

# LAR



ISSN: 1123-4593

## Large Animal Review

Indicizzato su CAB ABSTRACTS e GLOBAL HEALTH

### XX CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C.

Società Italiana di Patologia ed Allevamento degli ovini e dei caprini

26/29 settembre 2012 - Eureka Palace Hotel - Siracusa



Relazioni delle Tavole Rotonde  
Comunicazioni Scientifiche  
Poster - Simposi

 **sivar**  
SOCIETÀ ITALIANA VETERINARI PER ANIMALI DA REDDITO  
ASSOCIAZIONE FEDERATA ANMVI

**CON IL PATROCINIO DI:**



**Federazione Nazionale  
degli Ordini Veterinari Italiani**



**CON IL CONTRIBUTO DI:**



**Valledolmo**



**Segreteria Organizzativa**

**Kassiopea**  
group

Via G. Mameli, 65 - 09124 Cagliari  
Tel. 070 651242 - Fax 070 656263  
email: [domizianamessina@kassiopeagroup.com](mailto:domizianamessina@kassiopeagroup.com)  
[www.kassiopeagroup.com](http://www.kassiopeagroup.com)

CON IL CONTRIBUTO DI:



Bayer HealthCare  
Animal Health



**FOSS**





**S.I.P.A.O.C.**  
Società Italiana di Patologia ed  
Allevamento degli ovini e dei caprini

# XX CONGRESSO NAZIONALE S.I.P.A.O.C.

Società Italiana di Patologia ed Allevamento  
degli ovini e dei caprini



**Eureka Palace Hotel - Siracusa**  
**26/29 Settembre 2012**



## COMITATO ORGANIZZATORE

### **Presidente**

*Antonino Salina*

### **Membri**

*Giuseppina Chiarenza*

*Claudio D'Amore*

*Salvatore Dara*

*Sebastiano Ficara*

*Raimondo Gissara*

*Giuseppe Licitra*

*Anna Maria Fausta Marino*

*Carmelo Meli*

*Salvatore Pumilia*

*Andrea Truscetti*

*Giovanni Tumino*

*Salvatore Verga*

## COMITATO SCIENTIFICO

*Stefanino Agnello*

*Marcella Avondo*

*Adriana Bonanno*

*Santo Caracappa*

*Antonello Carta*

*Vincenzo Chiofalo*

*Giuseppe Cringoli*

*Floro De Nardo*

*Emilia Duranti*

*Vincenzo Di Marco Lo Presti*

*Vincenzo Ferrantelli*

*Giovanni Filippini*

*Angelo Fogliani*

*Giovanni Garippa*

*Salvatore Giannetto*

*Elvio Lepri*

*Ciriaco Ligios*

*Guido Ruggero Loria*

*Maria Teresa Manfredi*

*Gavino Marogna*

*Giuseppe Moniello*

*Massimo Morgante*

*Salvatore Murru*

*Pietro Paolo Niutta*

*Anna Maria Passantino*

*Baldassare Portolano*

*Alessandro Priolo*

*Bruno Ronchi*

*Massimo Todaro*

*Sebastiana Tola*

*Maria Tollis*

*Massimo Trabalza Marinucci*

## CONSIGLIO DIRETTIVO SIPAOC

### **Presidente**

*Antonello Carta*

### **Vice Presidente**

*Giovanni Filippini*

### **Tesoriere**

*Giuseppe Moniello*

### **Consiglieri**

*Giuseppe Cringoli*

*Floro De Nardo*

*Vincenzo Di Marco Lo Presti*

*Maria Teresa Manfredi*

*Bruno Ronchi*

*Massimo Trabalza Marinucci*

### **Segretario**

*Sara Casu*

## EDITORS

*Santo Caracappa, Vittoria Currò, Giuseppina Chiarenza  
e Rossella Colomba Lelli*

## SEGRETERIE DEL CONGRESSO

### **Segreteria Scientifica**

*Giuseppina Chiarenza, Vittoria Currò*

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"*

*Via G. Marinuzzi, 3 - Palermo*

*Tel. 091 6565461 - 336 - 341*

*Fax. 091 6570803*

*e-mail: [direzionesanitaria@izssicilia.it](mailto:direzionesanitaria@izssicilia.it)*

*[areapalermo@izssicilia.it](mailto:areapalermo@izssicilia.it)*

### **Segreteria Organizzativa**

*Kassiopea Group srl*

*Via G. Mameli, 65 - 09124 Cagliari*

*Tel. 070 651242 - Fax 070 656263*

*e-mail: [domizianamessina@kassiopeagroup.com](mailto:domizianamessina@kassiopeagroup.com)*

*[www.kassiopeagroup.com](http://www.kassiopeagroup.com)*

A nome del comitato organizzatore dell'IZS della Sicilia, che rappresento in qualità di Direttore Sanitario, ho il piacere di porgere il benvenuto a tutti i convenuti presenti al XX Congresso Nazionale SIPAOC.

Tale Congresso rappresenta da sempre un momento di integrazione interdisciplinare tra le varie professionalità impegnate a vario titolo nella Sanità Pubblica Veterinaria: allevatori, veterinari, docenti universitari, attori protagonisti nella ricerca scientifica e nella diagnosi delle malattie e delle performance dei piccoli ruminanti, tutti coesi alla creazione di basi sempre più solide per l'innovazione, l'aggiornamento e l'approfondimento delle tematiche classiche e dei rischi connessi alle nuove emergenze, con la possibilità di potersi, in queste occasioni, confrontare sui diversi aspetti e sulle problematiche del mondo agro-silvo-pastorale.

La regione Sicilia vanta il privilegio di essere stata la sede congressuale del primo congresso nazionale SIPAOC, quando, nel lontano 1976 a Catania per volere del Professore Salvatore Manlio Balbo, infaticabile segretario e promotore della manifestazione e del Professor Carmelo Gallo, Presidente del Comitato Organizzatore, fu tenuto a battesimo uno degli eventi più memorabili della Società. Tale esperienza siciliana verrà ripetuta successivamente per ben altre tre volte: nel 1983 il IV Congresso Nazionale ad Acireale sotto l'immane ed icastica guida del compianto professor Balbo, nel 1998 a Palermo il XIII Congresso Nazionale organizzato dal Dottore Santo Caracappa, fino ad arrivare ai giorni nostri nella splendida location di Siracusa.

La Società Italiana di Patologia e Allevamento degli Ovini e dei Caprini, rappresenta senza dubbio una delle realtà scientifiche più vivaci e qualificate nel panorama delle società culturali e scientifiche che operano nel settore dello studio delle problematiche connesse alle produzioni zootecniche del comparto ovi-caprino.

