascita e la sopravvivenza del puledro e soprattutto la salute della fattrice.

Un'asina ha abortito, presentando segni clinici di malessere generale associati alla fuoriuscita dalla rima vulvare del cosiddetto "redball" (Foto 4). L'esame ostetrico interno in sede di distocia ha permesso di diagnosticare un dilatazione cervicale e la malposizione del nascituro, successivamente è stata risolta la distocia ed estratto il feto.



Foto 4: Fattrice asinina: distacco placentare. L'allanto-corion (redball) fuoriesce dalla rima vulvare.

Subito dopo l'espulsione, il puledro neonato ha assunto, in tutti i parti monitorati, la posizione sternale. La prima valutazione clinica effettuata sul puledro neonato è stata l'APGAR, in grado di valutare la vitalità del neonato e l'eventuale necessità di intervento basandosi sulla valutazione di: mucose, frequenza cardiaca e respiratoria, tono muscolare, risposta allo stimolo nasale con l'assegnazione di un punteggio che ha presentato una media di 9.1.

Tutti i puledri hanno presentato un buon riflesso di suzione ed entro mezz'ora hanno tentato di assumere la stazione quadrupedale. La prima assunzione di colostro è avvenuta entro un'ora dal parto (*Foto 5*).



Foto 5: prime fasi di vita del puledro asinino

Il cordone ombelicale si è lacerato nel momento in cui la fattrice, riprendendo le sue forze, assume la stazione quadrupedale oppure durante i primi tentativi di alzata del puledro. La rottura del cordone avviene in un punto di minor resistenza già preformato, a 5 cm circa dall'ombelico cutaneo. Il moncone è stato disinfettato con una soluzione antisettica tintura di iodio al 2% o clorexidina allo 0,5%. È fondamentale effettuare tale operazione poiché l'eventuale risalita di germi patogeni può essere causa di onfalovasculiti e malattie neonatali.

Nell'ambito del progetto una delle asine ha portato a termine una gravidanza gemellare con la nascita di uno dei puledri vivo e vitale. Tuttavia è stato necessario intervenire manualmente per disseccare il cordone nel punto preformato.

Alla nascita sono state valutate le grandi funzioni organiche del puledro tra cui l'espulsione del meconio. Nei puledri presi in esame l'espulsione si è verificata con una media di 52 minuti dopo la nascita.

È stato necessario valutare e monitorare costantemente lo stato di salute della fattrice, fino al secondamento, cioè l'espulsione della placenta. In tutte le asine il secondamento è avvenuto entro un'ora dal parto. Sono stati poi valutati l'integrità e l'aspetto della

placenta, al fine di escludere eventuali micro-ritenzioni. Due fattrici hanno ritenuto la placenta e sono state trattate con somministrazione di ossitocina fino all'avvenuta espulsione (Foto 6).



Foto 6: superficie corion allantoidea ed endometriale della placenta. Fattrice durante il secondamento.

Conclusioni

Il monitoraggio continuo del parto, anche con l'ausilio di dispositivi di videosorveglianza, ha permesso di ottenere informazioni a riguardo non presenti in bibliografia. Infatti sono state definite in modo oggettivo la durata delle fasi del parto ed alcuni eventi delle prime ore di vita del neonato; inoltre, nei casi in cui erano necessari interventi ostetrici, è stato possibile intervenire precocemente e risolvere eventuali distocie.

In caso di distocia fetale o materna l'intervento del medico veterinario durante l'espulsione è stato necessario a ridurne la durata e con essa la probabilità di asfissia del puledro. Nonostante quasi tutte le razze asinine autoctone italiane siano considerate a rischio di estinzione, si continua a sottovalutare l'importanza del monitoraggio del parto e la necessità di intervento ogni qualvolta si instaurano condizioni patologiche.

In conclusione, lo studio in questo progetto ha portato a nuove conoscenze dell'ostetricia volte a migliorare la gestione della fattrice e del puledro asinino.

Bibliografia

1. Veronesi, M., Castagnetti, C., & Taverne, M. (2013). Neonatologia veterinaria. Edises.
2. Milonis, E., & Polidori, P. (2011). Latte di asina. Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche-Brescia, 82, 130-137.
3. Carluccio A., Robbe D, Veronesi M.C, Verni F, Amendola S, De Amicis I, Contri A (2009). Il parto dell'asina e le prime ore di vita del puledro: osservazioni. In: Atti del VII Congresso Nazionale della Società Italiana di Riproduzione Animale, Messina, 2-3 luglio 2009
4. Carluccio, A., Gloria, A., Robbe, D., Veronesi, M. C., De Amicis, I., Cairoli, F., & Contri, A. (2017). Reproductive characteristics of foalheat in female donkeys. *animal*, 11(3), 461- 465.
5. Carluccio, A., Panzani, S., Tosi, U., Riccaboni, P., Contri, A., & Veronesi, M. C. (2008). Morphological features of the placenta at term in the Martina Franca donkey. *Theriogenology*, 69(8), 918-924
6. Carluccio, A., Villani, M., Contri, A., Tosi, U., & Veronesi, M. C. (2005). Rilievi ecografici della gravidanza precoce nell'asina di Martina Franca. *Ippologia*, 16(4), 31-35.
7. Contri, A., Robbe, D., Gloria, A., De Amicis, I., Veronesi, M. C., & Carluccio, A. (2014). Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. *Theriogenology*, 81(5), 657-661.

VALUTAZIONE MORFOLOGICA DEI PULEDRI ASININI DI RAZZA MARTINA FRANCA, CATALANO PER MARTINA FRANCA, PULEDRI 3/4 MARTINA FRANCA

Beatrice **Saporito**, Domenico **Robbe**, Roberta **Bucci**,
Brunella Anna **Giangaspero**, Augusto **Carluccio**

Introduzione

L'Asino di Martina Franca (MF) è una razza a rischio di estinzione con un'elevata percentuale di consanguineità tra gli esemplari iscritti al Registro Anagrafico (RA).

Uno degli obiettivi del progetto è stato quello di ridurre la consanguineità attraverso l'introduzione di una razza asinina spagnola: l'asino Catalano (C).

Sono stati quindi presi in considerazione, nel presente studio, gli accrescimenti dei puledri di prima generazione (F1-C x MF) e quelli dei puledri di seconda (F2-F1 x MF), ottenuti reintroducendo l'asino martinese, per valutare se l'impiego dell'asino Catalano, che la storia riporta essere la razza da cui è derivato l'asino martinese, sia comunque in grado di produrre puledri con uno sviluppo morfo-funzionale sovrapponibile allo standard di razza del Martina Franca.

In bibliografia sono riportati solo studi che riguardano i puledri equini, in cui sono indicati i fattori in grado di influenzare il loro sviluppo. Fra questi, sono ricordati il mese di nascita e il sesso (Saastamoinen, 1990; Fradinho et al., 2012).

Materiali e Metodi

In questo studio, risultante dal progetto in essere, sono stati esaminati tutti i soggetti prodotti nel corso degli anni di collaborazione tra la facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università di Teramo e la Regione Puglia, Ufficio di Incremento Ippico di Foggia.

I parametri biometrici considerati sono stati: l'altezza al garrese e l'altezza alla groppa (*foto 1 e 2*), misurate dalla sommità della regione stessa fino a terra con l'animale piazzato; l'ampiezza e la lunghezza del tronco (*foto 3 e 4*), misurate con un nastro zootecnico dietro il margine posteriore della spalla; la circonferenza dello stinco (*foto 5*), misurate con un nastro misuratore per circonferenze SECA® valutato all'altezza del terzo medio; il peso (*foto 6*), determinato con una bilancia con sponde.

I rilievi sono stati effettuati alla nascita, al 30°, 60°, 90°, 120°, 150°, 180° e 365° giorno di vita e i dati sono stati analizzati tenendo in considerazione il sesso ed il grado di purezza.

Gli accrescimenti dei puledri di prima generazione (50% MF) e di seconda (75% MF) sono stati confrontati quelli dei soggetti di pura razza (100% MF).



Foto 1-2-3-4-5-6: immagini delle rispettive misurazioni: altezza al garrese, altezza della groppa, circonferenza del torace, lunghezza del tronco, circonferenza dello stinco e peso.

Risultati

Relativamente all'altezza al garrese ed alla groppa, la generazione F1 ha presentato valori pressoché sovrapponibili ai soggetti di razza pura, mentre la generazione F2 ha presentato, già alla nascita, un'altezza maggiore. Anche al 12° mese, la generazione F2 risulta significativamente più alta del MF puro.

Tabella 1 e 2: medie delle altezze al garrese delle femmine (1) e dei maschi (2) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2.

femmine	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	87,5	96	103,1	109,7	112,9	117,2	119	131,8
F1	87	96,25	102,16	109,66	113,66	118	120,83	120,83
F2	92,2	98,6	107	112	115,75	118,75	121	134,1

maschi	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	85,3	91,2	97,8	105,9	110,1	114,3	117,8	129,4
F1	84,16	90,667	97,83	106,5	110,5	114,83	118,16	129,66
F2	93,33	97,66	102	110,66	114,66	118,66	122	130,3

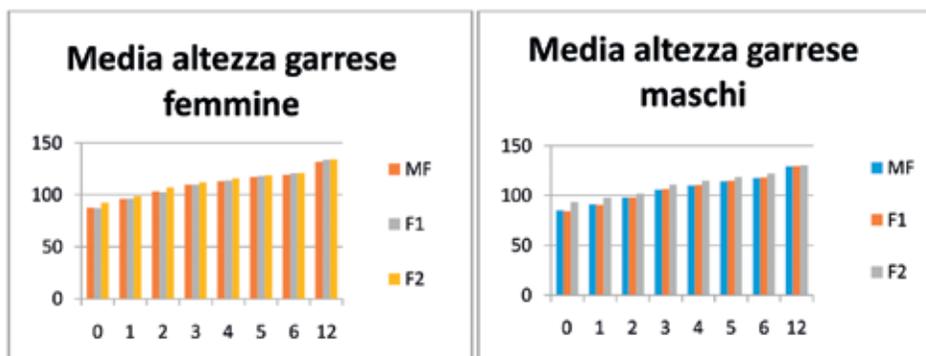
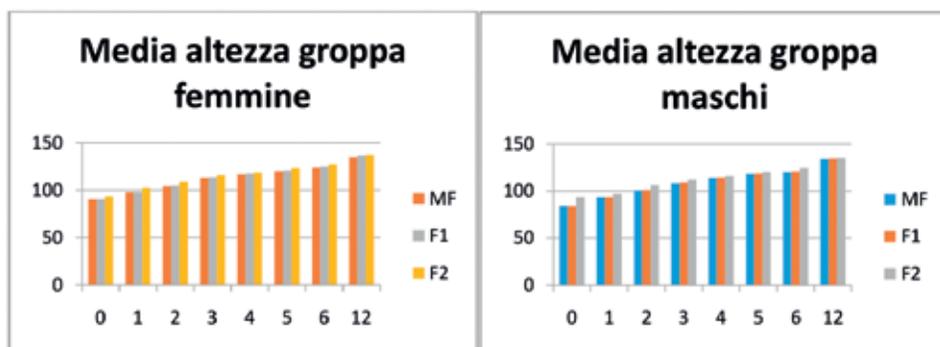


Grafico 1 e 2: medie delle altezze al garrese delle femmine (1) e dei maschi (2) per i puledri di Martinese Franca, per la F1 e la F2

Tabella 3 e 4: medie delle altezze alla groppa delle femmine (3) e dei maschi (4) per i puledri di Martinese Franca, per la F1 e la F2.

femmine	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	90,5	97,9	104,6	113	116,9	119,9	124,2	134,9
F1	90,5	98,33	105	113,5	117,67	120,83	125,16	136,66
F2	93,4	102,6	108,6	116	118,6	123,5	127	137,1

maschi	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	84,6	93,4	100,7	108,2	114	118,3	120,3	134,3
F1	84,33	93,33	101,17	108,83	114,33	118,67	120,83	134,67
F2	93,33	97	106,33	112	116	120,33	124,67	135,2



Grafici 3 e 4: medie delle altezze alla groppa delle femmine (3) e dei maschi (4) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2.

