Zeitschrift: Schweizer Archiv für Tierheilkunde SAT : die Fachzeitschrift für Tierärztinnen und Tierärzte = Archives Suisses de Médecine Vétérinaire ASMV : la revue professionnelle des vétérinaires

Herausgeber: Gesellschaft Schweizer Tierärztinnen und Tierärzte

Band: 98 (1956)

Heft: 1

Artikel: Le reazioni di gravidanza negli animali

Autor: Cuboni, E.

DOI: https://doi.org/10.5169/seals-589155

Nutzungsbedingungen

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. Mehr erfahren

Conditions d'utilisation

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. En savoir plus

Terms of use

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. Find out more

Download PDF: 11.08.2025

ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, https://www.e-periodica.ch

Zusammenfassung

Im Zusammenhang mit dem Ergebnis eines kreuzweisen Immunisierungsversuches wird festgestellt, daß bisher in der Schweiz der Beweis des Vorkommens einer neuen immunologischen Variante des Schweinepestvirus noch nicht erbracht wurde.

Résumé

On constate, à l'occasion d'un essai d'immunisation croisée, que l'on n'a pas encore pu apporter la preuve, en Suisse, de l'existence d'une nouvelle variante immunologique du virus de la peste porcine.

Riassunto

In relazione col risultato di un esperimento immunizzante crociato è certo che finora in Svizzera non è stata ancora fornita la prova circa la presenza di una variante immunologica del virus della peste suina.

Summary

A crossing immunization experiment demonstrated that up to now there is no proof of a new immunological variant of hog cholera virus in Switzerland.

Literatur

Hupbauer A.: Zeitschrift für Inf.Krankh. 45, 294, 1934. – Dale C. N. und Mitarbeiter: J. Americ. Vet. Med. Assoc. 118, 279, 1951. – Koprowski H.: Veterinary Medicine 47, 144, 1952. – Lucas H.: Rec. méd. vét. 129, 18, 1953. – Kilchsperger G.: D.T.W. 50, 388, 1951. – Geiger W. in Handbuch für Viruskrankheiten. Gildemeister, Hagen und Waldmann, Verlag Gustav Fischer, Jena 1939.

Dall'Istituto Sieroterapico Milanese S. Belfanti, Milano

Le reazioni di gravidanza negli animali[1]

Prof. E. Cuboni

Ritengo superfluo spendere molte parole per fare presente l'utilità delle prove di laboratorio per l'accertamento della gravidanza. È cognizione comune che, nel caso della cavalla, la specie animale in cui l'aiuto del laboratorio riesce particolarmente valido per la diagnosi di gravidanza, la diagnosi si può fare *all'inizio* con l'esame clinico, e cioè mediante l'esplorazione rettale, ma questa indagine richiede un'esperienza che si può acquisire solamente con un lungo tirocinio e dev'essere conservata con l'esercizio con-

[1] Relazione tenuta alla Riunione annuale della Società dei Veterinari Svizzeri, a Lugano (24 settembre 1955).

tinuato, cioè non trascurando di eseguire spesso e ripetutamente le esplorazioni rettali, a scopo diagnostico; d'altra parte l'esplorazione rettale delle cavalle è spesso poco gradita dai proprietari che, a torto o a ragione, temono che possa causare l'aborto. Infine si tratta di un esame che può riuscire un poco pericoloso quando si esaminino cavalle irrequiete. Questo per la diagnosi della gravidanza all'inizio. Quando poi *la gestazione è progredita*, non si deve ritenere che la diagnosi sia – sempre nella cavalla – particolarmente facile. Sono un laboratorista e quindi non ho esperienza personale di diagnosi clinica di gravidanza nella cavalla, ma posso dire che mi sono stati mandati non pochi campioni di urina di cavalla per la reazione diagnostica proprio quando la gestazione (esistente o solamente sospettata) volgeva al termine, prova evidente dell'incertezza, spesso del resto dichiarata nelle lettere accompagnatorie, sul reale stato dell'animale a gravidanza molto inoltrata.

Che l'applicazione di metodi di laboratorio valevoli ad accertare la gravidanza sia effettivamente desiderabile, perchè utile in pratica, è indubbiamente comprovato dal fatto che da molto tempo si è cercato di individuare modificazioni della composizione chimica o dei caratteri fisico-chimici dell'urina, del siero di sangue (per le bovine anche del latte) atte a dimostrare l'esistenza della gravidanza. Si può dire che l'origine di questi tentativi di fare la diagnosi di gravidanza col solo esame dell'urina, evitando l'esame dell'apparato genitale e dei suoi annessi – sia per la donna che per gli animali domestici – si perdono nei tempi più lontani; basti dire che se ne parla perfino in un antico papiro egiziano! Noi però non sprecheremo il tempo per esporre la storia di queste prove, tutte più o meno empiriche, talune addirittura cervellotiche, le quali sono state numerosissime, ma complessivamente infruttuose, in quanto nessuna ha resistito al collaudo dell'applicazione su larga scala nella pratica. E non sorprende che sia stato così, perché tutte le prove proposte in passato, denominate con un'espressione significativa «metodi non specifici di diagnosi della gravidanza» erano basate su modificazioni dei caratteri dell'urina o del sangue, presenti talvolta *anche quando la gravidanza non esisteva*. Una svolta, un cambiamento radicale si ebbero dopo il 1925, l'anno in cui, ad opera di Aschheim e Zondek, furono scoperti gli ormoni sessuali: sulla base di queste nuove conoscenze si introdusse la diagnosi di laboratorio della gravidanza mediante la dimostrazione – nel sangue o nell'urina – di quegli ormoni sessuali che, se la gravidanza non c'è, o non si trovano nei liquidi organici anzidetti o vi sono presenti in quantità praticamente trascurabili. È evidente infatti che se un determinato ormone sessuale non esiste mai nell'urina o nel sangue di una femmina non gravida, mentre vi si trova sempre durante la gestazione, l'accertamento della presenza di esso equivale all'accertamento della gravidanza.