In particolare la Sicilia, rappresenta una regione a forte vocazione pastorale, collocandosi al secondo posto a livello nazionale per numero di capi maggiormente rappresentati da razze autoctone ovine e caprine a duplice attitudine latte e carne (comisana, barbaresca, pinzirita, belicina, girgentana, maltese, rossa mediterranea e argentata dell'Etna), annoverando apprezzate produzioni DOP nel comparto lattiero caseario (Piacentinu Ennese, Vastedda della Valle del Belice e Pecorino Siciliano).

La Sicilia possiede allevamenti con un più alto grado di resistenza e adattabilità a specifiche condizioni orografiche e ambientali, meno vulnerabili rispetto ai disagi climatici e alle patologie che la caratterizzano ed è da sempre punto di riferimento per la valorizzazione e il miglioramento delle razze ovine e caprine, con il nobile fine di tramandare materiale genetico di grande valore sia per la produzione del latte che per la rusticità stessa dei capi.

Il Congresso, a cui parteciperanno oltre 250 convegnisti, sarà articolato in cinque simposi e due tavole rotonde, durante le quattro giornate di lavori saranno presentati numerosi contributi scientifici tra comunicazioni orali e poster suddivisi nelle due diverse sezioni di zootecnia e di patologia.

Il comitato organizzatore del Congresso costituito da professionisti dei vari enti coinvolti, quali IZS Sicilia, Università, Associazione Regionale Allevatori Sicilia, Aziende Sanitarie Provinciali (ASP) insieme al Consiglio Direttivo della Società, gestiranno e coordineranno l'evento, affinché tutto si possa svolgere al meglio apportando nuove testimonianze di Scienza Applicata alle Produzioni di Origine Animale.

Lo sviluppo e il miglioramento delle produzioni esistenti, lo sfruttamento razionale dei pascoli e la sanificazione degli alimenti, costituiscono i passaggi obbligati per consentire alle nostre produzioni di accedere con prospettive di successo ai mercati internazionali nel rispetto dei vigenti regolamenti.

La SIPAOC che da sempre si è mossa su questa linea, dimostra anche in questa occasione il suo impegno: gli studi e le ricerche condotte tendono a valorizzare le migliori prospettive del comparto e, in definitiva, a riaffermare l'importanza dell'allevamento dei piccoli ruminanti nel contesto delle produzioni zootecniche nazionali.

Un doveroso ringraziamento va a tutti coloro i quali si sono impegnati per la realizzazione del congresso: alle autorità che presenzieranno, ai relatori, agli iscritti al convegno, al consiglio direttivo e a tutti gli altri che a vario titolo contribuiranno alla riuscita della manifestazione.

Buon lavoro e Buon Convegno..... a tutti!

*Rossella Colomba Lelli*

## Prof. Salvatore Manlio Balbo

Ricordare un collega che non è più tra noi non è mai facile, in particolare ripercorrere le tappe professionali del Professore Salvatore Manlio Balbo risulta un'impresa alquanto ardua, considerato che negli anni è stato un riferimento per tutti i giovani ricercatori e veterinari che orbitavano nel mondo della ricerca veterinaria dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia.

Egli fu insigne studioso medico veterinario e profondo conoscitore delle problematiche allevatorie della zootecnia siciliana. Per chi come me ha avuto la opportunità di aver collaborato con lui per oltre trent'anni, diventa difficile descrivere l'uomo, lo studioso, l'amico, il consigliere riservato e discreto con tutti.

Ebbe i suoi natali in Piazza Armerina, provincia di Enna nel 1927 e sin dalla sua prima infanzia, respirò il clima di un ambiente agreste e allevatorio ed è in quei luoghi che nacque il suo sconfinato amore per la veterinaria.

Conseguì la laurea in Medicina Veterinaria nel 1950, presso l'Università degli Studi di Perugia e, terminati i suoi studi, ritornò alla sua amata Sicilia avviandosi subito alla attività libero professionale come specialista in Fisiopatologia della riproduzione e in Fecondazione Artificiale.

Subito dopo fu chiamato a ricoprire l'incarico di Veterinario Comunale a Pietraperzia (EN).

Ben presto, però, la sua curiosità scientifica lo porterà, sulla scia di un vecchio colonialismo, in Africa Orientale con la qualifica di Assistente all'Istituto Sierovaccinogeno della Somalia a Merca prima e Mogadiscio dopo.

Dieci anni in Africa segneranno la sua vita professionale per sempre.

Al suo ritorno in Europa, nel 1965, viene chiamato dal Prof. Adelmo Mirri alla direzione della Sezione Diagnostica di Messina dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, contribuendo alla eradicazione della Trichomoniasi bovina, malattia causata da protozoo che colpisce l'apparato genitale causandone infertilità e alla lotta alle mastiti degli ovini e dei caprini promuovendo l'uso del vaccino contro l'agalassia contagiosa.

Prezioso punto di riferimento per l'IZS della Sicilia, negli anni '70 assunse l'incarico di dirigente della Sezione Diagnostica di Catania e vi rimase per oltre un decennio, dove svolse l'instancabile attività di consulenza e assistenza ai veterinari del territorio ed agli allevatori con i quali contribuì all'affermazione e promozione di un formaggio a latte crudo con aggiunto di zafferano (Piacentinu), tipico dell'enneese.

Negli anni '80 si trasferì a Palermo alla sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, con la qualifica di vice-direttore prima e successivamente direttore instaurando nuovi rapporti di collaborazione con gli altri II.ZZ.SS., organizzando diversi corsi di formazione di spessore internazionale (le memorabili giornate di training sull'emergenza Afta).

Un felice connubio quello con l'Istituto Zooprofilattico che non si risolverà nemmeno al momento del pensionamento, in quanto il professore sarà sempre vicino ai colleghi dell'Ente ed ogni scusa è buona per creare opportunità di lavoro, scambi di idee progettuali e nuovi obiettivi di collaborazioni.

La sua esperienza gli permise di collaborare intensamente con l'Azienda Regionale Foreste Demaniali della Sicilia, per il recupero della razza asinina pantasca, con l'Istituto di Incremento Ippico per la definizione degli standard zootecnico del cavallo Sanfratellano e con l'Istituto Sperimentale Zootecnico della Sicilia per il miglioramento genetico e allevatorio delle razze ovine e caprine autoctone.

Gran parte della sua vita professionale fu indirizzata ai molteplici aspetti del settore zoo-sanitario che lo vide protagonista in diverse società scientifiche.

Socio fondatore della SIPAOC (Società Italiana di Patologia degli Ovini e dei Caprini), della quale fu per oltre un decennio segretario contribuendo attivamente anche dopo tale carica alla crescita della Società. Fu membro di varie commissioni dell'U.E. per la profilassi e la eradicazione di alcune malattie esotiche. Si dedicò al settore dei piccoli ruminanti in particolare nella lotta contro le parassitosi più diffuse sul territorio, per la salvaguardia del patrimonio zootecnico regionale e si è impegnato anche nella attività alacre di docenza della parassitologia, presso l'Università degli Studi di Messina collaborando con il mondo accademico, nonché con i centri studi delle case farmaceutiche.