Le curve di crescita riguardanti la lunghezza del tronco sono sovrapponibili per le femmine MF e F1. I maschi F1 invece alla nascita sono più lunghi, ma i parametri tornano in linea con lo standard di razza al 12° mese.

I valori biometrici, alla nascita, riguardanti la lunghezza del tronco nei puledri F2 sono sovrapponibili a quelli MF, si mantengono in linea al 12° mese. La differenza dei valori tra le popolazioni MF ed F2 è solo di un centimetro, quindi assimilabile allo standard di razza.

Tabelle 5 e 6: medie delle lunghezze del tronco delle femmine (5) e dei maschi (6) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2.

femmine	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	67	76,1	86,8	89,3	101,9	105,1	110,5	122,3
F1	67,33	76,66	87,16	89,66	102,16	105,66	111	123,833
F2	65,4	75,6	88,2	95,6	100,5	105,5	114,5	124,2

maschi	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	63,5	74	83,3	89,4	96	103,7	107,3	123,1
F1	67,33	76,67	87,16	89,66	102,17	105,67	111	123,83
F2	63,33	72,33	86	96	101,67	106	110	124,1

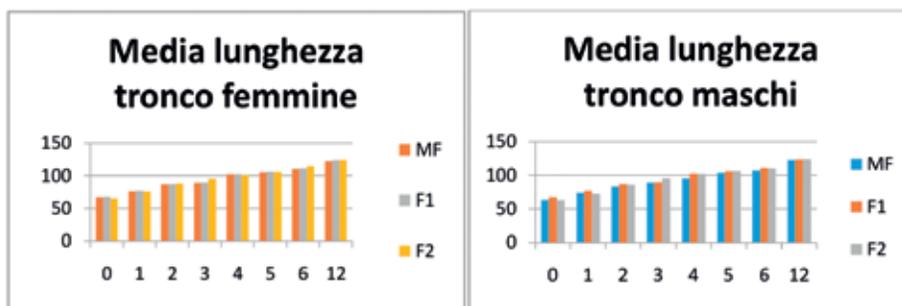


Grafico 5 e 6: medie delle lunghezze del tronco delle femmine (5) e dei maschi (6) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2.

I rilevati riguardanti la circonferenza toracica hanno mostrato nette differenze fra F2, MF ed F1. Infatti, se i puledri MF ed F1, mostrano alla nascita, un diametro di circa 67 cm per poi raggiungere, all'anno di vita, diametri di 127-128 cm.

Le femmine di F2 misurano, alla nascita, 71 cm al torace e i maschi 74 cm mostrando in entrambi i sessi una crescita significativa fino al 5° mese di età.

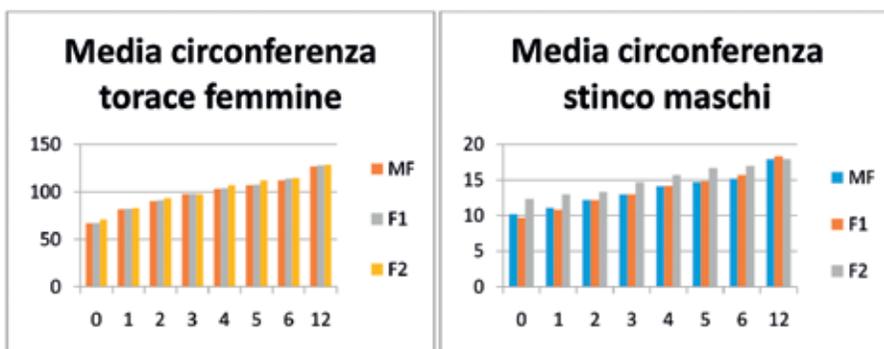
Al compimento del 12° mese, in entrambi i sessi, il diametro della circonferenza del torace raggiunge i 128 cm, diametro sovrapponibile a quello del MF.

Analizzando i dati di questo parametro, è possibile affermare che i soggetti F2 risultano più precoci nel primo anno di vita.

Tabelle 7 e 8: medie delle circonferenze del torace delle femmine (7) e dei maschi (8) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2

femmine	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	66,8	81,5	90	97,6	102,8	106,9	112	126,9
F1	67	82	90,83	98	103,5	107,33	113,83	128
F2	71	82,8	93,2	97,6	106,75	112	114,75	128,8

maschi	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	68	76,8	85,7	91,4	99,7	105,7	110,5	127,9
F1	67,66	76,5	85,5	91,5	100	106,16	110,833	128,33
F2	74,33	83,67	91,33	98,66	104	110	114,66	128,9



Grafici 7 e 8: medie delle circonferenze del torace delle femmine (7) e dei maschi (8) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2

In MF ed F1, nel primo anno di vita, le misurazioni della circonferenza dello stinco sono risultate sovrapponibili per entrambe le popolazioni. Anche se le misurazioni dei maschi F1, alla nascita ed al primo mese di vita, hanno restituito valori inferiori.

La popolazione F2, invece, alla nascita mostra già un diametro della circonferenza dello stinco di circa 12 cm, valore raggiunto solo dopo un mese di vita sia dai MF e F1. Tuttavia la curva di accrescimento degli F2 è minore, infatti al 12° mese le misurazioni del diametro dello stinco tornano sovrapponibili con le altre popolazioni, attestandosi sui 18 cm, con lieve dimorfismo sessuale.

Tabelle 9 e 10: medie delle circonferenze dello stinco delle femmine (9) e dei maschi (10) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2.

femmine	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	10,8	11,4	13,3	14,1	15,2	15,9	16,3	17,5
F1	10,6	11,67	13,5	14,33	15,5	16,16	16,83	18
F2	11,8	13	14,2	15,4	16,25	16,75	17,25	17,75

maschi	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	10,2	11,1	12,2	13	14,1	14,7	15,2	17,9
F1	9,67	10,83	12,17	13	14,167	14,83	15,67	18,33
F2	12,33	13	13,33	14,67	15,67	16,67	17	17,9

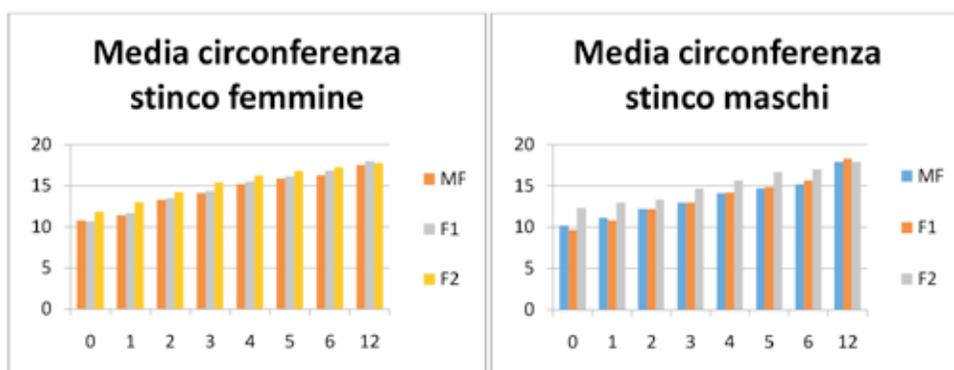


Grafico 9 e 10: medie delle circonferenze dello stinco delle femmine (9) e dei maschi (10) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2

La valutazione dell'accrescimento ponderale delle tre popolazioni è pressoché sovrapponibile alla nascita. I valori risultano leggermente superiori per i maschi F2. Al 3° e 4° mese invece, gli F2, soprattutto nei maschi, risultano più pesanti di almeno 5-7 chili rispetto alle altre popolazioni.

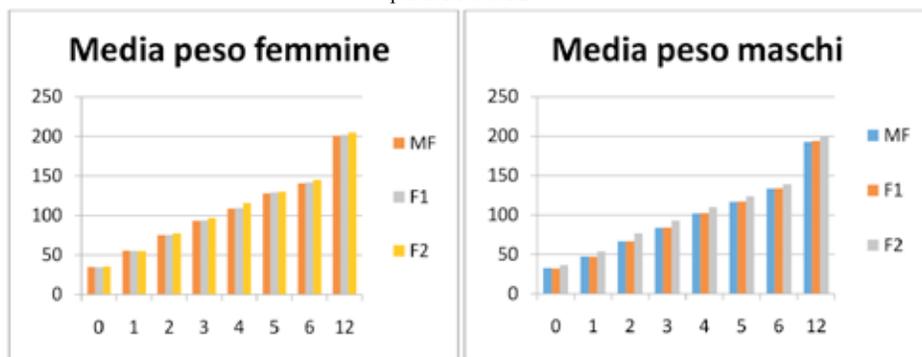
Al 12° mese invece, tra le femmine MF ed F2 è presente una differenza solo di 4 kg. Tale differenza aumenta a 9 kg per i maschi, pur non risultando tali differenze statisticamente significative. Complessivamente, le femmine nascono più leggere ma, rispetto ai maschi, hanno una curva di accrescimento maggiore e infatti a 12 mesi, le tre popolazioni femminili, pesano circa 200 kg, mentre i maschi raggiungono i 199kg a 12 mesi solo nella popolazione F2.

Tabelle 11 e 12: medie dei pesi delle femmine (11) e dei maschi (12) per i puledri di Martina Franca, per la F1 e la F2.

femmine	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	34,4	55	75,1	93,1	108,2	128	140,5	200,9
F1	34,05	54,5	75,33	93,66	108,88	128,91	141,41	202
F2	35	54,2	77,4	96,8	115,5	129,5	144,75	204,3

maschi	nascita	1° mese	2° mese	3° mese	4° mese	5° mese	6° mese	12° mese
MF	32,2	47,4	66,5	83,4	102	116,4	133	192,8
F1	31,5	47	66,33	83,67	102,33	116,83	133,5	193,83
F2	36	53,33	76,67	92,67	109,67	123,67	138,67	199,5

Grafico 11 e 12: medie dei pesi delle femmine (11) e dei maschi (12) per i puledri di razza pura martinese, per la F1 e la F2.



