

# VALUTAZIONE DI UN TEST COMMERCIALE DI GRAVIDANZA PER LA CAGNA

ADA ROTA\*, A. MOLLO\*, A. STARVAGGI CUCUZZA\*\*, L. VINCENTI\*

\*Istituto di Patologia e Igiene Veterinaria - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Padova

\*\*Dipartimento di Patologia Animale - Facoltà di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Torino

## Riassunto

Il "Reprochek Relaxin®", prodotto dalla "Synbiotics Corporation" (USA) e distribuito in Italia dalla ditta "Merial", è un test di gravidanza della cagna che si basa sulla rilevazione della relaxina, ormone specifico dello stato gravidico. Il test è stato eseguito su 40 soggetti, trascorse almeno 3 settimane dall'accoppiamento. L'esame è risultato attendibile dopo il 25° giorno dall'accoppiamento: anche se non si può quindi considerare un metodo di diagnosi precoce, il test è interessante soprattutto per la specificità e la semplicità di esecuzione.

## Summary

"Reprochek Relaxin®", produced by "Synbiotics Corporation" (USA), is a dog pregnancy test. It picks up relaxin in the blood, a specific pregnancy hormone. 40 subjects were tested, at least 3 weeks after mating. The test was reliable when carried out at least 25 days after mating. Although it cannot be considered an early pregnancy test, it is above all valuable because of its specificity and ease of execution.

## INTRODUZIONE

I proprietari dei cani frequentemente gradirebbero che la gravidanza dei propri animali potesse essere diagnosticata poco dopo l'accoppiamento, ma in effetti non esiste un metodo che consenta in questa specie di accertare lo stato gravidico prima della fine della terza settimana, quindi in pratica alla fine del primo terzo della gestazione. È noto che in questo stadio la gravidanza può essere accertata clinicamente, mediante semplice palpazione bi-manuale dell'addome oppure con esame ecografico. Recentemente è stato immesso in commercio un test di gravidanza per la cagna, "Reprochek Relaxin®", prodotto dalla "Synbiotics Corporation" (USA) e distribuito in Italia dalla ditta "Merial". Il test si basa sulla rilevazione della relaxina, ormone specifico della gravidanza, che nella cagna risulta prodotto da placenta, corpo luteo e ghiandola mammaria (Tsutsui et al., 1991; Goldsmith et al., 1994). La relaxina concorre al mantenimento della gravidanza impedendo le contrazioni dell'utero e stimolandone lo sviluppo, in modo da consentire l'alloggiamento fetale. Essa inoltre, insieme a estrogeni e progesterone, predispone al parto l'apparato riproduttivo. La concentrazione plasmatica della relaxina diventa dosabile dalla fine della terza settimana di gravidanza, raggiunge il valore massimo alla quinta settimana e diminuisce poi lentamente, fino a 7-8 settimane dopo il parto (Steinetz et al., 1989).

Poiché si tratta del primo test specifico di laboratorio disponibile per la cagna, si è deciso di valutarne limiti e convenienza di impiego.

## MATERIALI E METODI

La prova è stata eseguita su 40 soggetti di età, razza e taglia diversa; agli animali è stato prelevato almeno 1 ml di sangue, posto in provette contenenti litio-eparina e centrifugato per separarne il plasma. Contemporaneamente al prelievo di sangue ogni animale è stato sottoposto ad esame ecografico e poi seguito per accertarne definitivamente lo stato.

In Tabella 1 si riporta, in corrispondenza del numero degli esami eseguiti, il tempo della presunta gravidanza in cui sono stati prelevati i campioni di sangue.