Oggi la comunità scientifica ed allevatoria compiangi il Prof. Balbo, sempre presente durante le manifestazioni pubbliche, non solo per dare un valevole contributo ai colleghi, ma per mantenere viva l'intesa con gli allevatori con cui instaurò rapporti di sincera cordialità e da cui spesso trasse spunti per la ricerca superando la barriera delle formalità istituzionali.

*Dott. Santo Caracappa  
Direttore Dipartimento Sanità Territoriale Interprovinciale IZS Sicilia*

## Tavole rotonde

L'allevamento ovino e caprino in Italia: criticità e prospettive di sviluppo sostenibile.....	1
Piani di controllo e di eradicazione delle principali malattie dell'allevamento ovino e caprino e criticità nell'applicazione del Regolamento di Polizia Veterinaria 320/54: attualità e prospettive .....	2

## Comunicazioni scientifiche

Analisi filogenetica di ceppi di <i>Pestivirus</i> isolati da ovini e caprini G. PURPARI, S. CIULLI, A.C. DE AGUIAR SALDANHA PINHEIRO, P. DI MARCO, S. DI BELLA, F. MIRA, S. VULLO, A. GUERCIO.....	4
Carcinoma mammario negli ovi-caprini: ruolo dei papilloma virus F. SAVINI, L. GALLINA, A. SCAGLIARINI, S. MIGNACCA, P. DI MARCO, G. PURPARI, A. GUERCIO, M.T. CAPUCCHIO, V. DI MARCO LO PRESTI.....	5
Effetto terapeutico di un vaccino inattivato in corso di infezione da <i>M. agalactiae</i> G.R. LORIA, R. PULEIO, A. TAMBURELLO, F. MESSINA, S. AGNELLO, C. PRUDENTE, G. MAROGNA, S. TOLA.....	6
Lesioni istopatologiche e pattern immunohistochemico in corso di infezione da <i>Mycoplasma mycoides subs. capri</i> in capre siciliane R. PULEIO, S. AGNELLO, R. NICHOLAS, G.R. LORIA.....	7
Effetto del genotipo sulla PrP <sup>res</sup> in ovini infettati con scrapie, BSE e BASE S. MIGLIORE, C. D'AGOSTINO, S. MARCON, M.A. DI BARI, G. VACCARI, E. ESPOSITO, E. SEZZI, B. CHIAPPINI, M. CONTE, L. DE GROSSI, C. CASALONE, U. AGRIMI, R. NONNO.....	8
Diffusione di <i>Cryptosporidium</i> e <i>Giardia spp.</i> in aziende ovine e caprine della Sicilia S. AGNELLO, M. VITALE, F. CAMPO, A. STANCANELLI, C. RUSSO, A. PIZZIMENTI, V. DI MARCO LO PRESTI.....	9
Le condizioni del mantello sono un valido indicatore di benessere nella capra? M. BATTINI, L. GROSSO, S. BARBIERI, I. AJUDA, A. VIEIRA, G. STILWELL, S. MATTIELLO.....	10
Prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo micronizzato (VALBAZEN 1,9%) verso <i>Dicrocoelium dendriticum</i> in ovini naturalmente parassitati A. BOSCO, L. RINALDI, V. SALAMINA, M. SANTANIELLO, M.E. MORGOGNONE, I. GUARIGLIA, G. CAPPELLI, A. SCALA, G. CRINGOLI.....	11
Patogeni emergenti nell'etiologia delle meningoencefaliti batteriche degli ovini F. CASALINUOVO, C. RIVERSO, N. MACRÌ, G. LUCIFORA, A. GUARINO.....	12
Effetti della dieta sul profilo acidico del latte di capre con diverso genotipo per l' $\alpha_{S1}$ -CN A. BONANNO, A. DI GRIGOLI, V. BELLINA, G. TORNAMBÉ, F. MAZZA, M. TODARO.....	13
Curve di emissione del latte registrate in allevamenti ovini C. BOSELLI, G. GIANGOLINI, G. GIACINTI, F. FILIPPETTI, R. BICOCCHI, M.C. CAMPAGNA, S. AMATISTE.....	14

Il Cacio Magno: variazione dei principali parametri reologici, colorimetrici e chimico-fisici a fine stagionatura M.C. CAMPAGNA, F. FILIPPETTI, N. BOTTALICO, L. DIONISI, R. CAVALLINA, R. ROSATI.....	15
Studio sui pattern SNPs nella popolazione ovina siciliana S. REALE, M. BIVONA, T. LUPO, A. MIGLIAZZO, S. CASELLA, D. MACRÌ, F. VITALE.....	16
Indagine preliminare sulle caratteristiche chimico-fisiche del Cacio Magno F. FILIPPETTI, M.C. CAMPAGNA, C. BOSELLI, G. GIANGOLINI, D. PATRIARCA, S. AMATISTE, R. ROSATI.....	17
<i>Staphylococcus aureus</i> nel latte di massa e individuale in allevamenti ovini della regione Lazio G. GIACINTI, D. SAGRAFOLI, G. ROSA, A. TAMMARO, E. BOVI, C. VESCHETTI, S. AMATISTE.....	18
Monitoraggio delle cellule somatiche nel latte di massa ovino in allevamenti della regione Lazio nel periodo 2008-2011 G. GIANGOLINI, S. AMATISTE, C. BOSELLI, G. GIACINTI, A. PROIETTI, R. ROSATI.....	19
Identificazione di una nuova variante alla $\kappa$ -caseina nella razza caprina Girgentana R. DI GERLANDO, L. TORTORICI, M.T. SARDINA, G. MONTELEONE, B. PORTOLANO.....	20
Analisi dei principali parametri microbiologici utilizzabili per la valutazione della shelf life di campioni di carne di agnello A.M.F. MARINO, G. CORPINA, M.L. PUGLISI, L. INSERRA, G. LUCIANO, G. CARACAPPA, A. SALVAGGIO, R.P. GIUNTA.....	21
Genotipizzazione degli SRLV in Italia: stato dell'arte M. BAZZUCCHI, C. CASCIARI, C. TORRESI, E. ROSSI, M. GIAMMARIOLI, F. FELIZIANI.....	22
Effetto del contenuto in cellule somatiche del latte sulle proprietà chimico-fisiche e sensoriali del formaggio pecorino D. MIRAGLIA, D. RANUCCI, A. VALIANI, M. TRABALZA MARINUCCI, G. ACUTI, M. ORRÙ, R. BRANCIARI.....	23
Trattamento con silimarina in pecore di razza sarda nel periparto G. GIACINTI, D. SAGRAFOLI, U. BERNABUCCI, S. AMATISTE, B. RONCHI.....	24
Caratterizzazione genetica mediante microsatelliti di una popolazione caprina siciliana S. MASTRANGELO, M. TOLONE, M.T. SARDINA, B. PORTOLANO.....	25
Identificazione di <i>B. melitensis</i> vaccinale Rev.1 in ovini e caprini siciliani S. CARACAPPA, V. CURRÒ, S. MARINEO, S. BRIGANÒ, A. PIAZZA, F. CUSUMANO, A. TORINA.....	26
Studio dei fattori genetici associati alla resistenza alla paratuberculosis ovina: uso di diversi test diagnostici per la classificazione del fenotipo degli animali negli allevamenti infetti S. SECHI, N. PONTI, A. CARTA, S. CASU, C. MAESTRALE, C. LIGIOS, G. FOUCRAS.....	27
Studio delle popolazioni di batteri lattici presenti nell'intestino di agnelli sottoposti ad alimentazione diversificata A. SALVAGGIO, A. SCALIA, A. MURATORE, L. INSERRA, R. SANTANGELO, R.P. GIUNTA, A.M.F. MARINO.....	28
Valutazione del rischio di re-introduzione della brucellosi ovicaprina in regioni ufficialmente indenni E. BANDINO, M. MULAS, L. GODDI, A. COCCOLLONE, S. CAPPAL, S. ROLESU.....	29