Discussione e Conclusioni

Il presente progetto ha valutato i principali parametri zoognostici durante i primi 12 mesi di vita di puledri Martina Franca, F1 e F2.

Benché sussistano lievi differenze tra le curve di accrescimento valutate in base ad ogni singolo parametro, per ogni dato considerato le misurazioni di F2 e MF a 12 mesi non mostrano differenze statisticamente significative.

Tale riscontro è incoraggiante in quanto permette di poter affermare, seppur con dati preliminari che meriterebbero di essere approfonditi ed ampliati, che il programma di inserimento dell'asino Catalano è effettivamente utile all'obiettivo di preservare la razza pugliese dalle problematiche conseguenti all'aumento della consanguineità nella popolazione.

Sarebbe auspicabile l'istituzione di un registro anagrafico aperto che consenta l'iscrizione dei soggetti derivati catalani, con il fine di riportare e di valutare i parametri biometrici fino al 30° mese di vita per poter successivamente considerare i figli di queste popolazioni come facente parte del RA dell'asino MF.

Bibliografia

1. Fradinho M.J., Correia M. J., Beja F., Rosa A. (2012). Effects of foaling season on growth and development of Lusitano suckling foalings raised on extensive grazing systems. Forages and grazing in horse nutrition, vol. 132; pp 315-318.
2. Host A. (2002). Frequency of cow's milk allergy in childhood. Ann Allergy Asthma Immunol; 89:33-7.
3. Saastamoinen M. (1990). Factors affecting growth and development of foals and young horses. Acta Agriculturae Scandinavica. 40:4; 387-396.

STUDIO SULLA BIODIVERSITÀ GENETICA NELLA RAZZA MARTINA FRANCA IN COMPARAZIONE CON LE ALTRE RAZZE ASININE A RISCHIO DI ESTINZIONE CON SIMILE FENOTIPO: ITALIANE (RAGUSANA E PANTESCA) E SPAGNOLE (CATALANO)

Andrea **Mazzatenta**¹, Claudia **Mariani**¹, Maurizio Caputo¹,
Francesco **De Sanctis**², Jordi Mirò **Roig**³, Augusto **Carluccio**¹

¹Facoltà di Medicina Veterinaria e Ospedale Veterinario Universitario Didattico (O.V.U.D.), Università degli Studi di Teramo

²Sezione di Immunologia, Dipartimento di Medicina, Università di Verona

³Universitat Autònoma de Barcelona

Introduzione

La gestione della diversità genetica nelle popolazioni animali è fattore di fondamentale importanza in qualsiasi programma di conservazione della specie, il cui fine ultimo è sempre salvaguardare le più ampie risorse genetiche (Bjørnstad&Ried, 2002; Toro et al, 2003). Nella conservazione delle razze domestiche la tutela della risorsa genetica è cruciale perché sono categorie zootecniche e non zoologiche. La biodiversità della forma domestica è frutto di un pool genetico derivato dall'interazione con ambienti semi-artificiali, regolato dal fabbisogno umano e dai suoi spostamenti migratori. Di conseguenza i cambiamenti genetici e fenotipici rispetto alla specie selvatica di origine sono stati indirizzati lentamente dalle necessità umane. Nell'asino esistono numerose varianti rispondenti, probabilmente, al clima della zona di origine, viceversa non esistono grandi variazioni sul tipo di lavoro che l'animale ha svolto per l'uomo cioè il trasporto di pesi. Alcune razze asinine mostrano, di contro, un fenotipo simile nonostante le popolazioni siano separate geograficamente, la domanda che ci dobbiamo porre è se la similitudine fenotipica è dovuta ad una forma di coevoluzione oppure a scambio del patrimonio genetico in tempi passati.

La quantificazione genetica della popolazione di una razza con le relative distanze genetiche sono utili per determinare la struttura della popolazione stessa e il carattere distintivo genetico di una razza. In particolare, il DNA mitocondriale (mtDNA) è lo strumento d'indagine fondamentale nella genetica evolutiva e di popolazione. La regione del D-Loop del mtDNA è il biomarcatore negli studi filogenetici e genetici per il suo tasso di mutazione, la mancanza di ricombinazione e perché di esclusiva origine materna.

Nel presente studio sono state considerate le razze Martina Franca, Ragusano, Pantesco e Catalano fenotipicamente simili con incertezza sulla parentela ed origine. Infatti, storicamente è nota una prima colonizzazione di asino italico durante la dominazione dell'impero romano della penisola iberica dal 218 AC al 395, durata circa 613 anni. L'asino all'epoca era impiegato nel trasporto e nelle operazioni militari. I romani avevano un'arma chiamata Onagro, quindi erano già a conoscenza del ceppo asinino asiatico, ciò rileva la loro elevata cultura zoologica. Infatti, avevano del personale specializzato, gli Zoarchi dedicati alla ricerca, raccolta, studio, allevamento, cura e addestramento degli animali. Successivamente, nella storia l'Italia centro

meridionale è stata dominata dal regno spagnolo (1559-1707) per circa 148 anni. In questo periodo è stata ipotizzata l'introduzione in Italia dell'asino Catalano, di origine africana.

Tuttavia, queste notizie storiche non sono oggettive e non consentono di comprendere né l'origine di queste razze né la parentela e l'eventuale scambio genetico in un senso, nell'altro o reciproco lasciando così una indeterminazione negativa per lo sviluppo di corrette politiche di tutela, riproduzione e gestione delle razze.

L'approccio genetico impiegato in questo studio è utile sia per chiarire i rapporti filietici che, di conseguenza, stabilire i programmi di riproduzione. In particolare, l'identificazione dei polimorfismi (SNPs) e degli aplotipi del mtDNA è fondamentale negli studi genetici di animali domestici (Upholt&Dawid, 1977). Il genoma extracromosomico mitocondriale, al contrario di quello nucleare, è ereditato solo per via materna, è aploide, e i suoi geni non si ricombinano. Queste proprietà semplificano la comprensione dei meccanismi filietici. Il complesso pedigree cellulare fatto di molecole di DNA con deriva casuale, che agisce sulle mutazioni, la probabilità che la mutazione possa contribuire alla variazione all'interno della razza è semplificato della razza (Rand, 2001) per la natura clonale della sua ereditarietà. La variazione della regione del D-loop nel mtDNA combinata con la mancanza di ricombinazione produce uno strumento altamente informativo per studi di relazione matrilineare (linea di dighe) all'interno di una specie o di una razza (Vigilant et al., 1989; Brown et al, 1979; Wallace, 2007; Stoneking et al., 1992).

In questo studio è stato sequenziato il D-loop nel mtDNA per verificare l'origine e i rapporti filietici nonché l'assortimento matrilineale all'interno e fra le razze asinine con fenotipo simile Martina Franca (MF), Ragusano (RG), Pantesco (PT) e Catalano (CT).

Materiali e Metodi

123 campioni salivari sono stati prelevati dalle razze oggetto di studio, nel rispetto delle norme per la cura e protezione degli animali utilizzati a fini scientifici, Direttiva 2010/63/UE. I campioni raccolti sono provenienti solo da animali di allevamento libero con Certificato di Origine, utilizzato per selezionare la presumibile variabilità genetica, escludendo la stessa discendenza materna.

Martina Franca:

- Istituto incremento ippico Foggia
- Fondo rustico Chiareto Teramo
- Azienda agricola Russoli Crispiano/Regione Puglia

Ragusano:

- Istituto incremento ippico Santa Maria Capua Vetere
- Forestale distaccamento Ragusa
- Azienda agricola Orlando Prizzi/Palermo
- Azienda agricola Ciro Schirò Corleone/Monreale
- Azienda agricola Chiara lo Cicero Monti Nebrodi
- Asilat Giarre/Catania
- Asinalat Villafrati/Palermo

Pantesco:

- Azienda San Matteo Erice/Trapani

Catalano

- UAB Universitat Autònoma de Catalunya/Barcelona/Spain
- FuiivesBerga/Cataluna

(Tab. 1). 77 campioni, suddivisi in MF = 27, RG = 22, PT = 8, CT = 19 e un incrocio italiano, sono stati sequenziati con successo.

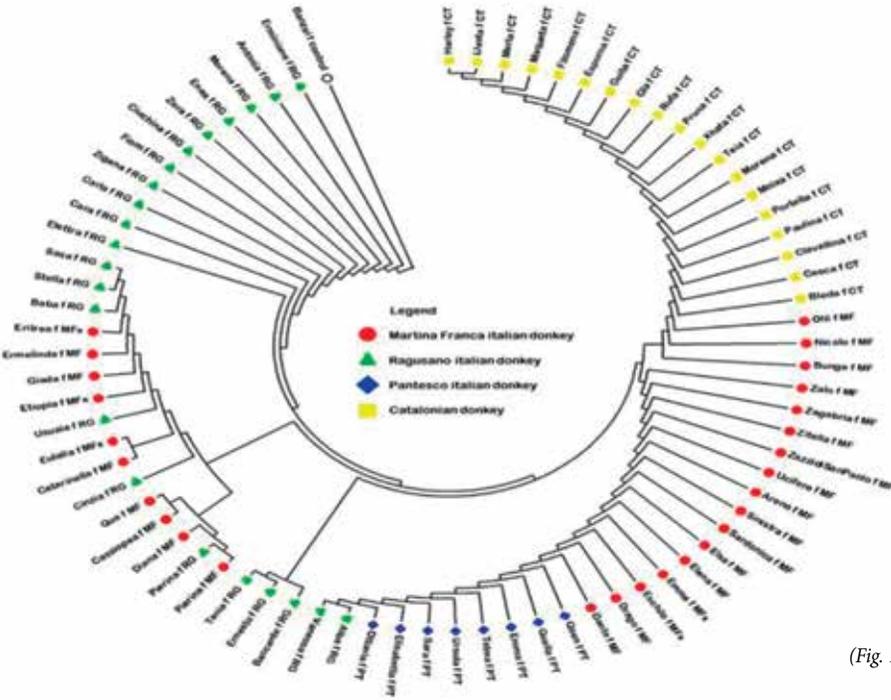
Il materiale genetico è stato prelevato dalla saliva usando un tampone orale sterile, trasferito e immortalato su minicard FTA e conservato nei Multi Barrier Pouches (Whatman Labware Products, UK). Il materiale di riferimento è disponibile presso l'O.V.U.D. (Ospedale Veterinario Universitario Didattico) Servizio di Riproduzione Grandi Animali della Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Teramo Italia.

Un frammento di 400 bp di DNA D-Loop, dopo l'estrazione dalle minicard FTA, è stato amplificato dalla Polymerase Chain Reaction (PCR) eseguita su 25 µl di volume di reazione contenente 50 ng di DNA, 2,5 mM di MgCl₂, 0,2 mM di ciascun dNTP, 0,5 µM di Per 5'-CCC AAG GAC TAT CAA GGA AG-3' e Rew 5'-TTG GAG GGA TTG CTG ATT TC-3' primer, 1 X PCR Buffer e 1 U di Taq DNA polimerasi (Fermentas, Thermo Fischer Scientific). Il ciclo di termoamplificazione è stato effettuato utilizzando il termociclatore Mastercycler (Eppendorf, USA) con le seguenti condizioni: denaturazione iniziale a 94 °C per 5 min seguita da 35 cicli di denaturazione a 94 °C per 30 secondi, riscaldamento a 58 °C per 30 secondi di estensione a 72 °C per 30 secondi e estensione finale a 72 °C per 5 minuti.