Per potere conoscere le reazioni di gravidanza basate sulla dimostrazione degli ormoni sessuali è indispensabile stabilire anzitutto alcuni dati fondamentali e cioè definire quali sono gli ormoni sessuali che interessano

ai fini diagnostici e quali sono le modalità con cui se ne può dimostrare la presenza nel sangue e nell'urina.

Non tutti gli ormoni sessuali femminili vengono utilizzati per le reazioni di gravidanza. Attualmente si ricercano, a questo scopo, le gonadotropine e gli ormoni ovarici estrogeni.

Le gonadotropine o prolani sono ormoni elaborati dal lobo anteriore della ipofisi, che è la sede di produzione di diversi ormoni che hanno tutti la proprietà di «dirigere» la funzione di ghiandole endocrine lontane dall'ipofisi stessa; ora le gonadotropine sono appunto uno di questi «ormoni direttori». Le gonadotropine infatti hanno la proprietà di stimolare la funzione delle ghiandole sessuali maschili e femminili, cioè di stimolare la funzione delle gonadi; questo fatto appare in modo evidente all'epoca della pubertà. Durante la gravidanza le gonadotropine vengono prodotte non più dalla sola ipofisi, ma anche e forse prevalentemente dalla placenta. Va notato a questo proposito che è stata accertata la presenza delle gonadotropine nella placenta della cavalla e della topina, ma questi ormoni non sono stati trovati invece nella placenta della vacca, pecora, scrofa, coniglia e cavia; ignoriamo completamente la causa di questa differenza di comportamento, ma non ce ne meravigliamo perchè nel campo degli ormoni sessuali vi sono profonde differenze da specie a specie circa la presenza, l'epoca di comparsa e di scomparsa dal sangue e dall'urina, ecc. degli ormoni sessuali. È un fatto curioso che, malgrado queste diversità di comportamento, sussiste per tutti gli ormoni sessuali la legge della «aspecificità di specie» per cui ad esempio le gonadotropine ricavate dalla cavalla esplicano la loro azione sulla donna, coniglia, ratta, ecc. vale a dire su animali appartenenti a specie diverse e lontane da quella dell'animale fornitore delle gonadotropine. Vi sarebbe molto da dire sui caratteri e sulle proprietà delle gonadotropine, ma, per amore di brevità, ci limitiamo a ricordare quanto ci interessa direttamente per le nostre finalità, cioè per l'impiego delle gonadotropine come rivelatrici della gravidanza. Le gonadotropine sono sostanze di natura proteica, idrosolubili, termolabili, cronolabili, insomma sono sostanze poco resistenti.

Ed ora qualche parola sull'altra categoria di ormoni sessuali la cui dimostrazione serve per stabilire la diagnosi di gravidanza e cioè qualche parola sugli *ormoni ovarici estrogeni*. Questi ormoni, chiamati anche ormoni ovarici follicolari e talvolta semplicemente «follicolina», si formano nell'interno dei follicoli ovarici e svolgono diverse funzioni – caratteristica è quella di influenzare i cosiddetti «caratteri sessuali secondari» i quali danno all'animale l'aspetto esteriore tipico del proprio sesso. Per quanto concerne la diagnosi della gravidanza, interessa ricordare che gli ormoni estrogeni provocano nelle topine e rattine impuberi o adulte e castrate, la comparsa delle modificazioni cicliche dell'apparato genitale corrispondenti alle manifestazioni dell'estro o calore. Gli ormoni estrogeni sono steroidi (dunque nella loro molecola manca l'azoto), sono insolubili in acqua e solubili invece nei solventi dei grassi, sono molto resistenti al calore ed all'invecchiamento,

danno reazioni chimiche colorate caratteristiche. Queste proprietà degli ormoni estrogeni sono, come si vede, completamente diverse da quelle delle gonadotropine. Se dunque *due* sono i tipi di ormoni sessuali che si possono cercare nel sangue o nell'urina a scopo diagnostico e se questi due tipi di ormoni hanno proprietà e caratteri distintivi profondamente dissimili, è ovvio che *due* saranno anche i tipi delle reazioni di gravidanza: le une saranno basate sulla dimostrazione delle gonadotropine, le altre sulla dimostrazione degli ormoni ovarici estrogeni. Si conoscono altri ormoni sessuali femminili oltre ai due di cui si è parlato sin qui: la *relaxina*, che determina il rilasciamento della sinfisi pubica nella cavia durante la gravidanza ed il *progesterone* o ormone del corpo luteo che provoca quelle modificazioni dell'endometrio che permettono l'annidamento dell'ovulo fecondato. Ma nè la relaxina, nè il progesterone hanno trovato impiego ai fini della diagnosi di laboratorio della gravidanza. Per completezza vorrei ricordare, a proposito del progesterone, che la determinazione quantitativa nell'urina della donna di un suo derivato (il pregnandiolo) è stata largamente sperimentata per la diagnosi di gravidanza. I risultati sono stati, sempre per la donna, in parte favorevoli e in parte sfavorevoli, ma io mi domando se non potrebbero essere migliori in medicina veterinaria, almeno per quelle specie – come la specie bovina e forse anche la specie suina – in cui il caratteristico comportamento che assume in qualche caso il corpo luteo (corpo luteo persistente, causa di sterilità) fa sospettare che la sua attività ormonale diversifichi in qualche modo da quella del corpo luteo delle altre specie animali.

*

Abbiamo dunque, fin qui, ricordato i caratteri fondamentali degli ormoni sessuali; abbiamo visto che due sono le categorie che ci interessano ai fini diagnostici (gonadotropine e ormoni ovarici estrogeni); abbiamo concluso che devono esserci – come in realtà ci sono – due gruppi distinti di reazioni di gravidanza, basati rispettivamente uno sulla dimostrazione delle gonadotropine e l'altro sulla dimostrazione degli ormoni estrogeni. Ora dobbiamo prendere in considerazione *i modi* con cui è possibile rivelare la presenza sia delle gonadotropine che degli ormoni estrogeni in un liquido qualsiasi ed in particolare nel sangue e nell'urina.