Modello di gestione di un piano operativo straordinario nel Servizio di Sanità Animale della ASL di Sassari: Piano Straordinario per l'identificazione elettronica e la Selezione Genetica degli arieti per la resistenza alle EST – Utilizzo sistema GIS F. SGARANGELLA, G. BITTI, D. MARONGIU, P.P. CUCCURU, S. MASALA, V. FLORIS, C. SANNA, B. MOSSA.....	30	La lana verso un nuovo futuro: parte in Puglia il progetto “Partnersheep” N. DIBENEDETTO, F. MODESTI, C. MATTIA, P. DIRENZO, A. DIBENEDETTO, E. PIERAGOSTINI .....	45
La tulatromicina nelle infezioni respiratorie della pecora F. NACCARI, F. GIOFRE, M. MICHENZI, A. LAURIA, V. NACCARI, G.E. ARCADIPANE, A. BASSINI, A. SORIOLO .....	31	Indicatori prognostici nell'anaplasmosi ovina: approccio multivariato E. PIERAGOSTINI, E. CIANI, I. ALLOGGIO, F. PETAZZI .....	46
Management aziendale, aborti ricorrenti e Toxoplasmosi negli allevamenti ovi-caprini in Sicilia M. VITALE, S. MIGNACCA, D. TASCA, G. GUARNERI, S. AGNELLO, V. DI MARCO LO PRESTI .....	32	Cellule somatiche in latte ovino: analisi e applicazione delle curve ROC M. TOLONE, M.L. SCATASSA, I. MANCUSO, V. MIRAGLIA, B. PORTOLANO .....	47
Cellule somatiche ed isolamento di agenti mastidogeni in ovini di razza Valle del Belice M.L. SCATASSA, V. MIRAGLIA, I. MANCUSO, M. TOLONE, B. PORTOLANO .....	33	Impiego di <i>Rosmarinus officinalis</i> nell'alimentazione dell'ovino: effetti sui principali parametri di degradabilità ruminale <i>in vivo</i> G. COBELLIS, C. FORTE, G. ACUTI, M. RICCI, S. DE VINCENZI, M. TRABALZA-MARINUCCI .....	48
Utilizzo di un concentrato tanninico per il contenimento dei coccidi nel capretto M.T. MANFREDI, C. FRAQUELLI, P. PICCOLINO BONIFORTI, R. RIZZI, S. ZANZANI .....	34	Impiego di <i>Rosmarinus officinalis</i> nell'alimentazione dell'ovino: effetti sul pH e sulla popolazione batterica ruminale M. RICCI, G. ACUTI, C. FORTE, G. COBELLIS, O. OLIVIERI, A. VALIANI, M. TRABALZA-MARINUCCI .....	49
Relazione tra cellule somatiche e caratteri produttivi negli ovini da latte di razza Sarda S. SECHI, S. SALARIS, S. CASU, A. CARTA .....	35	Impianto di melatonina nell'ariete: studio ecografico testicoli e ghiandole accessorie A. SPEZZIGU, F. BERLINGUER, S. MUNTONI, D. BIZZARRI .....	50
Sviluppo di un programma di monitoraggio per febbre Q in allevamenti ovi-caprini M.L. MANDOLA, D. AMERI, F. RIZZO, M. BIANCHI, L. DECASTELLI, L. CHIAVACCI, N. VITALE, C. LUZZAGO .....	36	Linfoma ovino: descrizione di 9 casi E. LEPRI, G. FILIPPINI, S. PAVONE, N. D'AVINO, S. SALAMIDA, G. VITELLOZZI .....	51
Lentivirus dei piccoli ruminanti: una difficile palestra per la diagnostica di laboratorio L. BERTOLOTI, M. GIAMMARIOLI, F. FELIZIANI, S. ROSATI .....	37	Aborti da zearalenone in un allevamento ovino siciliano A. CICERO, G. GIANGROSSO, V. CURRÒ, C. MALARA, A. VELLA, V. FERRANTELLI .....	52
Caratterizzazione delle glicoproteine E e I di Caprine herpesvirus 1 (CpHV1) L. BERTOLOTI, A. ROSAMILIA, M. PROFITI, E. BROCCHI, L. MASOERO, V. FRANCESCHI, M. TEMPESTA, G. DONOFRIO, S. ROSATI .....	38	Milk Amyloid A: utilizzo nella diagnosi della mastite subclinica nelle pecore L. MOSCATI, A. MIGLIO, A. ANTOLINI, G. FRUGANTI, M. PELA, E. SCOCCIA, C. MARESCA .....	53
Il latte di pecora: un mezzo di protezione per i batteri lattici probiotici? M.A. MURGIA, F. FANCELLO, P. DEIANA, N.P. MANGIA .....	39	Il piano di controllo/eradicazione per l'agalassia contagiosa in Provincia di Trento D. DELLAMARIA, E. FRANCIONE, R. LUCCHINI, S. PATERNOLLI, F. GOBBO, S. CATANIA, R.A.J. NICHOLAS, C. COSTANZI, F. CHIN, G. MINGHETTI, G. FARINA .....	54
Estratto polifenolico nella dieta e stato ossidativo nelle pecore in transizione S. DE VINCENZI, L. MOSCATI, S. RUGGERI, S. MATTIOLI, M. PELA, A. ANTOLINI, E. CESTOLA, M. PAUSELLI .....	40	Screening della contaminazione da aflatossina M1 in latte crudo ovino per la produzione del “Piacentinu ennese” G. GIANGROSSO, A. VELLA, A. CICERO, C. MALARA, A. MIGLIAZZO, A. MACALUSO, F. GRIPPI, V. FERRANTELLI .....	55
Studio retrospettivo sulla neuropatologia degli ovi-caprini dal 1995 al 2012 M.T. CAPUCCHIO, G.R. LORIA, P.R.D. ROCHA, E. BIASIBETTI, S.A. MIGNACCA, G. GUARNERI, M. RUSSO, F. GUARDA, V. DI MARCO LO PRESTI .....	41	Piano Straordinario per l'eradicazione della Brucellosi Ovina e Caprina in Sicilia: confronto di metodi diagnostici F. VITALE, S. REALE, M. BIVONA, T. LUPO, A. MIGLIAZZO, F. BRUNO, G. CASTELLI, D. SCOPELLITI, C. DE MARIA, P. GALLUZZO, S. CARACAPPA .....	56
Eziologia degli aborti negli allevamenti ovini e caprini in Sicilia: considerazioni pratiche in allevamento e diagnostica di laboratorio M. VITALE, M. RUSSO, S.A. MIGNACCA, V. ARONICA, S. MILONE, S. REALE, M.T. CAPUCCHIO, V. DI MARCO LO PRESTI .....	42	Diffusione di <i>Brucella abortus</i> in capre autoctone siciliane S. CARACAPPA, D. VICARI, V. BLANDA, F. ANTOCI, S. PROPERZI, L. GALUPPO, S. MARINEO, L. SEMINARA, V. LO GIUDICE, V. CURRÒ .....	57
Approccio alla gestione di un focolaio di paratubercolosi ovi-caprina G. LUCIFORA, V. RITACCO, A. PALUCCI, A. DI SARNO, D. TASCA, G. ASCIONE, G. GIANNOTTA, G. MANCUSO .....	43	Soia g.m. nella dieta per capre: performance dei capretti allattanti R. TUDISCO, S. CALABRÒ, M.I. CUTRIGNELLI, G. MONIELLO, M. GROSSI, V. MASTELLONE, P. LOMBARDI, L. AVALLONE, F. INFASCELLI .....	58
Stato metabolico di pecore da latte allevate in due diverse condizioni ambientali I. VAZZANA, V. BARZON, S.A. MIGNACCA, S. DARA, M. GIANESELLA, M. MORGANTE .....	44	“Latte di gesso” nell'abomaso dei capretti: descrizione di un caso G. FILIPPINI, N. D'AVINO, S. PAVONE, S. SALAMIDA, M. GARAGUSO, G. PRESTERA, E. CARIATI, E. LEPRI .....	59
		Malattie trasmesse da zecche (TBDs) in ovini della Sicilia Occidentale A. TORINA, S. CARACAPPA, V. BLANDA, M.E. SCARIANO, V. DI MARCO LO PRESTI, S. BRIGANÒ, R. D'AGOSTINO, S. SCIMECA, J. DE LA FUENTE .....	60