Le sequenze sono state allineate con Muscle e le analisi sono state eseguite utilizzando i software MEGA7 e DARwin (Tamura et al, 2004, Tamura et al, 2012; Kumar et al, 2015; Kumar et al, 2016).

Risultati

I 77 campioni sequenziati sono stati allineati con il metodo Maximum Parsimony è stata dedotta la storia evolutiva delle razze in questione.



(Fig. 1)

Fig.1. Maximum Parsimony analysis of breed evolutionary history. Tree #1 out of 10 most parsimonious trees (length = 45) is shown. The consistency index is 0.80, the retention index is 0.925, and the composite index is 0.863, 0.74 for all sites and parsimony-informative sites (MEGA7).

L'analisi della diversità genetica media all'interno delle razze è 0,013, nell'intera popolazione è 0,017, tra le popolazioni è 0,004 e il coefficiente di differenziazione è 0,236.

In Tabella 2 è mostrata l'analisi della distanza genetica all'interno delle razze studiate e tra queste con il metodo del Maximum Likelihood.

[1,1]/Nucleotide: maximum composite likelihood	distance	within groups		
	MF	0,02		
	RG	0,03		
	PT	0		
	CT	0		

maximum composite likelihood	distance	betweengroups		
		MF	PT	RG
	MF			
	PT	0,013		
	RG	0,026	0,015	
	CT	0,013	0	0,015

overall average is 0,017

Tab. 2. Distance (nucleotide frequencies are A = 31.92%, T = 29.56%, C = 27.93%, and G = 10.60%. For estimating ML values, a tree topology was automatically computed. The maximum Log likelihood for this computation was -398.3, MEGA7).

L'identificazione degli polimorfismi su singolo nucleotide (SNPs) è stata eseguita sul numero assoluto di mutazioni riscontrate in ogni singola sequenza, ogni SNPs è stato caratterizzato in base alla posizione verso la sequenza di riferimento, il tipo di mutazione e la frazione in cui compare (Fig.2).

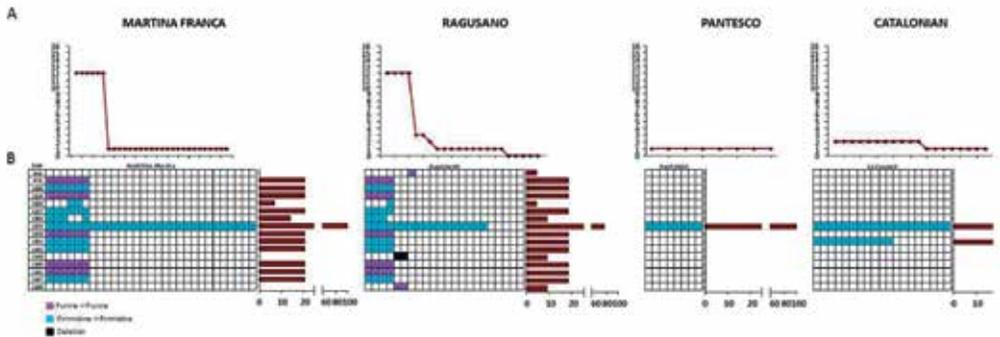


Fig.2 SNPs analysis performed on mitochondrial DNA isolated from listed donkey breeds. A) Absolute number of mutations found in each sample by Sanger sequencing. B) Every SNP has been characterized according to the position on the reference sequence, the kind of mutation, and the fraction of samples in which is reported (red histograms), (MEGA7).

In Tabella 3 la descrizione dei risultati sull'analisi del D-loop delle sequenze per razza e l'identificazione degli aplotipi per razza.

Breed (abbreviation)	n	NHap	SNPs	T	k ± SD			
					C	A	G	
Martina Franca (MF)	27	21	13	27.1 ± .32	29.5 ± .39	33.3 ± .35	10.1 ± .37	
Ragusano (RG)	22	19	15	27.4 ± .93	28.9 ± .68	33.1 ± .66	10.6 ± 1.26	
Pantesco (PT)	8	3	1	27.6 ± 1.02	28.8 ± .61	33.2 ± 1.11	10.5 ± 1.41	
Catalonian (CT)	19	11	2	27.0 ± .15	29.8 ± .50	33.5 ± .29	9.7 ± .15	
ALL	76	55	32					

Table 3. Breed tested in the study D-loop (400 sites, MEGA7).

Number of sampled individuals in each breed. NHap the number of haplotypes resulted in each polymorphic sites. k Average number of nucleotide differences ± standard deviation.

In Figura 3 sono mostrate le relazioni evolutive degli aplotipi e la relative abbondanza degli aplotipi per razza calcolate con il UPGMA method e il Maximum Composite Likelihoodmethod. In particolare, 7 aplotipi risultano essere i più diffusi nel campione analizzato due sono caratteristici del Catalano 40 e 53 ognuno dei quali presente in 3 individui. L'aplotipo 22, 36 e 37 è tipico del MF poi è presente nel PT il primo, nel RG il secondo e il terzo sia nel PT che nel RG. L'aplotipo 30 è tipico nel MF e presente anche nel CT. Infine il 51 è tipico del MF e nel PT, presente anche nel RG e CT.

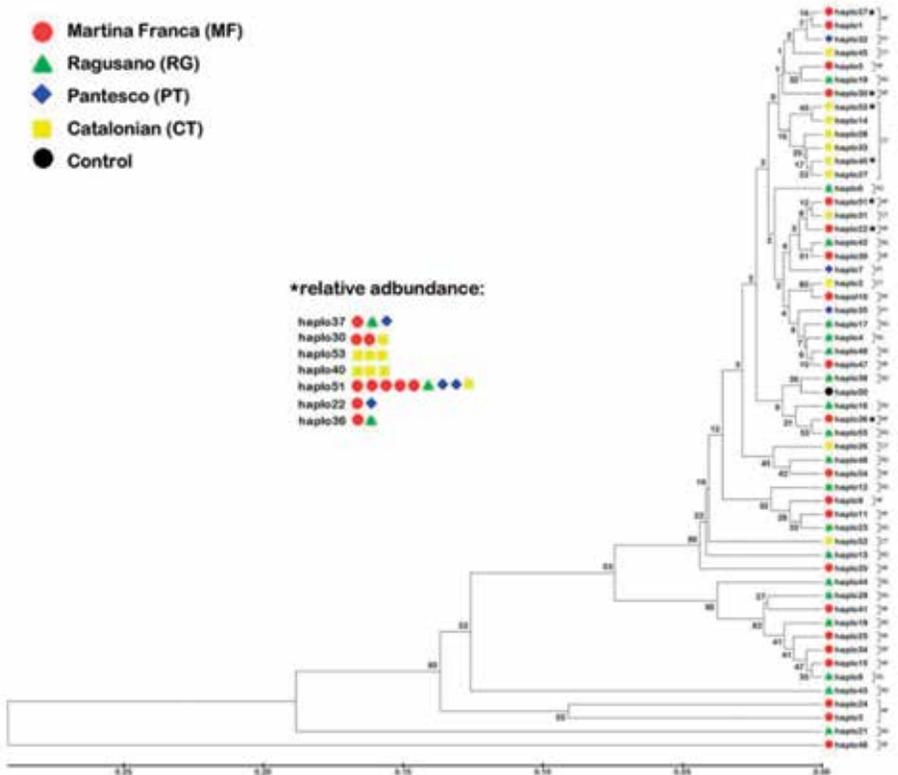


Fig.3. Evolutionary relationships of haplotypes. The evolutionary history was inferred using the UPGMA method. The optimal tree with the sum of branch length = 1.85287086 is shown. The percentage of replicate trees in which the associated taxa clustered together in the bootstrap test (500 replicates) are shown next to the branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths in the same units as those of the evolutionary distances used to infer the phylogenetic tree. The evolutionary distances were computed using the Maximum Composite Likelihood method and are in the units of the number of base substitutions per site. The analysis involved 55 nucleotide sequences. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 133 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA7.

I rapporti filietici tra i 55 aplotipi identificati nelle 77 sequenze sono stati studiati con il Median- joining Network basato sulle sequenze di 400 bp dell' mtDNA D-Loop. Gli aplotipi di ogni razza sono identificati dal codice dei colori, l'abbondanza dalla dimensione relative del simbolo e la diffusione tra le razze con la spartizione a torta dei vari colori (Fig.4).

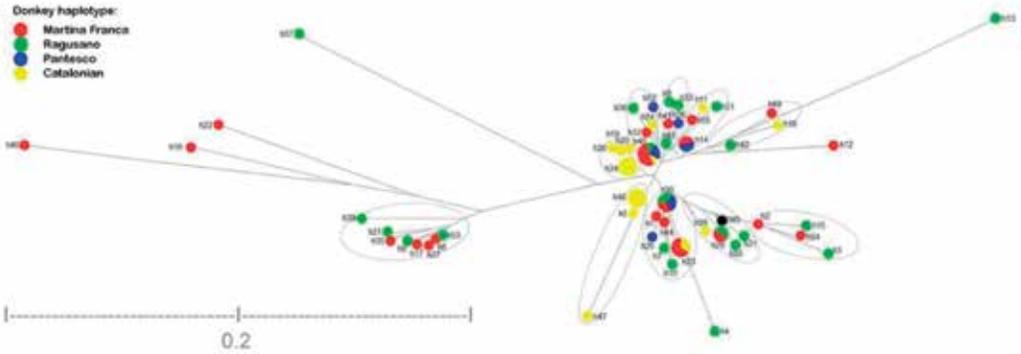


Fig.4. The median-joining network. It is based on 400 bp of the mitochondrial D-Loop representing 77 donkey within 55 haplotypes (DARwin 6.0). Each breed was shown by color and the proportions of different breed for each haplotype were shown. Reference mongrel samples is represented by black sphere.

L'analisi delle Principal Coordinates (PCoA) basata sulla matrice di dissimilarità ha permesso di rilevare due differenti clusters, I e cluster II, che racchiudono aplogruppi di tutte e quattro le razze studiate, tuttavia risultano aplotipi esterni ai clusters: RG 13, 16 e 38; MF e PT 22; MF, RG e PT 37; MF 40.

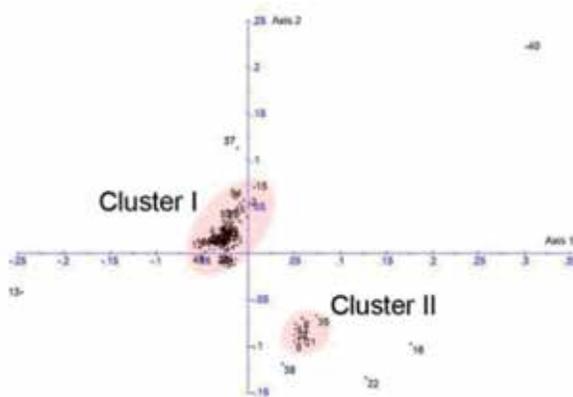


Fig.5. Principal Coordinates Analysis (PCoA). The PCoA plot of the two first axes based upon the dissimilarity matrix according to Kimura (1980) based on 951 bp of the 98 haplotype sequences (DARwin 6.0). We found two different clusters, cluster I and cluster II includes haplogroups of all four breeds, external haplotypes are: RG 13, 16 and 38; MF and PT 22; MF, RG and PT 37; and MF 40.