Le gonadotropine si possono dimostrare esclusivamente con prove biologiche, dato che, malgrado i molti tentativi, non si sono ancora trovate reazioni chimiche atte a rivelarle (non dimentichiamo che si tratta di sostanze proteiche). Le reazioni biologiche delle gonadotropine sono numerose, perchè numerosi sono i fenomeni con cui si manifesta l'azione di esse nelle diverse specie animali; a scopo diagnostico però si usano – in pratica – solamente tre reazioni biologiche: 1) la prova sulla topina o rattina impubere, in cui le gonadotropine del siero di cavalla gravida provocano un forte aumento del peso e del volume delle ovaie e qualche volta anche la

comparsa di piccole emorragie o Blutpunkte (reazione di Aschheim-Zondek); 2) la prova sulla coniglia adulta in cui le gonadotropine fanno comparire evidenti emorragie dentro i follicoli ovarici (reazione di Friedman); 3) la prova sui maschi di rana e di rospo, in cui le gonadotropine provocano la fuoriuscita degli spermatozoi dai testicoli e la loro comparsa nel liquido cloacale (reazione di Galli-Mainini). Dobbiamo aggiungere che la presenza delle gonadotropine si può dimostrare anche iniettando il liquido in esame nei polli giovani, perché in essi le gonadotropine provocano modificazioni manifeste dei testicoli e delle ovaie.

Gli *ormoni ovarici estrogeni*, a differenza delle gonadotropine, si possono dimostrare non solo con prove biologiche, ma anche con prove chimiche. Le prove biologiche sono molto più sensibili di quelle chimiche e permettono di rivelare quantità anche minime di ormoni estrogeni; però sono più lunghe, più costose e complesse, meno esatte. Vediamo in che cosa esse consistono. Nelle topine e nelle ratte il secreto vaginale va incontro a modificazioni periodiche in corrispondenza dell'estro; all'acme dell'estro infatti compaiono in esso tipiche cellule piatte anucleate (le Schollen degli AA. tedeschi). Ma la comparsa delle Schollen manca nelle tope e ratte impuberi, come pure cessa nelle tope e ratte adulte, se vengono castrate. Ora, se si iniettano gli ormoni estrogeni nelle tope o ratte adulte castrate (prova di Allen e Doisy) oppure in topine e rattine impuberi, compaiono le cellule piatte nel secreto vaginale; di qui la possibilità di accertare la presenza degli ormoni estrogeni in un liquido, iniettandolo o nelle tope e ratte adulte ovariectomizzate o nelle topine e rattine impuberi e poi esaminando al microscopio l'aspetto del secreto vaginale. Ora dovremmo dire dei metodi chimici per la dimostrazione degli ormoni estrogeni; per evitare ripetizioni ne parleremo invece fra poco, quando descriveremo una reazione di gravidanza per la cavalla basata sull'impiego di questi metodi chimici.

Abbiamo dunque raccolto fin qui gli elementi indispensabili per comprendere come si possono attuare le reazioni di gravidanza: sappiamo quali sono gli ormoni che a tal fine interessano, sappiamo come si fa per riconoscerli ed individuarne la presenza nel sangue e nell'urina.

Anzichè esporre qui – con criterio rigorosamente scolastico – un elenco di tutte le diverse reazioni di gravidanza basate sulla ricerca ormonale, che sono state finora proposte, preferisco limitarmi a dire quanto di realmente e sicuramente applicabile in pratica si è acquisito fino ad oggi in questo settore. Vorrei quindi ora da un lato indicare il modo in cui si eseguono le più importanti reazioni di gravidanza, quelle entrate nell'uso e che non presentano vere difficoltà per chi voglia eseguirle direttamente e dall'altro fissare chiaramente le modalità ed i risultati dell'impiego pratico a scopo diagnostico, vale a dire l'epoca della gravidanza in cui queste reazioni si possono eseguire, le modalità di raccolta del materiale (sangue o urina), il grado di sicurezza delle risposte, cioè il margine di errore, ecc.

La possibilità di fare la diagnosi di gravidanza mediante la ricerca degli ormoni sessuali è stata studiata per tutte le specie di animali domestici, ma solamente per la specie equina (cavalla, asina) si sono conseguiti risultati di sicuro valore pratico; per la specie bovina si è arrivati a risultati applicabili sì, ma con le riserve che diremo più avanti; per le altre specie non si sono ancora trovate reazioni di gravidanza veramente attendibili ed utili. Ricordo, perchè compiute in Svizzera, le ricerche di Butsch sulla reazione di gravidanza ormonale nella cagna. Passiamo dunque ad esaminare come stanno le cose nella specie equina e nella specie bovina.

Gonadotropine, da un lato; ormoni ovarici estrogeni, dall'altro. Questi sono i due tipi di ormoni da cercare nel sangue e nell'urina. Vediamo anzitutto quando questi ormoni compaiono e, rispettivamente, scompaiono dal sangue e dall'urina della cavalla gravida. Per le *gonadotropine* vi sono – ed è naturale che sia così – variazioni individuali nel momento della comparsa nel sangue; in più il metodo biologico che è l'unico con cui si possono dimostrare le gonadotropine, non è così rigorosamente esatto come una reazione chimica e perciò anche per un medesimo liquido in esame, i risultati della ricerca delle gonadotropine possono variare un poco da uno sperimentatore all'altro. Ciò spiega perché per la data di comparsa delle gonadotropine nel sangue della cavalla gravida si fissa un periodo e non un giorno; si dice infatti in generale che le gonadotropine diventano evidenti nel sangue fra il 42° ed il 50° giorno dopo l'ultimo salto. Praticamente possiamo ritenere questo: dopo il 50° giorno dal salto si trovano nel sangue le gonadotropine, che vi restano oltre il compimento del 4°–5° mese. Nello stesso periodo le gonadotropine compaiono anche nell'urina, ma in quantità così piccola, che la dimostrazione di esse è troppo scomoda perchè si possa pensare ad eventuali applicazioni pratiche diagnostiche. Il passaggio delle gonadotropine nell'urina da me dimostrato per la cavalla nel 1949 è stato confermato per la cavalla e per l'asina da Olivo nel 1953. Gli *ormoni estrogeni* si trovano nel sangue pressappoco nello stesso periodo in cui ci sono le gonadotropine ma, a differenza delle gonadotropine, essi passano nell'urina. Dapprima passano in piccola quantità – dalla fine del 3° mese alla fine del 4° mese – ma successivamente cioè dopo il 120° giorno dal salto gli ormoni estrogeni raggiungono nell'urina della cavalla gravida concentrazioni così elevate che è facile dimostrarli non solo con le prove biologiche, ma persino con le prove chimiche, molto meno sensibili. Gli ormoni estrogeni rimangono nell'urina fin verso la fine della gravidanza, ma è molto importante ricordare che negli ultimi 7–15 giorni prima del parto *possono scomparire o quasi dall'urina*. Non si deve dimenticare che gli ormoni estrogeni possono comparire nell'urina della cavalla anche all'infuori della gravidanza e precisamente: 1) durante il calore, ma in quantità così piccole che non vengono neppure rivelate dalle reazioni chimiche; 2) quando esistono malattie dello apparato genitale; 3) nell'urina degli stalloni.