**Tabella 1**  
Campioni esaminati e momento del prelievo

N° campioni	Giorni dall'accoppiamento
5	21-24
16	25-26
19	≥27

Il kit commerciale che si è utilizzato è il "Reprochek Relaxin®" della "Synbiotics Corporation" (USA), che può rilevare la presenza di relaxina sia nel sangue intero che nel plasma della cagna. L'esame è di tipo immunoenzimatico, secondo la tecnica ELISA ("Enzyme-Linked Immunosorbent Assay") a "sandwich": l'antigene relaxina eventualmente presente nel campione viene rilevato perché si lega a un anticorpo policlonale di coniglio, adsorbito alle pareti del pozzetto, ed il complesso che si forma viene fatto reagire con un anticorpo monoclonale canino marcato con una perossidasi. L'enzima determina una reazione colorimetrica quando si aggiunge l'apposito substrato. I campioni positivi assumono colore azzurro, apprezzabile direttamente, ma la lettura dei risultati può anche avvenire mediante spettrofotometro. Per verificare il corretto funzionamento del test è necessario ogni volta comprendere nell'esame il controllo positivo e quello negativo, forniti nel kit: per questo motivo il numero dei test che possono essere eseguiti con un kit varia da 16, se si analizza un solo campione per volta, fino a un massimo di 40, se eseguiti tutti contemporaneamente. Per la nostra prova sono stati necessari due kit ed i risultati sono stati letti direttamente.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

Come si può vedere in Tabella 2, quando il test viene eseguito dopo il 25° giorno dall'accoppiamento, il risultato concorda con l'esito dell'esame ecografico, ed è confermato anche dalla successiva osservazione clinica del soggetto. Se invece il test è effettuato più precocemente, l'esito negativo non è certo: pur considerando l'esiguità del numero di campioni da noi esaminati tra 21° e 24° giorno, si deve comunque notare che si sono avuti ben 2 risultati falsamente negativi, pari cioè al 40% del totale.

Il kit diagnostico "Reprochek Relaxin®" è commercializzato come test di diagnosi precoce di gravidanza, anche se in effetti le indicazioni portano come limite inferiore il 21° giorno successivo all'accoppiamento; inoltre un eventuale esito negativo in questo stadio deve essere confermato da un esame successivo perché, come precisato anche nelle informazioni sul prodotto, è possibile che la quantità di relaxina sia ancora inferiore al valore soglia del test, pari a 10 ng/ml.

Dalle nostre osservazioni sembrerebbe più prudente attendere il 25° giorno e quindi, a maggior ragione, il metodo non può definirsi "precoce". Ovviamente queste valutazioni tecniche prescindono dal giudizio sull'effettiva necessità di una diagnosi precoce. In effetti avrebbe rilevante utilità clinica una diagnosi assai più precoce delle tre settimane, cioè nei giorni immediatamente seguenti il concepimento,

per permettere eventualmente di intervenire con un trattamento abortivo mirato e non alla cieca, in caso di gravidanza non voluta. Diversamente, l'utilità di una diagnosi a 21 anziché a 25 o 26 giorni è dubbia.

Più interessante risulta il fatto, già sottolineato precedentemente, che si tratta in effetti del primo test specifico di gravidanza per la cagna. Vale rammentare al riguardo che nel cane non è possibile differenziare diestro e gravidanza mediante dosaggio di progesterone o prolattina, i cui valori non differiscono in modo significativo in queste due evenienze. Non validi anche diversi esami del sangue basati sulla misurazione delle "proteine della fase acuta", proteine che agiscono come mediatori dell'infiammazione e forse come modulatori della risposta immunitaria; tali proteine aumentano sia in gravidanza, probabilmente come risposta immunitaria all'annidamento delle blastocisti in utero, sia in caso di infezioni (per esempio piometra) o di stati infiammatori (Eckersall, 1993). Come già ricordato, la relaxina è invece specifica dello stato gravidico.

Riguardo alla lettura diretta dell'esito del test, la colorazione azzurra assunta dai campioni positivi è stata sempre ben evidente, ed aumenta di intensità con l'aumentare della concentrazione di relaxina, quindi con l'avanzare della gravidanza. Alcuni campioni negativi hanno assunto una lieve colorazione azzurra, meno intensa però del controllo positivo.