Discussione

Dalle analisi svolte emerge che la razza Martina Franca è verosimilmente la progenitrice del Pantesco e del Catalano che compaiono, come mostrato in figura 1, dal ceppo originario dell'asino Martinese. Più complessa è la valutazione dei rapporti evolutivi tra Martinese e Ragusano che verosimilmente hanno origine comune e/o i continui interscambi genetici tra le due razze. Inoltre, le popolazioni di Martinese e Ragusano hanno caratteristiche peculiari nelle sequenze del mtDNA D- loop delle singole razze, ma anche comuni come alcune diramazioni evidenziano.

L'analisi della diversità genetica media tra e nelle razze è buona, non il coefficiente di differenziazione. Per comprendere meglio se vi siano differenze nelle singole razze è stata eseguita l'analisi statistica della distanza genica all'interno delle singole razze e si evidenzia come l'asino di Martina Franca sia quello con la maggiore distanza genetica nella popolazione. Il dato risultante è interessante poiché indica che tra il materiale genetico campionato (soggetti testati) esiste la possibilità di conservazione della razza stessa. Simile anche se inferiore è la distanza genetica nel ragusano. Purtroppo, per l'asino Pantesco e il Catalano non esiste una significativa distanza genetica, dato allarmante per la conservazione di queste due razze. Altro risultato importante è la distanza genetica tra le razze studiate: il Martinese e il Ragusano sono quelli con minore distanza statistica, confermando lo scambio genico ripetuto nel tempo o l'origine simile. Pantesco e Catalano non hanno evidenziato distanza genica tra loro, e si pongono a simile distanza con Martinese e Ragusano. L'analisi successiva, per comprendere le differenze e la variabilità tra le razze, ha riguardato l'identificazione dei polimorfismi su singolo nucleotide (SNPs). L'analisi eseguita sul numero assoluto di mutazioni riscontrate in ogni singola sequenza, e la caratterizzazione di ogni SNP in base alla posizione e verso la sequenza di riferimento, il tipo di mutazione e la frazione in cui compare ha evidenziato che il Martinese assieme al Ragusano sono le razze con la maggiore

50variabilità di SNPs, di contro limitatissima è quella del Pantesco e del Catalano. Ancora una volta l'asino di Martina Franca emerge come serbatoio di biodiversità.

A questo dato è aggiunta l'identificazione di 55 aplotipi dalle 77 sequenze ottenute e di nuovo l'asino Martinese è la razza con il maggior numero di biodiversità di aplotipi 21, quasi il doppio del Catalano, il Ragusano segue distanziato di poco, drammatica è la situazione del Pantesco. Anche lo studio degli aplotipi conferma l'importanza della popolazione di Martina Franca nel patrimonio genetico asinino.

Di grande importanza è lo studio delle relazioni evolutive tra gli aplotipi usando il metodo UPGMA che chiaramente pone il Martina Franca come capostipite di tutte le razze considerate nello studio che evolverebbero da sue successive diramazioni, e la più antica vicina a lui è il Ragusano.

Per rifinire questo risultato è stata eseguita anche l'analisi del Median-joining Network che restituisce una completa segregazione del Catalano e del Pantesco comune ad un core centrale di Martinesi e Ragusani. Di contro ampia variabilità è chiaramente evidente per il Martinese e di seguito per il Ragusano.

La clusterizzazione degli aplotipi evidenzia due gruppi genici e alcuni spot isolati, suggerendo che la copertura della biodiversità registrata coincide con quella italiana per Martina Franca, Ragusano e Pantesco, ed è verosimile per il Catalano.

In conclusione, lo studio svolto ha determinato: I. l'identificazione di D-loopmtDNA caratteristici per l'asino di Martina Franca e tre razze fenotipicamente simili; II. L'identificazione di diverse matrilinee nel Martinese e nelle altre razze; III. L'identificazione della biodiversità

per ogni razza; IV. I rapporti filietici tra le razze.

Infine, questo ampio studio sulla biodiversità e i rapporti filietici nel Martina Franca e i suoi simili Ragusano, Pantesco e Catalano è utile per futuri studi sulla domesticazione della specie.

In conclusione, l'asino Martinese è una riserva importante di biodiversità che deve necessariamente essere conservato nella maggiore ampiezza del suo patrimonio genetico evitando con i programmi di conservazione di incorrere negli errori della consanguineità per fini estetici ma considerando ogni singolo animale prezioso per la conservazione della razza, perché l'estetica non coincide spesso con il patrimonio genetico interno al soggetto.

I futuri programmi di conservazione sono imprescindibili dall'inserire nel Certificato d'Origine anche l'analisi genetica almeno delle matrilinee.

Bibliografia

1. Bjørnstad G, Ried KH (2002) Evaluation of factors affecting individual assignment precision using microsatellite data from horse breeds and simulated breed crosses. *Animal Genet* 33: 264-270.
2. Brown WM, George M Jr, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl AcadSci U S A* 76: 1967-1971.
3. Clutton-Brock, J. 1992 *Horse power: a history of the horse and the donkey in human societies*. London, UK: Harvard University Press and the Natural History Museum.
4. Ishida N, Hasegawa T, Takeda K, Sakagami M, Onishi A, et al. (1994) Polymorphic sequence in the D-loop region of equine mitochondrial DNA. *Anim Genet* 25: 215-221.
5. Kumar S, Stecher G, Tamura K (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33(7):1870–1874.
6. Kumar S., Stecher G., and Tamura K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular Biology and Evolution*.
7. Mazzatenta A, Carluccio A, Robbe D, Di Giulio C, Cellerino A (2017). The companion dog as a unique translational model for aging. *Semin Cell Dev Biol*;70:141-153.
8. Rand DM (2001) The units of selection on mitochondrial DNA. *Annu Rev EcolSyst* 32: 415-448.
9. Stoneking M, Sherry ST, Redd AJ, Vigilant L. (1992). New approaches to dating suggest a recent age for the human mtDNA ancestor. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 29;337(1280):167-75.
10. Tamura K., Battistuzzi FU, Billig-Ross P, Murillo O, Filipski A, and Kumar S. (2012). Estimating Divergence Times in Large Molecular Phylogenies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:19333-19338.
11. Tamura K., Nei M., and Kumar S. (2004). Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor-joining method. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 101:11030-11035.
12. Toro MA, Barragan C, Ovilo C (2003) Estimation of genetic variability of the founder population in a conservation scheme using microsatellites. *Ani Genet* 34: 226-228.
13. Upholt WB, Dawid IB (1977) Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: Rapid evolution in the D loop region. *Cell* 11: 571-583.
14. Verginelli F, Capelli C, Coia V, Musiani M, Falchetti M, Ottini L, Palmiroto R, Tagliacozzo A, De Grossi Mazzorin I, Mariani-Costantini R. (2005). Mitochondrial DNA from prehistoric canids highlights relationships between dogs and South-East European wolves. *Mol Biol Evol.*;22(12):2541-51.
15. Vigilant L, Pennington R, Harpending H, Kocher TD, Wilson AC (1989). Mitochondrial DNA sequences in single hairs from a southern African population. *Proc Natl AcadSci U S A* ;86(23):9350-4.
16. Wallace DC (2007) Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76: 781-821.



REGIONE PUGLIA

Dipartimento Agricoltura,
Sviluppo Rurale e Tutela dell'Ambiente.
Sezione Gestione Sostenibile.
Tutela delle Risorse Naturali e Forestali.
Servizio Valorizzazione e Tutela
delle Risorse Naturali e Biodiversità



**UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO**



LINEE GUIDA PER LA GESTIONE DELL'ALLEVAMENTO ASININO



Facoltà di Medicina Veterinaria

Preside: Prof. Augusto **Carluccio**, DVM PhD

Ospedale Veterinario Universitario didattico

Direttore: Prof. Augusto **Carluccio**, DVM PhD

MANAGEMENT RIPRODUTTIVO DELLE FATTRICI ASININE

Brunella Anna Giangaspero, Augusto Carluccio

Una corretta gestione delle fattrici, degli accoppiamenti e dei parti è propedeutica a dei buoni risultati riproduttivi, per questo motivo l'organizzazione di ogni allevamento deve essere basata su conoscenze scientifiche.

Un efficiente management riproduttivo prevede una suddivisione degli spazi aziendali funzionale alla vita sociale e riproduttiva dell'animale. I paddock devono essere realizzati in numero sufficiente ai gruppi che si intende costituire. Solitamente i gruppi sono: fattrici con puledri; asine gravide; asine primipare; asine adulte. Per evitare stress per gli animali e dispendio di lavoro è bene che i paddock siano attigui ed in comunicazione tra loro attraverso sistemi mobili, in modo che il passaggio delle asine da un gruppo all'altro possa avvenire facilmente.

L'asina è un animale poliestrale che presenta estri durante tutto l'anno, ciò permette di pianificare gli accoppiamenti. Questa attività assume modalità diverse a seconda della tipologia di gestione della riproduzione preferita dall'allevatore.

Anche all'interno di un allevamento dovrebbe essere presente un'area dedicata alle procedure di accoppiamento che può avvenire in modo naturale o mediante inseminazione strumentale.

Il management dell'inseminazione strumentale prevede una fase preliminare in cui la fattrice è presentata allo stallone (teasing) con lo scopo di evidenziare le manifestazioni estrali esterne e successivamente la visita ginecologica con l'ausilio dell'esame ecografico per monitorare lo sviluppo follicolare.

Non sempre è possibile utilizzare questa gestione riproduttiva, in quanto richiede la presenza di Medici Veterinari esperti e di strumentazioni specifiche. In questi casi è possibile ricorrere alla monta allo stato brado, in cui lo stallone è inserito nel gruppo delle fattrici o alla monta alla mano, nella quale lo stallone è fatto accoppiare con le fattrici in calore.

Un programma di accoppiamento idoneo che preveda l'assistenza alla monta brada o ancor meglio alla monta alla mano può essere sintetizzato in diversi punti: l'identificazione delle fattrici in calore tramite il teasing, l'accoppiamento dei riproduttori, da ripetere ogni 48 ore fino al rifiuto dello stallone ed infine la diagnosi di gravidanza tramite esame ecografico o mancato ritorno in calore. Un miglioramento degli indici riproduttivi può essere ottenuto mediante la monta alla mano che sarebbe da preferire rispetto alla brada in quanto riduce il numero di salti per calore e permette di identificare le fattrici che presentano disordini riproduttivi. Risultano così massimi la fertilità ed il tasso di gravidanza; difatti accoppiamenti ripetuti durante il calore aumentano il rischio

di patologie riproduttive, come l'endometrite post-coitale. Allo stesso modo, il rischio legato alla monta brada è la condivisione degli stessi spazi tra puledri e stallone e, in alcuni casi, con altre asine dominanti. E' da sottolineare l'irruenza tipica del maschio e quindi il rischio che si verifichino traumi alle fattrici e soprattutto ai puledri. Altra criticità o svantaggio della monta brada è la mancanza di informazioni dettagliate sul numero e sui tempi in cui sono avvenuti gli accoppiamenti. Sarebbe quindi ottimale assistere all'accoppiamento così da ridurre i rischi.