In conclusione: nella cavalla gravida ci sono le *gonadotropine nel sangue*

dal 50° giorno (forse anche un poco prima) al 120° giorno e ci sono gli *ormoni ovarici estrogeni nell'urina* dal 120° giorno fino quasi al momento del parto. È evidente dunque che, a scopo diagnostico, si devono cercare le gonadotropine nel sangue dal 55° (è bene aspettare 5 giorni dopo il termine medio di comparsa delle gonadotropine) al 120° giorno e gli ormoni estrogeni nell'urina dopo il 120° giorno.

Vi sarebbe anche la possibilità di cercare gli ormoni estrogeni nell'urina dal 90° al 120° giorno invece di cercare – in tale periodo – le gonadotropine nel sangue – ma si preferisce in generale quest'ultima prova, perchè la scarsità degli ormoni estrogeni nell'urina obbliga a ricercarli con le prove biologiche e la tossicità dell'urina è sovente causa di morte nelle topine e rattine impuberi in questo genere di prove.

In pratica quindi abbiamo, per la cavalla, «la reazione precoce mediante ricerca delle gonadotropine nel siero» e la «reazione tardiva, mediante ricerca degli ormoni estrogeni nell'urina».

Per la *reazione precoce sul sangue* esistono tre procedimenti: la prova sulla topina o rattina impubere o reazione di Aschheim-Zondek-Kuest e la prova sulla coniglia adulta o reazione di Friedman che sono ugualmente idonee allo scopo e la prova sui maschi di rospo o rana o reazione di Galli Mainini che è molto più economica e rapida, ma non dà risultati così sicuri come quelli delle altre due anzidette. Abbiamo già detto che nella reazione di Aschheim-Zondek il risultato positivo è contrassegnato dall'aumento di peso e volume delle ovaie, con l'eventuale presenza dei Blutpunkte, che nella reazione di Friedman si hanno grosse emorragie nelle ovaie, che nella prova di Galli-Mainini compaiono spermatozoi nel liquido cloacale. Ora è necessario definire: da quale momento della gestazione si può cominciare a prelevare sangue per queste reazioni? Rispondiamo subito: dopo 55 giorni dall'ultimo salto, cioè 5 giorni dopo il termine generalmente ammesso per la comparsa delle gonadotropine nel sangue, termine che è al 50° giorno, come si è detto. Bisogna ricordare che fra il 42° e il 55° giorno si può – se c'è particolare urgenza – fare queste prove, ma bisogna informare i proprietari che il risultato ha valore solo se è positivo, mentre se è negativo la prova va ripetuta al 55° giorno o più tardi.

Altra domanda: quando diventa *troppo tardi* per eseguire queste prove sul sangue? rispondiamo: alla fine del 4°–5° mese e, in pratica, al 120° giorno dopo l'ultimo salto, momento in cui non conviene più esaminare il sangue, essendo molto più comodo ed economico fare la prova sull'urina di cui parleremo fra breve. Altra domanda ancora: possono le reazioni precoci sul sangue risultare falsamente negative o falsamente positive? quale è la percentuale di errore che si ammette per queste prove? sì, possono risultare falsamente negative se si eseguono troppo presto (prima del 55° giorno) o troppo tardi (dopo il 120° giorno) ed anche nel periodo ottimale, perchè l'uno–due per cento di errore è inerente a tutte le reazioni di gravidanza

attualmente conosciute. Possono anche risultare falsamente positive, ma qui è necessario mettere bene in chiaro che è incerto se veramente possono aversi risultati positivi con sieri di cavalle non gravide; nella maggioranza dei casi invece si tratta di risultati positivi in cavalle sicuramente gravide, ma che poi abortiscono con aborto che o non viene constatato dal personale di custodia o è seguito dall'assorbimento del feto, cosicchè, mancando il parto a termine, viene ingiustamente incolpata di inesattezza la reazione di gravidanza. Vogliamo aggiungere qualche dato sulla tecnica delle reazioni precoci sul sangue. Per la prova sulla coniglia è necessario anzitutto usare coniglie adulte di 1700–2000 g e scartare assolutamente le coniglie che pesino meno di 1500 g, perché sono molto meno sensibili alle gonadotropine di quelle adulte e potrebbero dare con facilità risposte erratamente negative (esistono, al riguardo precise osservazioni di Clauberg). Il sangue della cavalla va prelevato sterilmente dalla vena giugulare (circa 100 cc), raccolto in una bottiglia bollita dopo aver scolato via bene l'acqua; poi mandato celermente al laboratorio. Insomma bisogna fare in modo che il laboratorista riceva sangue o siero non putrefatti; può essere utile ricordare che, se non interviene la putrefazione, le gonadotropine rimangono attive, nel siero conservato al fresco, per diversi mesi. Prima di iniettare il siero nella coniglia è doveroso accertare con laparotomia che le ovaie non contengano già corpi emorragici spontanei che potrebbero falsare i risultati. Se non si vuole fare l'esame laparatomico si devono isolare le coniglie una per una per almeno 30 giorni prima di usarle. L'ispezione delle ovaie nelle coniglie si può fare per via transaddominale o per via dorsale; io ho abbandonato ben presto la via dorsale, perché mi sono trovato e mi trovo bene con la laparotomia addominale, che ho eseguito in circa 20.000 coniglie (per la reazione di gravidanza nella donna e nella cavalla). Si opera in anestesia locale, incidendo lungo la linea alba; la piccola operazione dura in tutto circa 3 minuti; non è necessario applicare bendaggi e si ottengono per solito buone cicatrici lineari. Non ho esperienza del trapianto dell'ovaia nella camera anteriore dell'occhio della coniglia, procedimento che permette di seguire ininterrottamente il progredire della reazione e la formazione dei corpi emorragici. Anche se nel 1953 un Italiano (Colonna) ha confermato i buoni risultati di questo metodo, è prevedibile che esso non si potrà mai generalizzare per la poca praticità della preparazione operatoria delle coniglie e cioè del trapianto dell'ovaia nell'occhio.