Control of vector-borne diseases with Subolesin/Akirin vaccines J. DE LA FUENTE, O. MERINO, J.A. MORENO-CID, M. VILLAR, R.C. GALINDO, C. ALMAZÁN, K.M. KOCAN, J.M. PÉREZ DE LA LASTRA, P. ALBERDI .....	61	Influenza della durata dell'asciutta sulla risposta immunitaria di ovini di razza Sarda P. BONELLI, P. NICOLUSSI, R. RE, G. PILO, S. FRESI, L. PAIS, S. SERRA, C. CARZEDDA, A. MAZZA, S.P.G. RASSU .....	80
Parassitosi degli ovini e dei caprini e Regolamento di Polizia Veterinaria 320/54: criticità applicative con particolare riguardo all'Echinococcosi Cistica G. GARIPPA .....	63	Risposta citochinica locale e sistemica in corso di mastite da <i>Streptococcus uberis</i> G. GALLERI, P. BONELLI, P. NICOLUSSI, G. SCHIANCHI, S. UZZAU, G. MAROGNA .....	81
Condizionalità: aspetti di sanità pubblica veterinaria L. ARCURI .....	64	Intossicazione in ovini da errata alimentazione: case report D. VICARI, V. CURRÒ, A. DI GRIGOLI, C. PANEPINTO, V. RANDAZZO, A. D'ORAZI, A. GRECO, D. VARGETTO, R. PULEIO, G. CHIARENZA, S. CARACAPPA .....	82
<hr/>			
<b>Sessione poster</b>			
Artrite-Encefalite Caprina (CAE) in allevamenti da latte nel territorio siciliano S. AGNELLO, G. PURPARI, C. LO GIUDICE, F. CAMPO, G. CHIARACANE, A. CONIGLIO, A. STANCANELLI, F. FELIZIANI, S. DARA, A. GUERCIO .....	68	Un caso di broncopneumonia necrotizzante da <i>Corynebacterium pseudotuberculosis</i> E. BIASIBETTI, S.A. MIGNACCA, D. VICARI, P.R.D. ROCHA, G. GUARNERI, D. TASCA, M.T. CAPUCCHIO, V. DI MARCO LO PRESTI .....	84
Descrizione di un caso di intossicazione cronica da ossalati di calcio in ovini, rilievi anatomopatologici e istologici R. PULEIO, G.R. LORIA, A. TAMBURELLO, P. ZANGHÌ, I. VAZZANA, S. MIGNACCA, V. DI MARCO LO PRESTI .....	69	Otite ed accessi otogenici causati da graminacee in ovini e caprini: clinica e patologia S.A. MIGNACCA, M. MUCCIARELLI, M. FIASCONARO, M.T. CAPUCCHIO, E. BIASIBETTI, M. RUSSO, V. DI MARCO LO PRESTI .....	85
Presenza di <i>Brucella</i> spp. in formaggi tipici siciliani e implicazioni di sanità pubblica C. CARDAMONE, V. ALIO, S. REALE, C. PIRAINO, G.R. LORIA, A.M. DI NOTO .....	70	Intossicazione acuta da piante contenenti acido ossalico ( <i>Oxalis pes-caprae</i> ) in un gregge ovino: valutazioni cliniche ed anatomo-istopatologiche C. STELLETTA, V. DI MARCO LO PRESTI, S.A. MIGNACCA, V. ARONICA, E. BIASIBETTI, M.T. CAPUCCHIO, P. ZANGHÌ, I. VAZZANA .....	86
Caratterizzazione nutrizionale della carne di agnelloni appartenenti alla popolazione "Rocche del Crasto". Risultati preliminari A. DI ROSA, S. SCIANÒ, M.E. FURFARO, G. SPARTÀ, V. PRUITI, A. ZUMBO .....	71	Insolito caso di intossicazione da "pollina": osservazioni cliniche ed indagini anatomo-istopatologiche S.A. MIGNACCA, M.T. CAPUCCHIO, P.R.D. ROCHA, E. BIASIBETTI, C. STELLETTA, G. GUARNERI, D. TASCA, I. VAZZANA, V. DI MARCO LO PRESTI .....	87
Relazioni tra BCS, misurazioni somatiche e composizione corporea in pecore Sarde G. GAIAS, M.G. SERRA, O. BOAVENTURA NETO, A. CANNAS .....	72	Cisti congenite in rene, fegato e pancreas presenti in un piccolo gregge di capre della Regione Calabria G. LUCIFORA, F. TORCHIA, M.T. CAPUCCHIO, S.A. MIGNACCA, S. AGNELLO, P.R.D. ROCHA, E. BIASIBETTI, V. DI MARCO LO PRESTI .....	88
Profilo acido di latte e liquido ruminale di pecore alimentate con piante aromatiche M.G. MANCA, R. BOE, R. MANCA, M. DECANDIA, M. ACCIARO, A. CANNAS .....	73	Tre casi di melanomi in piccoli ruminanti: reperti anatomo-istopatologici S.A. MIGNACCA, E. BIASIBETTI, P.R.D. ROCHA, G. GUARNERI, D. TASCA, L. SPURIA, F. ARTALE, M.T. CAPUCCHIO .....	89
Efficacia di Toltrazuril e Diclazuril nel controllo della eimeriosi degli agnelli M. DIAFERIA, F. VERONESI, G. MORGANTI, L. NISOLI, D. PIERGILI FIORETTI .....	74	Neoformazioni delle cavità nasali negli ovini: sintomi clinici e reperti anatomo-istopatologici P.R.D. ROCHA, S.A. MIGNACCA, E. BIASIBETTI, S. MILONE, M. FIASCONARO, V. ARONICA, V. DI MARCO LO PRESTI, M.T. CAPUCCHIO .....	90
Integrazione della dieta di pecore con <i>Rosmarinus officinalis</i> : effetti sulla capacità antiossidante del latte R. BRANCIARI, D. MIRAGLIA, M. TRABALZA MARINUCCI, D. RANUCCI, G. ACUTI, L. MOSCATI, A. VALIANI .....	75	Reperti anatomo-istopatologici associati a vestigia dell'uraco M.T. CAPUCCHIO, E. BIASIBETTI, P.R.D. ROCHA, L. STRADA, S.A. MIGNACCA, V. DI MARCO LO PRESTI .....	91
Valutazione del ritmo giornaliero dell'attività locomotoria totale in pecore e capre sottoposte a differente fotoperiodo V. MONTEVERDE, S. VULLO, I. VAZZANA, S. CASELLA, D. CRUCITTI, T. OREFICE, C. RUSSO, G. PICCIONE .....	76	Carcinoma a cellule squamose in pecore allevate nella Regione Sicilia R. PULEIO, M.T. CAPUCCHIO, S. MIGNACCA, L. SPURIA, T. SOFIA, M. FIASCONARO, G.R. LORIA .....	92
Influenza del microclima sui livelli ematici di alcune proteine della fase acuta nella pecora comasana I. VAZZANA, S. DARA, G. PICCIONE, S. CASELLA, F. ARCURI, T. OREFICE, V. MONTEVERDE .....	77	Epatite necrotica da <i>B. trehalosi</i> nei capretti: descrizione di un focolaio in Sicilia F. CAMPO, S. AGNELLO, A. STANCANELLI, C. PIRAINO, S. MIGLIACCA, V. DI MARCO LO PRESTI .....	93
Monitoraggio di alcuni parametri dello stress ossidativo durante differenti periodi produttivi in allevamenti ovini V. MONTEVERDE, G. VESCO, I. VAZZANA, A. CANDELA, C. RUSSO, G. PICCIONE, S. CASELLA .....	78	<i>S. aureus</i> in Puglia da formaggi a latte crudo ovino e profilo di antibiotico resistenza M.G. BASANISI, E. CRISSETTI, R. PEDALE, M.C. NARDELLA, G. LA SALANDRA .....	94
Analisi della situazione sociale, strutturale e produttiva di un campione di allevamenti della Sardegna orientale A. COCCOLLONE, L. GODDI, E. BANDINO, P. CABRAS, S. CAPPAL, S. ROLESU, M. MULAS .....	79		