Nel caso in cui lo stallone non sia inserito nel gruppo delle fattrici per la monta brada, deve essere mantenuto in un paddock a contatto o in vicinanza delle fattrici così da permettere il verificarsi del cosiddetto effetto maschio.

La monta "alla mano", realizzata in una zona specifica in cui lo stallone è condotto per "coprire" la fattrice, è la soluzione più sicura per gli animali e più funzionale per la raccolta dei dati riproduttivi, ma senza dubbio necessita di tempo, soprattutto nel condizionamento degli animali, e nel monitorare costantemente le fattrici per il rilevamento dei calori.

Un'altra soluzione può essere la presentazione al maschio, che rimane confinato nel suo paddock, di fattrici temporaneamente separate dal redo. Questa modalità di approccio comporta un lavoro maggiore ma riduce i rischi sopra elencati, permette di controllare meglio l'attività riproduttiva e di evidenziare eventuali problematiche.

Le due tipologie di gestione possono coesistere fra di loro scegliendo la più adatta in base all'animale da destinare all'accoppiamento. Ad esempio, in presenza di asine di pregio o particolarmente "difficili", si può optare per la monta alla mano, mentre le altre possono essere portate nel recinto del maschio.

In ogni caso è utile effettuare almeno un controllo ecografico 14-25 giorni dopo la monta o il calore per diagnosticare la gravidanza per escludere la gemellarità non auspicabile negli equidi.

Un adeguato sistema di allevamento delle fattrici asinine ed una razionalizzazione degli accoppiamenti permettono il miglioramento delle performance riproduttive per la salvaguardia dell'Asino (bru).

1. Contri, A., Robbe, D., Gloria, A., De Amicis, I., Veronesi, M. C., & Carluccio, A. (2014). Effect of the season on some aspects of the estrous cycle in Martina Franca donkey. *Theriogenology*, 81(5), 657-661.
2. Troedsson, M. H. (2006). Breeding-induced endometritis in mares. *Veterinary Clinics: Equine Practice*, 22(3), 705-712.

IGIENE DELLA RIPRODUZIONE NELLO STALLONE

Roberta **Bucci**, Augusto **Carluccio**

La corretta gestione dei riproduttori è un elemento di fondamentale importanza nell'ambito di un programma di salvaguardia di una razza a rischio di estinzione. Infatti, non solo è necessario preservare il benessere e l'etologia dei soggetti ma anche garantire le migliori condizioni di igiene e management affinché questi possano raggiungere adeguate performances riproduttive.

Ricovero

Gli stalloni asinini, come i cavalli, necessitano di ampi spazi di stabulazione, asciutti e ben illuminati, in modo da potersi muovere liberamente. È inoltre indicato ricoverare gli stalloni in strutture distanti tra loro, per poter limitare gli stimoli visivi ed olfattivi, garantendone così la tranquillità (Perez e Perez, 1994). Per lo stesso motivo, andrebbe anche evitata la stabulazione delle fattrici nelle vicinanze dello stallone, a meno che non si voglia ottenere il cosiddetto effetto maschio.

Igiene dello stallone

All'inizio di ogni stagione riproduttiva, lo stallone dev'essere sottoposto ad accurato esame fisico e della funzione riproduttiva per confermarne l'idoneità alla monta.

Sono da valutare eventuali problematiche sanitarie di natura generale, come zoppie o malattie croniche che possano influire negativamente con il comportamento sessuale.

La visita andrologica prevede l'esposizione alla fattrice per valutare la libido e per facilitare l'ispezione dei genitali esterni, che in questa fase sono accuratamente puliti con acqua tiepida e bicarbonato. Gli organi interni sono valutati mediante esame ecografico da un medico veterinario. La legge 30/1991 prevede inoltre che i riproduttori equidi siano sottoposti, con cadenza annuale, a screening per le principali malattie infettive della sfera genitale (Anemia Infettiva, Arterite Virale, Encefalite Virale, Morbo Coitale Maligno, Morva, Metrite Equina Contagiosa, Rinopolmonite Infettiva).

È indicata la valutazione del materiale seminale all'inizio di ogni stagione riproduttiva per confermare fertilità dello stallone. Tale esame andrebbe poi ripetuto ogni due mesi durante la stagione per confermare la valenza del riproduttore. Infatti, poiché la spermatogenesi ha una durata di circa 60 giorni (Russel et al., 1990), eventuali traumi od infezioni possono ripercuotersi negativamente sulla qualità del seme.

Prima di ogni raccolta o monta alla mano, la verga dello stallone andrebbe lavata con acqua tiepida, successivamente con acqua e bicarbonato, risciacquata con acqua tiepida ed asciugata con panno di carta e l'operatore dovrebbe porre attenzione nell'eliminare ogni residuo di sporco che possa contaminare l'ejaculato. Questa manualità permette

anche di confermare l'integrità dell'organo copulatorio. Questa importante manualità igienico-sanitaria viene meno se lo stallone è impiegato in monta brada.

È consigliato, durante la stagione riproduttiva, non praticare più di due raccolte di materiale seminale al giorno, in quanto, nello stallone asinino, l'atto sessuale ha una forte componente neuroendocrina che affatica notevolmente il riproduttore stesso (Perez e Perez, 1994). Sempre per la stessa ragione, è indicato non utilizzare lo stallone per più di tre volte a settimana.

Igiene della raccolta del materiale seminale

La raccolta del materiale seminale mediante l'utilizzo della Vagina Artificiale (VA) andrebbe preferita alla monta naturale, per garantire una maggior igiene e sicurezza per la fattrice e lo stallone stesso, limitando così il passaggio di patogeni tra i riproduttori. Tale metodologia porta a migliorare l'efficienza riproduttiva.

All'inizio di ogni stagione riproduttiva, per motivi sanitari, ad ogni stallone è assegnata una vagina artificiale.

La vagina artificiale dev'essere ben pulita e detersa con acqua distillata ed asciugata prima della raccolta, in quanto ogni contaminazione del materiale seminale potrebbe alterarne la qualità. Per lo stesso motivo è inoltre tassativo l'utilizzo di gel lubrificante non spermicida.

Dopo ogni utilizzo, la VA dev'essere accuratamente sciacquata con acqua corrente ed eventualmente disinfettata con l'utilizzo di soluzione alcolica al 70%.

Tutti i materiali che, in fase di raccolta (biberon, raccordi) e di valutazione (vetrini, copri-oggetti, provette, etc.), entrano in contatto con il liquido seminale devono essere sterili e monouso o sterilizzabili. Andrebbero inoltre mantenuti a temperatura di circa 37° C per limitare lo shock termico, dannoso per gli spermatozoi.

Igiene dell'inseminazione strumentale

Le dosi di materiale seminale prodotte devono essere mantenute al riparo dalla luce diretta del sole e conservate in provette sterili od in siringhe non spermicide per non alterare le caratteristiche degli spermatozoi.

Anche gli strumenti utilizzati per l'Inseminazione Strumentale (IS) devono essere sterili e monouso. La fattrice sottoposta ad IS inoltre deve essere accuratamente preparata, onde evitare il passaggio in utero di contaminanti durante le manualità.

È quindi indicato effettuare un'adeguata detersione dei genitali esterni, utilizzando acqua tiepida e soluzioni iodate, ed utilizzare guanti zootecnici sterili.

Gli accorgimenti igienici e gestionali sopra riportati, pur nella loro semplicità, risultano fondamentali ai fini dell'efficienza riproduttiva.

Infatti, un corretto governo dello stallone e una gestione razionale dell'attività riproduttiva permettono di mantenere costante la qualità del materiale seminale. Inoltre, il controllo accurato della salute dei riproduttori e dell'igiene della riproduzione riducono il rischio di patologie a carico degli organi genitali.

Un programma di salvaguardia di una razza a rischio di estinzione non può quindi

Bibliografia

1. Pérez J., Pérez F., Riproduzione animale: Inseminazione artificiale e trapianto embrionale. Piccin Editore, 1994
2. Russell L.D., Etlin R.A., Sinha-Hikim A.P., Clegg E.D., 1990. "Histological and Histopathological Evaluation of the testis". Vienna, IL: Cache River Press.

prescindere da un elevato livello igienico-sanitario e manageriale dei riproduttori.

CENNI SULLA GESTIONE DEL PARTO E PRIME CURE DEL NEONATO

Brunella Anna **Giangaspero**, Augusto **Carluccio**

La nascita del puledro rappresenta un evento di fondamentale importanza dell'attività riproduttiva e produttiva dell'allevamento asinino.

Al fine di evitare o ridurre notevolmente le perdite neonatali, possono essere effettuate delle valutazioni cliniche per prevedere il momento del parto, intervenire con l'isolamento preventivo in box delle fattrici e poter gestire correttamente il puledro neonato.

I segni clinici indicativi dell'approssimarsi del parto sono: aumento di volume della mammella; rilassamento dei legamenti pelvici; presenza, negli ultimi giorni prima del parto, di un secreto mammario simile al miele; fenomeno dell'“inceramento” o “imperialamento”, segno questo di parto imminente. Infine, fra i segni che precedono il parto, uno di facile rilevazione è il cambiamento dell'aspetto del secreto mammario. È consigliabile effettuare la “prova del nero”, che consiste nel far cadere una goccia di secrezione pre-colostrale o colostrale su un rettangolino di plastica nera, valutando se attraverso la goccia è possibile (prova negativa) o meno (prova positiva - imminenza del parto) rilevare il colore nero del supporto. Infatti, circa 24-36 ore prima del parto, il secreto mammario non è più trasparente ma lattiginoso.

Il momento in cui più frequentemente si verifica il parto è durante la notte o nelle prime ore del mattino; all'approssimarsi del travaglio, a differenza della cavalla, l'asina non presenta zone di sudorazione, si alza e si corica frequentemente, si muove in circolo, arriccia il labbro superiore come smorfia di dolore. La fase espulsiva, molto rapida, è preceduta dalla rottura della “borsa delle acque”, si compie generalmente a terra e inizia con la fuoriuscita degli arti e della testa del puledro dalla rima vulvare. Una volta completata l'espulsione del feto, la rottura del cordone ombelicale si verifica o in seguito a movimenti del puledro o all'assunzione della stazione quadrupedale da parte della madre. La rottura del cordone ombelicale avviene a 5 cm circa dall'ombelico, in un punto di minor resistenza già preformato. La rottura manuale del cordone ombelicale dovrebbe essere evitata e, ove necessario, dovrebbe essere effettuata solo in corrispondenza del punto preformato. E' sempre bene disinfettare il moncone con una soluzione antisettica. Normalmente il peduncolo residuo del cordone ombelicale cade per necrosi secca nell'arco due settimane.