Resta da aggiungere che il costo del test, al momento in cui scriviamo, può variare da circa 10.000 lire a poco più del doppio, a seconda del numero di esami eseguibili contemporaneamente. In realtà, almeno così è stato nella nostra esperienza, è poco frequente l'eventualità di disporre di più campioni contemporaneamente, ed è da tenere in conto che il kit, conservato alla temperatura di  $5\pm 3^\circ\text{C}$ , ha durata piuttosto limitata, di circa 12 mesi.

Si deve infine notare che nelle istruzioni del "Reprochek Relaxin" è chiaramente indicata la necessità di non utilizzare EDTA come anticoagulante: tale sostanza interferirebbe infatti con il funzionamento del test, potendo determinare risultati falsamente positivi. Gli esperti della Synbiotics, da noi interpellati, non ci hanno saputo definire esattamente quale sia il meccanismo che porta a tale risultato. La necessità poi di eseguire il test su plasma anziché su siero deriva dal fatto che nel plasma vi sarebbe una concentrazione maggiore di relaxina e l'impiego del siero, sempre a detta degli esperti della casa produttrice, potrebbe portare a risultati falsamente negativi.

Concludendo, in considerazione della specificità, del costo contenuto e della facilità di esecuzione, si ritiene che il test possa avere spazi di impiego a conferma o in alterna-

**Tabella 2**  
Confronto tra l'esito del test e dell'esame ecografico

N° campioni	Giorni dall'accoppiamento	Ecografia		Test	
		positiva	Negativa	Positivo	negativo
5	21-24	4	1	2	3
16	25-26	12	4	12	4
19	≥27	12	7	12	7

tiva a un esame ecografico, ed essere di più conveniente utilizzazione in un laboratorio di analisi veterinarie anziché nel generico ambulatorio.

### Parole chiave

*Cane, gravidanza, diagnosi test.*

### Key words

*Dog, pregnancy, diagnosis test.*

### Bibliografia

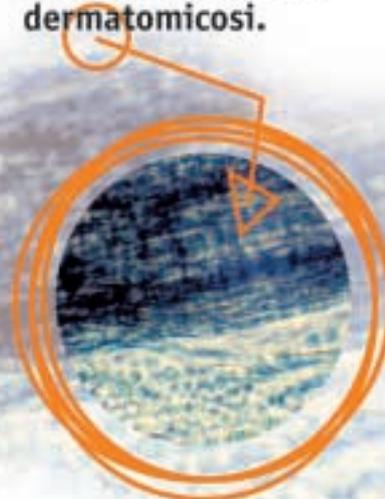
- Eckersall P.D., Harvey M.J., Ferguson J.M., Renton J.P., Nickson D.A., Boyd J.S. (1993) Acute phase proteins in canine pregnancy (*Canis familiaris*). *J. Reprod. and Fert. Suppl.* 47: 159-164.
- Goldsmith L.T., Lust G., Steinetz B.G. (1994) Trasmissione di relaxin from lactating bitches to their offspring via suckling. *Biol. of Reprod.* 50: 258-265.
- Steinetz B.G., Goldsmith L.T., Harvey H.J. (1989) Serum relaxin and progesterone concentration in pregnant, pseudopregnant, and ovariectomized, progestin-treated pregnant bitches: detection of relaxin as a marker of pregnancy. *Am.J.Vet.Res.* 50(1): 68-71.
- Tsutsui T., Stewart D.R. (1991) Determination of the source of relaxin immunoreactivity during pregnancy in the dog. *J.Vet.Med.Sci.* 53(6): 1025-1029.

# il trattamento delle dermatomicosi

## Soluzione antimicotica

Indicato per il trattamento ed il controllo delle dermatomicosi.

marchio registrato



**Disponibile in farmacia**

confezione da 100 ml



**JANSSEN-CILAG** SpA

**Milano**

Via Michelangelo Buonarroti, 23 • 20093  
Cologno Monzese • Tel. 0225101 - Fax 0226708196