Nematodi gastrointestinali nei piccoli ruminanti in Sicilia: problematica ancora attuale V. CURRÒ, F. SALINA, M.F. PERSICHETTI, R. DISCLAFANI, V. PALAZZOLO, D. NIFOSÌ, G. LO BIUNDO, F. LICITRA, P. CICERO, P. GALLUZZO, S. CARACAPPA .....	95	Prospettive della selezione genetica per la resistenza alla scrapie nei caprini C. LIGIOS, M. MASIA, S. SECHI, A. CARTA, M.G. CANCEDDA, D. PINTUS, C. CONTU, C. MAESTRALE .....	120
Proteine immunogeniche di <i>Brucella abortus</i> e <i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 investigate a mezzo <i>Western Blot</i> S. VILLARI, V. MONTEVERDE, G. CHIARENZA, V. GARGANO, M.L. CORRENTE, M.F. GRECO, G. VESCO .....	96	La selezione genetica per la scrapie a salvaguardia della biodiversità in Sicilia M. VITALE, V. DI MARCO LO PRESTI .....	121
Rapida caratterizzazione di specie di <i>Chlamydophila</i> con <i>High-Resolution Melt Analysis Qualitativa</i> G. VESCO, V. GARGANO, S. VILLARI .....	97		

## Sessione Simposi

### SIMPOSIO 1 – Micoplasmosi emergenti e riemergenti

Agalassia contagiosa e micoplasmosi nei piccoli ruminanti in Italia: scenario attuale G.R. LORIA, R. PULEIO, A. TAMBURELLO, F. MESSINA, R. NICHOLAS .....	100
Produzione, uso ed efficacia sul campo di un vaccino stabulogeno contro <i>Mycoplasma mycoides subsp. capri</i> nelle capre G. MAROGNA, A. BARBATO, A. FIORI, G. SCHIANCHI .....	104

### SIMPOSIO 2 – Protocolli clinico diagnostici e strategie di profilassi e/o terapia delle principali problematiche sanitarie dell'allevamento ovino e caprino

Paratubercolosi ovi-caprina: approccio alla diagnosi e al controllo M. FIASCONARO, C. GARBARINO, M. RICCHI, G. CAMMI, L. SPURIA, V. DI MARCO, N. ARRIGONI .....	108
Approccio diagnostico alle mastiti dell'ovino e del caprino G. MAROGNA, M.L. SCATASSA .....	112
Approccio diagnostico alle miasi dei piccoli ruminanti A. SCALA, P. MULA .....	114