Il siero si inietta endovena nella quantità di 10–15 cc; vi è chi consiglia di fare due iniezioni con intervallo di 24 ore. Non sono necessarie precauzioni speciali per l'iniezione: non c'è bisogno di riscaldare il siero a 38°, non c'è bisogno di iniettarlo lentamente; non importa nulla se il siero è un po' arrossato per avvenuta parziale emolisi. In questi ultimi anni ho sperimentato l'associazione dell'iniezione del siero di cavalla per via endovenosa e per via sottocutanea nella coniglia, estendendo l'applicazione dei risultati di Ducey, il quale nel 1950 aveva visto che l'urina di donna gravida dà

risultati positivi nella reazione di Friedman anche se iniettata alla coniglia sottocute invece che endovena come si usa generalmente. Posso dire che, nella reazione di gravidanza nella cavalla le risposte, nei casi positivi, appaiono – associando l'iniezione endovenosa con quella sottocutanea – molto evidenti. Probabilmente il lento e duraturo assorbimento di gonadotropine dal punto d'iniezione sottocutanea rinforza l'azione di quelle introdotte massivamente nelle vene e verosimilmente eliminate rapidamente, perchè questa è la sorte comune di tutte, si può dire, le sostanze immesse direttamente nel sangue.

Il risultato della reazione si legge 48 ore dopo l'iniezione del siero e se non è del tutto sicuro (basta un unico corpo emorragico in un'ovaia, perchè sia ben manifesto) si deve ripetere o col medesimo siero o, preferibilmente, con un altro campione di sangue.

Per la prova sulle rattine impuberi che ho eseguito durante la guerra in mancanza di coniglie, mi ha risposto bene questo schema: iniettare in rattine di 40–50 g con orificio vaginale chiuso (prepubertà!) cc 0,5 di siero per 6 volte in 48 ore e fare l'autopsia alla fine del terzo giorno dopo l'ultima iniezione. Si noti che questa prova richiede 5 giorni, mentre quella sulla coniglia ne richiede solamente 2. Il risultato è positivo quando le ovaie, che nei controlli pesano in media 25 mg, sorpassano i 40 mg (sovente arrivano a 150–200 mg e più).

Per la prova sui maschi di rospo o di rana, si può usare la comune rana esculenta. Bisogna individuare i maschi e iniettare il siero sottocute negli spazi linfatici (3 rane per ogni siero); la quantità da iniettare, secondo l'esperienza che ho fatto in alcune centinaia di queste prove, è bene non superi cc 0,2 per grammo di rana, perchè dosi superiori possono riuscire letali. Per evitare il reflusso del siero dal foro dell'iniezione consiglio di fare l'iniezione nel sacco linfatico ventrale, passando con l'ago attraverso il pavimento della bocca. Se il risultato è negativo dopo 3 ore, fare un secondo esame dell'urina al microscopio dopo altre 3 ore. I miei risultati non sono completamente favorevoli a questa prova che in qualche caso riesce negativa mentre la prova sulla coniglia con lo stesso siero riesce positiva; del resto questo fatto è stato riscontrato da altri ricercatori (ricordiamo Schweitzer e Bas, Tabarelli, Del Pero, Massi, Castelli, Calisti).

La prova sulla rana ha i vantaggi del minor costo e maggiore rapidità, ma dà risultati meno sicuri della prova sulla coniglia. È probabile che i risultati possano migliorare concentrando le gonadotropine mediante l'adsorbimento su caolino col metodo di Scott da me largamente usato con ottimi risultati per la concentrazione delle gonadotropine dall'urina di donna. Ho visto che questo procedimento di concentrazione delle gonadotropine risponde bene anche per le gonadotropine del siero di cavalla; così facendo però la prova sulla rana viene a perdere molto della sua semplicità e rapidità. In conclusione, non credo che in pratica ci si debba fidare – come si suol dire – a occhi chiusi della reazione di Galli-Mainini per la

diagnosi di gravidanza nella cavalla; volendo si potrebbero forse utilizzare i soli risultati positivi, riservandosi per quelli negativi di completare la prova con l'iniezione alla coniglia o alle topine e rattine.

A questo punto qualcuno potrà chiedere: quale delle tre reazioni precoci sul siero (coniglia adulta, rattina impubere, rana maschio) conviene preferire? Ecco: la prova sulla coniglia ha i vantaggi del controllo preliminare laparatomico che dà sicurezza, della facilità di lettura dei risultati, della rapidità della risposta, della facilità di procurarsi gli animali. Per la prova sulle topine o rattine si sente ripetere che ha il vantaggio del minor costo; forse ciò è vero in Germania, ma in Italia la differenza col costo della prova sulla coniglia non è molto grande. Quanto alla prova sui maschi di rana io non mi sento di consigliarla, a causa della possibilità di risposte sbagliate, a meno, come si è detto, di limitarsi ad accettare i soli risultati positivi.