Dopo la nascita del puledro, il parto continua con l'espulsione delle membrane fetali, momento definito “terzo stadio” del parto o secondamento. Dopo il parto la fattrice

stimola il puledro ad assumere la stazione quadrupedale attraverso stimoli fisici ed inizia con le cure parentali allo scopo di asciugarlo e stimolare il circolo periferico impedendone così il raffreddamento.

Una corretta previsione del parto e gestione delle sue fasi può essere un fattore discriminante per la sopravvivenza dei puledri asinini, estremamente sensibili a fattori esogeni che possono limitarne la sopravvivenza. Allo stesso modo, assicurando le cure neonatali necessarie al puledro è possibile limitare l'insorgenza di patologie perinatali talvolta invalidanti o letali per i puledri stessi.

Bibliografia

1. Carluccio, A., De Amicis, I., Panzani, S., Tosi, U., Faustini, M., & Veronesi, M. C. (2008). Electrolytes changes in mammary secretions before foaling in jennies. *Reproduction in domestic animals*, 43(2), 162-165.
2. Carluccio, A., Gloria, A., Veronesi, M. C., De Amicis, I., Noto, F., & Contri, A. (2015). Factors affecting pregnancy length and phases of parturition in Martina Franca jennies. *Theriogenology*, 84(4), 650-655.
3. Milonis, E., Polidori, P. (2011). Latte di asina. *Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche- Brescia*, 82, 130-137.

GESTIONE DEGLI ABORTI

Roberta **Bucci**, Augusto **Carluccio**

Introduzione

Le patologie della sfera riproduttiva hanno un forte impatto nell'allevamento asinino. Particolare importanza riveste l'aborto, per la perdita del puledro e le possibili conseguenze negative a carico della fattrice (Carluccio, 2015).

L'aborto è definito come la perdita del feto oltre il 40esimo giorno di gestazione (Fafard, 2013) o l'interruzione della gravidanza prima che il feto sia autonomo per la vita extra uterina (Blanchard, 2003).

Gli aborti, per circa l'85-95% sono di natura non infettiva. Frequenti sono infatti le interruzioni spontanee di gestazione dovute a: gravidanza gemellare, anomalie fetali o placentari, insufficienza luteale, ingestione di tossici, traumi (Fafard, 2013).

Il 5-15% degli aborti riconosce invece una causa infettiva (Fafard, 2013). Questi devono essere riconosciuti e gestiti tempestivamente, in quanto la presenza di un focolaio infettivo può provocare l'interruzione della gravidanza in un numero elevato di fattrici, con notevole danno zootecnico ed economico.

Gli aborti infettivi riconoscono agenti eziologici batterici, virali, fungini e protozoari oltre alla Mare Reproductive Loss Syndrome (MRLS), provocata dalla presenza in allevamento di bruchi della seta contaminati da batteri ed altri microorganismi (Fafard, 2013).

Aborti di natura fungina o protozoaria

Il principale agente micotico coinvolto in episodi di aborto è *Aspergillus fumigatus*, responsabile di placentite cronica che provoca la perdita del feto tra i 5 e gli 11 mesi di gestazione.

I protozoi, come *Babesia Spp*, sono invece responsabili indiretti di aborto in quanto non causano lesioni dirette al feto o alla placenta ma la perdita della gravidanza sopraggiunge in seguito alle gravi condizioni generali della fattrice.

Aborti di natura batterica

I principali batteri coinvolti in patologie abortigene sono: *Streptococcus. Zooepidemicus*, *Nocardia spp*, *Escherichia Coli*, *Pseudomon asaeruginosa*, *Leptospira spp*.

Questo genere di infezioni provoca gravi placentiti, che possono avere origine ematogena od ascendente. La morte del feto in questi casi può essere indiretta, in seguito alle gravi lesioni a carico della placenta, o diretta per il passaggio dei patogeni al feto.

In tabella 1 sono elencate le principali caratteristiche degli aborti batterici.

Agente eziologico	Segni clinici	Lesioni fetali	Lesioni placentali
<i>Str. zooepidemicus</i>	Aborto sporadico < 200 giorni	Setticemia, processi autolitici	Placentite cronica ascendente
<i>Nocardia spp</i>	Aborto sporadico tardivo (8°-11° mese)	Scarso accrescimento, emaciazione	Placentite focale su base corna uterine
<i>E. coli</i>	Aborto sporadico > 200 gg	Setticemia, processi autolitici	Placentite cronica ascendente
<i>P. aeruginosa</i>	Aborto sporadico > 200 gg	Setticemia, processi autolitici	Placentite cronica ascendente
<i>Leptospira spp.</i>	Aborto tardivo (dal 6° mese)	Processi autolitici	aspecifiche

Tab. 1. Batteri abortigeni. (da Blanchard 2003, modificato)

Aborti di natura virale

Gli aborti di origine virale riconoscono come principali agenti eziologici l'Herpes Virus Equino di tipo 1 (EHV-1) e l'Arterivirus responsabili, rispettivamente, della rinopolmonite equina e dell'Arterite Virale Equina (EVA) (Mc Kinnon, 2011).

Questi patogeni sono responsabili del 50% circa degli episodi di aborto riconducibili ad una causa infettiva (Carluccio, 2015). Sono inoltre patologie che possono dar luogo ad un focolaio epidemico e quindi coinvolgere un gran numero di soggetti, con notevoli perdite economiche.

Equine Herpes Virus (EHV)

Tra i vari tipi di Herpesvirus isolati, EHV-1 ed EHV-4 risultano essere responsabili di malattia (Passamonti, 2006), ma solo EHV-1 è in grado di provocare aborto (Allen et al, 1985).

Il passaggio del virus avviene per via aerogena, attraverso il contatto diretto o indiretto, tramite secrezioni infette (scolo oculo-nasale) o anche il feto o liquidi fetali conseguenti all'aborto (Carluccio, 2015).

L'Aborto sopraggiunge entro il quarto mese di gestazione ed in genere è preceduto da una lieve sintomatologia respiratoria. Sono stati tuttavia identificati casi di aborto a distanza di anni dall'infezione primaria, per la riattivazione di un'infezione latente (Allen et al., 1998; Elia et al., 2004). Inoltre, se la fattrice entra in contatto con il virus durante le ultime fasi di gravidanza, è possibile la nascita di soggetti infetti, destinati a morire in poche ore o giorni per il sopraggiungere di infezioni secondarie.

La placenta in genere non presenta alterazioni ed è espulsa in seguito all'aborto. Il feto abortito invece presenta tipicamente lesioni necrotiche a carico del fegato, processi autolitici generalizzati e versamenti cavitari (Blanchard, 2003).

Arterivirus (EVA)

Il virus dell'arterite virale equina (EVA) appartiene alla famiglia degli *Arteriviridae* ed è responsabile di una malattia infettiva e contagiosa caratterizzata da una forma febbrile acuta con vasculite generalizzata, sintomatologia respiratoria, edema, petecchie emorragiche. Nelle fattrici gravide provoca aborto e natimortalità, mentre negli stalloni può provocare un'infezione persistente (Timoney et al., 1993; Lazic et al., 2017).

Il contagio è possibile per via respiratoria e venerea (tramite il materiale seminale infetto) ma anche per via indiretta tramite secrezioni infette o materiale abortito.

L'aborto ha una prevalenza variabile dal 10 al 60% dei soggetti colpiti e sopraggiunge senza segni clinici particolari tra il 3° ed il 10° mese di gestazione (Timoney et al., 1993). La placenta è in genere affetta da fenomeni autolitici e, microscopicamente, è possibile rilevare lesioni necrotiche a carico dei vasi sanguigni (Blanchard, 2003).

Come comportarsi in caso di aborto

Anche se la prevalenza degli aborti di origine non infettiva è maggiore rispetto alle cause infettive, è bene trattare ogni evento come una potenziale fonte di infezione, per limitare la diffusione di eventuali patogeni.

È buona norma, come primo comportamento da attuare, isolare la fattrice coinvolta ed evitare che altri individui entrino in contatto con feto o invogli abortiti.

Individuazione del patogeno

Un'accurata anamnesi della fattrice e dell'allevamento è indicata per poter emettere una diagnosi di sospetto. In particolare, la storia riproduttiva pregressa della fattrice, il momento della gestazione in cui è sopraggiunto l'aborto, il manifestarsi di altri segni di malattia od il coinvolgimento di altre fattrici in allevamento permettono al Medico Veterinario di orientarsi nella diagnosi.

La raccolta di campioni di siero dalla fattrice o dal feto, nonché il campionamento di organi fetali, quali fegato, polmone, milza, reni (se non addirittura il conferimento al laboratorio di riferimento di feto e placenta nella loro interezza), permettono l'approfondimento delle analisi di laboratorio per la ricerca del patogeno responsabile.

È possibile confermare l'infezione con EHV-1 tramite la siero neutralizzazione (IS) per la ricerca degli anticorpi materni nei confronti del virus sul siero, prelevato in doppia aliquota a distanza di 15 giorni. È inoltre possibile ricercare l'Herpes direttamente in campioni del feto attraverso l'immunoistochimica e la ricerca dei corpi inclusi nelle cellule del fegato. Poiché, però, queste tecniche prevedono lunghi tempi di esecuzione mentre l'herpesvirus ha una trasmissione rapida tra gli individui, è possibile giungere ad una diagnosi eziologica rapida mediante PCR (Carluccio, 2015).

L'individuazione di EVA è possibile a partire da tamponi nasofaringei della fattrice, liquido seminale dello stallone, placenta, liquidi fetali, polmone, fegato e tessuto linfoide del feto. La micro neutralizzazione su questi tessuti è considerata il gold standard per la diagnosi eziologica di Arterite Virale (Carluccio, 2015).

Obblighi di legge

È importante ricordare che, secondo il Regolamento di Polizia Veterinaria, la Rinopolmonite e l'Arterite Virale Equina sono malattie soggette a denuncia (O.M. 12/08/1970) e, come conseguenza al provvedimento, gli animali non possono essere movimentati; le fattrici coinvolte devono obbligatoriamente essere isolate; le strutture in cui sono avvenuti gli episodi di aborto sottoposte a vuoto sanitario e disinfezione con prodotti a base di cloro.

Se le analisi di laboratorio confermano l'infezione, gli animali presenti in struttura sono sottoposti a sequestro fino a quando non siano avvenuti tutti i parti attesi e soprattutto fino a quando tutte le fattrici positive non risultino negative alle analisi di controllo.

Prevenzione

La prevenzione delle forme infettive è possibile attraverso l'attuazione di comportamenti cautelativi quali:

- isolamento per tre settimane dei nuovi soggetti
- pulizia e disinfezione regolari
- creazione di gruppi poco numerosi - limitazione degli eventi stressanti

Obblighi di legge

Per l'arterite virale è istituito un piano di controllo nazionale (O.M. 13 gennaio 1994) che prevede l'attuazione annuale del test sierologico (siero neutralizzazione) su tutti gli stalloni di età superiore ai 2 anni ed approvati per la monta (la detenzione, in stazioni di monta, di soggetti non approvati per l'accoppiamento è vietata) oltre alla valutazione del materiale seminale. Gli stalloni siero positivi sono ammessi alla monta solo in caso in cui la ricerca del patogeno nel materiale seminale dia risultato negativo, in caso contrario sono esclusi per tutta la durata della stagione. È possibile utilizzare in deroga il materiale seminale di soggetti eliminatori, previo parere positivo del Ministero della Salute e dell'UNIRE.