### SIMPOSIO 3 – Miglioramento genetico e controllo delle malattie

3SR: Sustainable Solutions for Small Ruminants A. CARTA, S. CASU, J.J. ARRANZ, G. BANOS, S. BISHOP, L. BODIN, N. COCKETT, B. DALRYMPLE, G. FTHENAKIS, O. KEANE, E. MARTYNIUK, C. MORENO, R. RUPP, A. STELLA, S.H. ZHAO, H. JONES .....	118
Selezione genetica per la riduzione del contenuto in cellule somatiche del latte ovino V. RIGGIO .....	119

### SIMPOSIO 4 – Le distomatosi dei piccoli ruminanti: realtà e strategie di controllo

Aggiornamenti sulla fasciolosi M.T. MANFREDI, S.A. ZANZANI .....	124
La Paramfistomatosi dei piccoli ruminanti A. SCALA, G. CRINGOLI, G. SANNA .....	127
Un "Questionnaire survey" sui trattamenti antielmintici contro la dicroceliosi in una realtà ad alta vocazione per l'allevamento ovino quale la Sardegna A. SCALA, P. MARON, V. SALAMINA, G. SANNA .....	131

### SIMPOSIO 5 – Strategie alimentari e problematiche associate alla destagionalizzazione del ciclo riproduttivo nei piccoli ruminanti

La destagionalizzazione della produzione di latte ovino e caprino: aspetti economici, tecnici ed alimentari A. CANNAS, A. MEREU .....	136
Alcuni esempi di tecniche di destagionalizzazione dei calori negli ovini di razza sarda con particolare riferimento alla gestione dei maschi M. DATTENA, G. MELONI, L. FALCHI, I.M. MAYORGA, M. GALLUS, S. SALARIS .....	139
Lo stress da caldo: effetti sulle produzioni e strategie per fronteggiarlo A. SEVI .....	140
Implicazioni legate alla destagionalizzazione degli ovini: gli effetti sulle produzioni M. TODARO .....	142
Esperienze di destagionalizzazione nelle razze caprine del nord Italia G. BRUNI, G. ZANATTA, M. VILLA .....	146
La pecora Massese: una razza tradizionalmente destagionalizzata M. MELE, A. ACCIAIOLI .....	148
La destagionalizzazione della produzione lattiero casearia degli ovini in Sicilia A. BONANNO, A. DI GRIGOLI, G. TORNAMBÉ .....	151
La destagionalizzazione della produzione ovina in Sardegna: risultati sperimentali e prospettive M. SITZIA, M. ACCIARO, M. DECANDIA .....	155



# L'allevamento ovino e caprino in Italia: criticità e prospettive di sviluppo sostenibile

V. CURRÒ et al. - Moderatore: V. CAPORALE

La Tavola Rotonda dal titolo “L'allevamento ovino e caprino in Italia: criticità e prospettive di sviluppo sostenibile” è stata occasione di un vivace ed intenso confronto tra gli personalità di spicco della Sanità Pubblica e del mondo accademico nonché rappresentanti della realtà allevatoriale.

Il dibattito è stato condotto e animato dalla sapiente dialettica del Prof. Vincenzo Caporale, Presidente della Commissione per gli standard biologici del World Organization for Animal Health (OIE). Ha aperto il confronto il Dr. Romano Marabelli, Capo Dipartimento ex Dipartimento per la Sanità Pubblica Veterinaria, la Nutrizione e la Sicurezza degli Alimenti del Ministero della Salute, che ha illustrato come il Decreto Legislativo n. 106 del 28 giugno 2012 sulla riorganizzazione degli enti vigilati dal Ministero della Salute interviene sulla organizzazione degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali ed ha sottolineato come sia importante la cooperazione con il mondo delle Università perché come sottolineato dallo stesso dott. Marabelli: “laddove tale cooperazione si è instaurata i risultati sono stati al di sopra di ogni aspettativa”. La Dott.ssa Maria Caramelli, Responsabile del Centro di Referenza Nazionale per le Encefalopatie Animali (CEA) presso l'IZS del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, ha illustrato i più recenti dati riguardanti l'Encefalopatia Spongiforme Trasmissibile (TSE o più comunemente “scrapie”), malattia infettiva neurodegenerativa degli ovini e dei caprini, analoga alla Encefalopatia Spongiforme dei Bovini (BSE) e alla malattia di Creutzfeld-Jakob (CJD) nell'uomo, caratterizzata dall'accumulo nel sistema nervoso centrale di una isoforma anormale della proteina prionica dell'ospite. La dottoressa Caramelli ha chiarito come negli ovini tale patologia appaia strettamente correlata alla genetica dell'animale ed ha posto l'accento, in linea con le direttive dell'Unione Europea, sull'importanza dei programmi per il controllo genetico della suscettibilità alla malattia nelle popolazioni ovine mirata alla selezione di popolazioni resistenti e, nello stesso tempo, sulla necessità di prevedere tali programmi anche per le popolazioni caprine.

La problematica paratuberculosis è stata affrontata dal Prof. Giuseppe Iovane della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università Federico II di Napoli che ha illustrato agli intervenuti gli aspetti principali della malattia, descrivendone eziologia, patogenesi e strategie di intervento con particolare attenzione ai nuovi metodi diagnostici.

“Quale futuro per gli allevamenti ovi-caprini in Sardegna?” è questo l'interrogativo che il Dr. Marino Contu, Direttore dell'Associazione Regionale Allevatori della Sardegna, pone al folto pubblico. Il settore ovino e caprino della Sardegna, da alcuni anni versa in una grave crisi economica determinata, in primo luogo, dagli elevati costi di produzione del latte e dalle difficoltà che alcuni dei suoi più importanti prodotti trovano sul mercato. Al contrario, le produzioni casarie di altre regioni italiane e, soprattutto, di altre nazioni europee non soffrono delle stesse problematiche. Il relatore ha ribadito l'importanza di intervenire sui costi di produzione anche agendo sui costi energetici delle aziende mediante l'utilizzo di impianti di energia rinnovabile.

Il dibattito ha visto poi l'intervento del Dr. Augusto Calbi, Direttore dell'Associazione Provinciale Allevatori di Potenza e Matera, che ha riferito circa il peso che la zootecnia ed in particolare il settore ovino e caprino ha nella economia della regione Basilicata tanto da rappresentare un'efficiente opportunità produttiva dal momento che alimenta un consistente indotto che esita nella produzione di diversi prodotti tipici. Le produzioni integrate zootecniche sono state oggetto di analisi da parte del Prof. Bruno Ronchi (Dipartimento di Produzioni Animali, Università degli Studi della Tuscia, Viterbo). Tali produzioni che prevedono l'utilizzo di tecniche compatibili con la tutela dell'ambiente naturale, sono finalizzate alla salvaguardia della salute del consumatore privilegiando pratiche ecologicamente sostenibili, con un uso ridotto di presidi chimici ed un ritorno favorevole anche in tema di salvaguardia ambientale. Il professor Ronchi ha sottolineato come, senza prescindere dall'attenzione nei confronti del benessere degli animali che resta un punto fermo nella conduzione aziendale, si possano adottare misure atte a prevenire le principali patologie attraverso l'analisi appropriata dei punti critici e l'adozione di protocolli farmacologici con principi attivi a minor impatto ambientale consentiti dalla normativa europea.