Per la *reazione sull'urina dopo il 120° giorno*, basata sulla ricerca non più delle gonadotropine, ma bensì degli ormoni estrogeni, non c'è bisogno di ricorrere alle prove sugli animali, ma basta semplicemente determinare la presenza di detti ormoni mediante adatte reazioni chimiche. Sono stati proposti, a questo scopo, due procedimenti che partono entrambi dalla stessa osservazione fondamentale fatta da Wieland, Straub, Dorfmueller nel 1929. Questi AA. hanno constatato che se si trattano gli ormoni estrogeni con acido solforico concentrato a caldo, l'acido solforico assume una caratteristica fluorescenza verde. Successivamente (1931) Kober ha osservato che se si aggiunge acqua distillata all'acido solforico diventato fluorescente, compare una colorazione rosso-mattone di breve durata, la quale è strettamente specifica per la follicolina, mentre anche altre sostanze danno la fluorescenza verde dopo il solo trattamento con acido solforico a caldo. La colorazione rossa che compare nella prova di Kober è proporzionale alla concentrazione della follicolina nel liquido in esame. Dunque si tratta di due reazioni di cui una (la reazione di Wieland, Straub e Dorfmueller) è semplicemente qualitativa e l'altra (la reazione di Kober) è quantitativa. In ordine di tempo fu applicata per prima la reazione di Wieland, Straub e Dorfmueller e fui io stesso che la utilizzai nel 1934 per la diagnosi di gravidanza della cavalla; il procedimento consiste semplicemente nell'estrarre, mediante benzolo o toluolo, la follicolina dall'urina, aggiungere all'estratto benzolico o toluolico dell'acido solforico che, a sua volta, estrae dall'estratto benzolico o toluolico la maggior parte delle sostanze disciolte ed in particolare la follicolina se è presente; si procede raccogliendo l'acido solforico e riscaldandolo per vedere se compare la fluorescenza verde caratteristica, la quale denuncia la presenza di follicolina. In seguito, nel 1938, Kober applicò la sua reazione per la diagnosi di gravidanza nella cavalla; egli determinò la quantità di follicolina che si trova nell'urina delle cavalle gravide, e, col suo procedimento, misurò poi la quantità di follicolina che si trovava nelle singole urine in esame, accertando caso per caso se tale

quantità era sufficiente per far giudicare la cavalla gravida o no. Il metodo Kober presenta il grave inconveniente della complessità, la quale va a scapito della praticità; perchè la prova colorimetrica possa venire eseguita bisogna infatti che la follicolina sia completamente libera dalle impurità che l'accompagnano inevitabilmente quando la si estrae dall'urina. Di qui la necessità di lunghe e laboriose purificazioni, con l'uso di reagenti che sono instabili e vanno rinnovati spesso; in più la lettura dei risultati richiede l'impiego di un colorimetro fotoelettrico e, trattandosi di una colorazione che scompare in pochi minuti, la lettura va fatta rapidamente e non ammette una revisione di controllo. Dopo le prove dello stesso Kober e quelle di un altro sperimentatore (Mayer, 1944) che – come lui – ha ottenuto risultati ottimi, non conosco lavori di altri che abbiano applicato il metodo Kober a scopo diagnostico pratico.

Più usata, in pratica, è invece la reazione chimico-ormonale in cui si utilizza la semplice reazione qualitativa di Wieland, Straub e Dorfmueller. Anche qui possiamo chiederci: a quale distanza dall'ultimo salto si può avere un risultato attendibile dalla reazione chimico-ormonale? L'esperienza insegna che bisogna lasciare passare almeno 120 giorni e, se non c'è urgenza, anche 130–135 giorni. È ovvio che sarebbe preferibile avere risposte sicure già prima di questa data; d'altra parte si sa che fra il 90° e il 120° giorno la cavalla gravida elimina follicolina con le urine, ma ne elimina poca, ne elimina in una quantità così bassa che solo le prove biologiche, che sono assai più sensibili di quelle chimiche, riescono a rivelarla. Così stando le cose, non sorprende che siano stati compiuti tentativi per anticipare la data dell'inizio dell'utilizzabilità della reazione. Due sono le strade possibili: o si rende la reazione più sensibile, in modo che essa riveli la presenza anche di quantità minime di follicolina, ed è quello che ha fatto Boguth introducendo filtri colorati che permettono l'accertamento di un grado anche minimo di fluorescenza, oppure si estrae la follicolina da una quantità di urina superiore ai 15 cc come si fa attualmente. Bisogna però cercare di ottenere il risultato, cioè l'anticipo dell'utilizzabilità, senza togliere alla prova il suo carattere di semplicità e di praticità. Proprio in questi mesi sto completando una serie di esperienze, iniziate alcuni anni or sono, che hanno appunto lo scopo di vedere se si può accertare chimicamente la presenza degli ormoni estrogeni dell'urina delle cavalle gravide fra il 90° e il 120° giorno dal salto; naturalmente non si può fare semplicemente la reazione di gravidanza così come l'ho originariamente descritta partendo da cc 200 ad es. di urina anzichè da cc 15; alla fine della prova si accumulerebbero nell'acido solforico tante impurità ricavate da una simile massa di urina, che diventerebbe assolutamente impossibile distinguere se c'è o se non c'è la fluorescenza dovuta agli ormoni estrogeni. Ho quindi pensato di applicare a cc 200 di urina di cavalla il metodo di isolamento degli ormoni estrogeni che ho descritto nel 1946; in questo modo si può infatti concentrare la follicolina contenuta nei 200 cc portandola entro un solo

cc di acido solforico concentrato. Queste prove non sono ancora pubblicate perché non sono ancora terminate; ho però già raccolto risultati dell'esame di numerose cavalle gravide, e posso dire che con questo perfezionamento si può avere il risultato e cioè fare la diagnosi di gravidanza prima del 120° giorno, anche quando cioè la reazione su 15 cc di urina dà risultato negativo o dubbio. Ricordo appena, poichè il risultato è stato negativo, un gruppo di prove che ho fatto aggiungendo all'urina di cavalla in esame polvere di zinco; ho fatto questa ricerca perchè è stato osservato che l'aggiunta di polvere di zinco rende più intensa la fluorescenza dell'acido solforico quando si esperimenta con urina di donna gravida.