Le stazioni di monta, i centri di inseminazione artificiale e i laboratori di produzione del materiale seminale devono risultare indenni.

Profilassi vaccinale

Il Piano Nazionale per il controllo dell'Arterite virale vieta la vaccinazione degli animali.

Gli interventi di immunizzazione sono invece possibili per contrastare l'infezione da Herpesvirus. È infatti consigliata la vaccinazione delle fattrici gravide con vaccino inattivato al 5°-7°-9° mese di gravidanza.

Conclusione

La comparsa di uno o più episodi di aborto in un allevamento asinino non può essere sottovalutata dall'allevatore in quanto esiste la possibilità che tali episodi abbiano origine infettiva e possano diffondersi a macchia d'olio tra le fattrici.

Il mantenimento di adeguati standard igienici, l'attuazione di tutte le misure preventive disposte dalle leggi vigenti nonché delle profilassi vaccinali, ove possibili, sono strumenti in grado di limitare l'insorgenza di un focolaio di aborto.

La corretta gestione del focolaio, col l'aiuto del Medico Veterinario e nel rispetto delle leggi vigenti, permette di limitare le perdite economiche e zootecniche.

Un corretto management dell'allevamento asinino non può quindi prescindere dall'attuazione di tutte le pratiche qui elencate per ridurre l'incidenza degli aborti di origine infettiva.

Bibliografia

1. Allen GP, Yeagan MR, Turtinew LW, Bryans JT. A new field strain of equine abortion virus (equine herpesvirus -1) among Kentucky horses. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 138-140, 1985.
2. Allen GP, Kydd JH, Stater JD, Smith KC. Advances in understanding of the pathogenesis, epidemiology and immunological control of equine herpesvirus abortion. *Proceedings 8th International Conference on Equine Infectious Diseases*, Dubai, 1998; 129-146.
3. Blanchard, T. L. (2003). *Manual of equine reproduction* (No. 636.1 (035)). Mosby.
4. Carluccio R. G., Carluccio A., Emergenze infettive: gli aborti di epidemici di natura virale negli allevamenti equini. In: Marsilio, F. (2015). *La gestione delle emergenze veterinarie*.
5. Elia, G., Campolo, M., Lorusso, E., Decaro, N., Desario, C., Martella, V., & Buonavoglia, C. Infezione da herpesvirus equino tipo 1 in un allevamento in puglia. *Large Animals Review*, Anno 10, n. 5, Ottobre 2004
6. Fafard, A. (2013). *Blackwell's Five-Minute Veterinary Consult: Equine Theriogenology*. *The Canadian Veterinary Journal*, 54(4), 376.
7. Lazić, S., Lupulović, D., Gaudaire, D., Petrovic, T., Lazić, G., & Hans, A. (2017). Serological evidence of equine arteritis virus infection and phylogenetic analysis of viral isolates in semen of stallions from Serbia. *BMC veterinary research*, 13(1), 316.
8. McKinnon, A. O., Squires, E. L., Vaala, W. E., & Varner, D. D. (Eds.). (2011). *Equine reproduction*. John Wiley & Sons.
9. Passamonti F, Lepri E, Marenzoni ML, et al., Infezione congenita da Herpesvirus equino di tipo 1 (EHV.1): un episodio in un allevamento di purosangue inglese. *Ippologia* 4: 21-5, 2006.
10. Timoney, P. J., & McCollum, W. H. (1993). Equine viral arteritis. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 9(2), 295-309.

CENNI DI ALIMENTAZIONE

Beatrice Saporito, Augusto Carluccio

Alimentazione del puledro

Il colostro per il puledro rappresenta la prima fonte energetica e conferisce l'immunità. Ha colore giallastro e una consistenza più densa rispetto al latte. E' prodotto dalla fattrice nelle prime 24 ore post parto ed è ricco di proteine tra cui le principali sono le immunoglobuline, fondamentali per l'acquisizione dell'immunità. È importante che il puledro lo assuma entro le prime 6 ore di vita, quando la barriera intestinale è ancora permeabile alle proteine.

È preferibile che il puledro sia pesato al momento della nascita e con cadenza mensile, per valutare l'effettivo accrescimento. Il tasso di crescita dovrebbe essere regolare, con un incremento giornaliero pari a 1-2 kg/die, le coste devono essere visibili fino allo svezzamento e questo stato di nutrizione dovrebbe essere mantenuto fino ai 18 mesi.

La principale fonte nutrizionale per il puledro nei primi sei mesi è rappresentata dal latte materno la cui produzione mediamente è pari a 3-4 kg/die.

Lo stomaco del puledro è di ridotte dimensioni, perciò il pasto deve essere frequente e con l'assunzione di bassi volumi. Un puledro normale si nutre dalle 7 alle 8 volte all'ora durante il giorno, assumendo circa 80 ml a pasto, per un totale di circa 450ml/h.

L'acqua deve essere sempre lasciata a disposizione sia per la madre che per il puledro.

A partire dal 10^{mo} giorno di vita, è indicata l'introduzione, nella dieta del puledro, di alimenti solidi e fibrosi come fieno di ottima qualità. Questo può essere somministrato ad libitum, od aumentando gradualmente la dose di 0,25 kg/die.

L'introduzione di concentrato nella dieta del puledro, a partire dal 2°-3° mese di vita, è utile per garantire un corretto accrescimento.

I concentrati presenti sul mercato provvedono a una dieta bilanciata e contengono anche il giusto rapporto di vitamine e sali minerali necessari per il corretto accrescimento del puledro. Normalmente un'asina allatta il redo fino al 6°-7° mese di vita ma è fondamentale l'integrazione con fieno e alimenti concentrati a partire dal 2°-3° mese di vita per favorire lo sviluppo della capacità digestiva in previsione dello svezzamento.

Un'utile indicazione per la gestione dei puledri è l'introduzione di recinti, accessibili solo al redo, in cui mettere l'alimento a lui destinato, evitando che sia consumato dalla fattrice. Questa tecnica è denominata creepfeeding.

Lo svezzamento dovrebbe essere effettuato intorno al 5°-6° mese di vita e comunque non prima dei 4 mesi. E' importante che il redo arrivi a questa fase già abituato a consumare una certa quantità di alimenti secchi. Da questo momento in poi dovrebbero essere somministrati circa 3-4 kg di fieno di prato polifita, 2 kg di mangime concentrato

da svezzamento per puledri ed acqua ad libitum. La quota proteica del concentrato potrà essere ridotta a partire dai 12 mesi, per le ridotte esigenze ai fini dell'accrescimento dell'animale.

Alimentazione dell'asina

Durante la stagione riproduttiva, la fattrice asinina necessita di un apporto energetico maggiore. L'alimentazione dovrebbe essere a base di fieno polifita, meglio se ad libitum o in quantità pari a 6- 8 kg/die, 2 kg/die di mangime concentrato completo per fattrici e acqua ad libitum.

La gestione alimentare della fattrice gravida deve essere modificata nel corso della gestazione per favorire l'aumento del fabbisogno nutritivo di madre e feto.

Nei primi mesi della gravidanza, la razione alimentare può essere lo stesso utilizzato per le fattrici non gravide.

Durante gli ultimi tre mesi di gravidanza, che corrispondono alla fase di rapido accrescimento del feto, le richieste energetiche sono maggiori e sarà necessario un maggior apporto proteico, vitaminico e di oligoelementi. Conseguentemente, sarà necessario aumentare la razione di concentrato a 3,5 kg/die, utilizzando un prodotto specifico per fattrici gravide e in lattazione. Lo stesso piano alimentare può essere utilizzato anche nel post partum.

Alimentazione dello stallone

L'alimentazione dello stallone al di fuori della stagione di monta non differisce molto da quella di un soggetto normale dello stesso peso. Durante l'anno, è importante che lo stallone disponga sempre di un pascolo o di un fieno di ottima qualità. Gli alimenti concentrati devono essere somministrati in piccole quantità (< 2,5 kg/die), mentre dev'essere fornita un'adeguata integrazione con complessi minerali vitaminici, come selenio organico, zinco e vitamine E, in grado di migliorare la qualità del materiale seminale (Contri et al., 2011).

Due o tre settimane prima dell'inizio della stagione di monta è bene aumentare progressivamente la quantità di concentrato, fino ad arrivare a circa 4.5-5.5 kg/die. Il concentrato somministrabile potrà essere quello generico per equini.

TABELLA RIASSUNTIVA

Stato fisiologico	Tipo di regime	Kg acqua * kg SS ingerita	Kg acqua *giorno e * 100 kg peso vivo
<i>Puledro svezzato in crescita</i>	Regime misto (1): foraggio+ concentrato	Da 3 a 3.5	Da 5 a 6
<i>Asina inizio gestazione</i>	Regime essenzialmente a base di foraggi	Da 3.5 a 4	Da 6 a 7
<i>Asina fine gestazione/inizio lattazione</i>	Regime misto (1): foraggio + concentrato	4.5	Da 10 a 11
<i>Asina fine lattazione</i>	Regime essenzialmente a base di foraggi	4	Da 9 a 10
<i>Stallone in attività</i>	Regime misto (1): foraggio + concentrato	4	Da 8 a 9

Tab. 1. Schema alimentare equini riassuntivo (Paolini et al., 2000)

Bibliografia

1. Contri A., De Amicis I., Molinari A., Faustini M., Gramenzi A., Robbe D., Carluccio A. (2011). Effect of dietary antioxidant supplementation on freshsemenquality in stallion. *Theriogenology.*; 15;75(7):1319-26.
2. Koterba A.M., Drummond W.H., Kosch P.C. (1990). *Equine ClinicalNeonatology.* Lea &Febiger Ed.
3. Paolini S., Rispoli R., Salvatelli F., Tomassini F., Ronchi B. (2000). *Manuale di alimentazione del cavallo.* Corso di alimentazione dei monogastrici. Università degli Studi della Tuscia (Viterbo).



REGIONE PUGLIA

Dipartimento Agricoltura,
Sviluppo Rurale e Tutela dell'Ambiente.
Sezione Gestione Sostenibile,
Tutela delle Risorse Naturali e Forestali.
Servizio Valorizzazione e Tutela
delle Risorse Naturali e Biodiversità



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI TERAMO



Finito di stampare
nel mese di febbraio 2019
per conto della
Koinè Comunicazione - Foggia



REGIONE PUGLIA

Dipartimento Agricoltura,
Sviluppo Rurale e Tutela dell'Ambiente.
Sezione Gestione Sostenibile,
Tutela delle Risorse Naturali e Forestali.
Servizio Valorizzazione e Tutela
delle Risorse Naturali e Biodiversità