Ed ora ci si domanda: la reazione chimico-ormonale, una volta passato il 120° giorno dal salto, si può eseguire per l'intera durata della gestazione? No, occorre prudenza quando si esamina l'urina di cavalle che si presume siano prossime a partorire; come già abbiamo detto, nelle ultime due settimane (in qualche caso anche tre settimane) la reazione chimico-ormonale può essere tanto positiva quanto negativa: lo ha accertato il Dr. Novazzi dell'Università di Milano in un lavoro da me consigliato.

La tecnica di esecuzione della reazione chimico-ormonale è semplice. Si mettono in una grossa provetta 15 cc dell'urina in esame senza filtrarla, e si aggiungono cc 6 di acido solforico concentrato. Si sviluppa calore, che è necessario perchè l'acido stacchi la follicolina dagli acidi organici (specialmente acido glicuronico) con cui è esterificata e diventi così solubile nel benzolo. Dopo 10 minuti si raffredda sotto l'acqua di un rubinetto e poi si travasa in un imbuto separatore e si aggiungono cc 21 di benzolo. Si agita e così il benzolo estrae dall'urina gli ormoni estrogeni. Si trasferisce l'estratto benzolico in un altro imbuto separatore e si aggiungono cc 4 di acido solforico concentrato; agitando, la follicolina passa dall'estratto benzolico all'acido solforico che, riscaldato in un bagno-maria acquista, se la cavalla era gravida, la tipica fluorescenza. È importante imparare a riconoscere con sicurezza questa fluorescenza che attesta la positività del risultato. In realtà un grado minimo di fluorescenza c'è sempre, in queste condizioni sperimentali; c'è anche quando si è partiti dall'urina di cavalle non gravide. È assolutamente indispensabile prepararsi due tubi-campione, cioè due provette contenenti l'acido solforico finale di due prove, una fatta con l'urina di una cavalla sicuramente gravida (e perciò l'acido solforico sarà intensamente fluorescente) e l'altra con urina di cavallo maschio castrato (e perciò l'acido solforico avrà solo quella minima fluorescenza che c'è sempre e non ha alcun significato diagnostico). Le provette-campione devono essere chiuse alla fiamma e conservate al buio; esse si devono sempre prendere come termini di paragone per la lettura di qualsiasi risultato.

Ma anche se si prende questa doverosa precauzione, si può talvolta rimanere incerti nel decidere se un risultato è positivo o negativo. Come si può riparare a ciò? Anzitutto bisogna avere presente che non di rado il benzolo contiene tracce di tiofene che in presenza dell'acido solforico dà

una più o meno evidente fluorescenza verde; di conseguenza bisogna prima di usare il benzolo e l'acido solforico fare la prova in bianco, cioè trattare il benzolo con l'acido solforico e vedere se dalla semplice unione di essi si genera la fluorescenza. Se ciò avviene e la fluorescenza non è troppo forte, si possono ugualmente usare i reagenti, preparando per essi i due campioni di «risultato positivo» e «risultato negativo» di cui si è detto. Controllata così la qualità dei reagenti, si ripete la prova sulla stessa urina, onde escludere che il risultato dubbio dipenda da qualche imperfezione nell'esecuzione (impurità pervenute accidentalmente nel benzolo); se anche nella ripetizione si ottiene risultato dubbio, si può applicare il metodo da me descritto nel 1946 per eliminare la maggior parte delle sostanze che passano con la follicolina dall'urina nell'estratto benzolico; infine – e questo è il provvedimento più importante – bisogna richiedere un altro campione di urina e rifare la prova dopo qualche giorno e questo per due motivi:

1) talvolta l'urina viene mandata troppo presto, prima del 120° giorno, quando ancora gli ormoni follicolari non hanno raggiunto in essa una concentrazione sufficiente;

2) può darsi che si tratti di quelle «scariche follicoliniche» che possono comparire senza che ci sia la gravidanza ma che non durano mai a lungo.

E infine: la reazione chimico-ormonale, eseguita con le più precise norme di tecnica è sempre esatta? Dà risposte sicure nel 100 per cento dei casi? No, la percentuale dell'uno–due per cento di errore esiste per questa reazione non diversamente che per tutte le altre reazioni di gravidanza finora conosciute.

Si può fare la diagnosi di gravidanza nella specie bovina mediante reazioni di laboratorio? Anche qui dobbiamo anzitutto vedere quel che si conosce sul comportamento delle gonadotropine e degli ormoni estrogeni nel corso della gestazione. Ma purtroppo nella bovina gravida nessuno di questi due tipi di ormoni è mai dimostrabile nel sangue. Nel 1950 due ricercatori indiani avevano affermato che le gonadotropine si trovano nelle feci delle bovine gravide, ma questa notizia è stata poi smentita. Nella urina invece compaiono gli ormoni estrogeni, sebbene in scarsa quantità e tardivamente. Si è quindi cercato di fondare le reazioni di gravidanza per le bovine sulla dimostrazione degli ormoni estrogeni nell'urina; sia ricordato, fra gli altri, il contributo del Collega svizzero J. F. Hauser. È però risultato impossibile, malgrado qualche affermazione in contrario di cui una pubblicata nel 1954 nel Bull. de l'Acad. Vét. de France, metterli in evidenza con lo stesso procedimento chimico-ormonale che corrisponde così bene per la cavalla. Ma nell'urina della bovina gravida la prova chimica non si può fare perché la follicolina non solo è scarsissima ma è accompagnata da una grande quantità di pigmenti, che danno di per sè stessi una forte fluorescenza ingannatrice. È quindi necessario ricorrere, per la dimostrazione della follicolina nell'urina delle bovine gravide, alle prove biologiche, perchè esse

sono assai sensibili e non vengono influenzate dalla presenza di quei pigmenti che disturbano tanto la prova chimica. Vi è però un ostacolo da superare: la tossicità dell'urina delle bovine per le topine e ratte. L'ostacolo è stato aggirato estraendo, con adatti accorgimenti, le sostanze estrogene dall'urina in modo da iniettare in ogni topina o ratta adulta e castrata la follicolina più o meno depurata, ricavata da una quantità piuttosto elevata (100 cc) di urina. Due procedimenti sono stati proposti a questo scopo: uno dagli spagnoli Oscariz e Gilsanz nel 1934 e l'altro dal Collega svizzero Joseph nel 1936. Io li ho sperimentati entrambi, nel 1939, dando senz'altro la preferenza al metodo di Joseph perché con esso si realizza una più completa e sicura estrazione della follicolina dall'urina. Come spesso accade quando si applicano metodiche nuove, ho anzi apportato qualche modifica tecnica al metodo Joseph ed ho applicato la prova così modificata in 103 vacche gravide e 57 non gravide; ho ottenuto risultati correttamente positivi nel 98,2 % di 57 bovine gravide oltre il 5° mese. Sarebbe interessante conoscere come corrisponde questa prova *durante* il 4° e 5° mese di gestazione: le mie prove si sono dovute limitare a 35 vacche gravide nel 4°–5° mese, (le altre erano in periodi più avanzati di gestazione); in esse ci furono solamente 3 risultati negativi e 3 risultati dubbi; sarebbe interessante ampliare la casistica in questo periodo della gravidanza, perchè è evidente che tutte le reazioni di gravidanza sono tanto più utili quanto più precocemente danno risultati attendibili, cosicchè la definizione sicura del periodo in cui si possono applicare con fiducia è di fondamentale importanza, è un elemento indispensabile per definirne il valore diagnostico pratico.

Zusammenfassung

Die Schwangerschaftsreaktionen beruhen auf dem Nachweis im Harn oder im Blute, von zwei verschiedenen Gruppen von Sexualhormonen: den Gonadotropinen und den östrogenen Sexualhormonen.

Die *Gonadotropine*, welche die Funktion von Ovarien und Hoden fördern, stammen normalerweise vom Hypophysenvorderlappen und, im Laufe der Schwangerschaft, auch und vermutlich in überwiegendem Maße von der Plazenta. Die *östrogenen Hormone* entstehen in den Ovarienfollikeln. Die Gonadotropine können nur mittels biologischer Reaktionen nachgewiesen werden, während die östrogenen Hormone sowohl durch biologische als auch durch chemische Reaktionen festgestellt werden können.

In der Veterinärmedizin haben die Schwangerschaftsreaktionen für das Pferd (Stute und Eselstute) Eingang gefunden. Beim Rind haben sie hingegen Resultate ergeben, deren Wert noch nicht sichergestellt wurde.

Bei der Stute kommen folgende Reaktionen in Betracht:

1. eine «frühzeitige Reaktion im Blut», wobei 10 bis 15 ccm Serum entweder intravenös an weiblichen reifen Kaninchen, oder subkutan an unreifen weiblichen Mäusen und Ratten eingespritzt werden. Von der Probe an männlichen Fröschen ist abzuraten. Die «frühzeitige Reaktion im Blut» ergibt brauchbare Resultate zwischen dem 55. und dem 120. Tag der Tragzeit.

2. eine «Reaktion im Harn», wobei die östrogenen Follikelhormone auf chemischem Wege nachgewiesen werden. Sie ergibt brauchbare Resultate vom 120. Tag nach dem letzten Deckakt anfangend bis zum 10.–15. Tag vor der Geburt.

Gegenwärtig sind Versuche im Gange, womit eine Verschiebung der Reaktion auf den 100. Tag der Tragzeit erstrebt wird. Die erhaltenen Resultate sind vielversprechend und berechtigen zu der Hoffnung, die Verschiebung der Diagnose auf obengenannten Termin sei tatsächlich möglich.

Résumé

Les réactions de gestation reposent sur le dépistage, dans l'urine ou dans le sang, de 2 groupes distincts d'hormones sexuelles: les gonadotropines et les œstrogènes.

Les gonadotropines, qui favorisent les fonctions ovariennes et testiculaires, sont issues normalement du lobe antérieur de l'hypophyse ainsi qu'en majeure partie probablement du placenta, au cours de la gestation.

Les hormones œstrogènes proviennent des follicules ovariens. Les gonadotropines ne peuvent être identifiées qu'au moyen de réactions biologiques, tandis que les hormones œstrogènes ne peuvent être dépistées que par des réactions à la fois biologiques et chimiques.

En médecine vétérinaire, les réactions de gestation sont accueillies avec faveur pour le cheval (jument et ânesse). Les résultats obtenus chez les bovins sont encore incertains.

En ce qui concerne la jument, les réactions suivantes entrent en ligne de compte:

1. Une «réaction précoce dans le sang» consistant soit en une injection intraveineuse de 10 à 15 cm^3 de sérum à des lapines adultes, soit en une injection sous-cutanée à des souris et à des rats femelles non adultes. On déconseille d'opérer sur des grenouilles femelles. La «réaction précoce dans le sang» donne des résultats utilisables entre le 55e et le 120e jour de gestation.

2. Une «réaction dans l'urine» consistant en un dépistage chimique des hormones folliculaires œstrogènes. Les résultats sont positifs en commençant depuis le 120e jour suivant la saillie jusqu'au 10 à 15e jour avant la naissance.

On cherche actuellement à obtenir un déplacement de la réaction jusqu'au 100e jour de gestation. Les résultats obtenus sont prometteurs et donnent à espérer que le déplacement précité sera vraiment possible.

Summary

Gravidity reactions consist in the demonstration in the urine or in the blood of two groups of sexual hormones: gonadotropins and estrogens.

The gonadotropins, which promote the functions of ovaries and testicles, are usually produced by the anterior lobe of the hypophysis, during pregnancy also, and probably mainly, by the placenta. The estrogens are produced in the ovarian follicles. The gonadotropins can only be demonstrated by biological reactions, the estrogens by biological and chemical reactions. In veterinary science these reactions are used to detect gravidity in horses and donkeys, whereas their results in cattle are still doubtful.

In the mare the following reactions are performed:

1. An "early blood reaction": 10–15 cc of serum are injected either intravenously into mature female rabbits or subcutaneously into immature female mice or rats. This reaction gives useful results between the 55th to the 120th day of pregancy. The reaction with male frogs is not recommended.

2. The "urine reaction", a chemical demonstration of follicle estrogens, gives useful results from the 120th day after the last coition to the 10th–15th day before parturition. Experiments are made with the aim to prove by this method a gravidity already from the 100th day. The results are promising.