La Dott.ssa Rossella Colomba Lelli Direttore Sanitario dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia ha chiuso i lavori ponendo l'accento sugli adempimenti che, in armonia con le direttive comunitarie e nazionali, le aziende agricole devono osservare anche al fine di garantire la sicurezza del consumatore. Un caposaldo in tale ambito è rappresentato dalla corretta identificazione degli animali e dal controllo e disciplina delle loro movimentazioni. È necessario ancora garantire in tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione, la rintracciabilità di alimenti e mangimi. Il Direttore sanitario dell'Istituto della Sicilia dopo un rapido excursus sulla storia degli IZZSS, enti da sempre proiettati al miglioramento degli standard sanitari degli allevamenti attraverso l'assistenza agli allevatori e il supporto tecnico scientifico ai Servizi Veterinari, ha ricordato come il ruolo degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sia anche quello della garanzia della sicurezza degli alimenti e quello della tutela della Salute Pubblica, che passa anche attraverso la formazione/informazione delle figure coinvolte nei processi produttivi ivi compreso il personale sanitario e gli addetti OSA. In ultimo, ma non per questo meno importante, la dott.ssa Lelli ha ricordato il ruolo degli Istituti nella messa a punto di metodi diagnostici sempre più sensibili, affidabili e capaci di garantire rapidità di risposta.

**Piani di controllo e di eradicazione  
delle principali malattie dell'allevamento  
ovino e caprino e criticità nell'applicazione  
del Regolamento di Polizia Veterinaria 320/54:  
attualità e prospettive**

**G. FERRI et al.**

# **Comunicazioni scientifiche**

# Analisi filogenetica di ceppi di *Pestivirus* isolati da ovini e caprini



G. PURPARI<sup>1</sup>, S. CIULLI<sup>2</sup>, A.C. DE AGUIAR SALDANHA PINHEIRO<sup>2</sup>,  
P. DI MARCO<sup>1</sup>, S. DI BELLA<sup>1</sup>, F. MIRA<sup>1</sup>, S. VULLO<sup>1</sup>, A. GUERCIO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna

**Parole chiave:** *Pestivirus*, analisi filogenetica, ovini, caprini.

**INTRODUZIONE** - Il genere *Pestivirus*, della famiglia *Flaviviridae*, comprende attualmente 4 specie virali: Virus della Diarrea Virale Bovina 1 (BVDV-1), Virus della Diarrea Virale Bovina 2 (BVDV-2), Virus della Peste Suina Classica (CSFV), Virus della Border Disease (BDV). A differenza di quanto descritto per il Virus della Peste Suina Classica, i *Pestivirus* dei ruminanti mostrano una bassa specie-specificità con frequenti isolamenti delle 3 specie virali (BVDV-1, BVDV-2, BDV) da bovini, ovini e caprini. Queste possono, inoltre, essere suddivise su base genetica in molteplici sottogruppi. Ad oggi, i virus della specie BVDV-1 sono riconducibili a 15 sottogruppi, denominati 1a-1o (Nagai et al., 2008), mentre sono stati individuati 2 sottogruppi di BVDV-2 (2a e 2b) e 7 sottogruppi di BDV (BDV1-BDV7). L'analisi genetica di nuovi isolati virali sia di origine bovina (Decaro et al., 2011) che ovina (Oguzoglu, 2009; Thabti et al., 2005) ha, recentemente, evidenziato la circolazione anche in Italia di ceppi atipici, che si differenziano significativamente dalle specie classiche sia di BVDV che BDV.

**MATERIALI E METODI** - I ceppi virali analizzati in questo studio sono stati isolati da 1 feto ovino (2007) e da un adulto (2007) e 2 feti (2011) appartenenti alla specie caprina, provenienti da allevamenti siciliani sierologicamente positivi per *Pestivirus*. I feti presentavano all'esame anatomico-patologico lesioni sistemiche caratterizzate da edema sottocutaneo gelatinoso - emorragico e versamenti cavitari (liquido siero-emorragico, organi edematosi e congesti, abomasite catarrale, enterite purulenta - emorragica, pleurite fibrinosa). L'esemplare adulto presentava disidratazione, dimagrimento, polmoni aumentati di volume, broncopneumite catarrale, enterite necrotico-emorragica, fegato cosparso di focolai necrotici. I ceppi virali sono stati isolati, in accordo con lo stato setticemico degli animali, da tutti gli organi esaminati (encefalo, polmone, cuore, fegato, milza, intestino), tramite infezione di monostrati di cellule primarie di rene fetale ovino (RFO) e di cellule stabilizzate Madin Darby Bovine Kidney (MDBK). Non sempre gli isolati presentavano effetto citopatico. I ceppi sono stati identificati tramite analisi molecolare. L'RNA virale è stato estratto e sottoposto a retrotrascrizione ed amplificazione genica. L'amplificazione è stata effettuata allestendo una nuova reazione tramite la combinazione di primers precedentemente descritti in letteratura capaci di amplificare un ampio frammento comprendente le regioni 5'UTR, Npro e parte della regione E0 (Sullivan e Akkina, 1995; Vilcek et al., 1994). Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti a sequenziamento automatico. L'allineamento genico delle sequenze è stato effettuato con il programma Clustal W, utilizzando sequenze disponibili sulle banche dati e sequenze precedentemente ottenute da ceppi virali isolati da bovini. L'analisi filogenetica delle regioni 5'UTR e Npro è stata condotta tramite il programma MEGA 4 (Tamura et al., 2007) utilizzando il metodo Neighbour-joining. L'attendibilità dell'analisi è stata valutata con il test di bootstrap 1000 ripetizioni.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - L'analisi filogenetica delle sequenze ha permesso l'attribuzione dei ceppi virali isolati a due specie all'interno del genere *Pestivirus*. In particolare, i due ceppi isolati nel 2011 (IC; MC) sono risultati appartenere alla specie BVDV-1. Il confronto con un ampio numero di sequenze geniche appartenenti a questa specie ha mostrato che si tratta di ceppi appartenenti al sottogruppo 1d. L'analisi della regione Npro ha confermato i risultati dell'analisi effettuata sulla regione 5'UTR. Non è stata evidenziata nessuna differenza significativa fra ceppi di BVDV-1 isolati da bovini rispetto a quelli isolati da ovini e caprini. I due ceppi virali isolati nel 2007 (PC; EO) hanno mostrato un'elevata identità nucleotidica (> 97%) fra loro, nonostante fossero stati isolati da specie diverse. La comparazione di questi due isolati con sequenze riconducibili a tutti i 7 sottogruppi di BDV hanno mostrato che i ceppi isolati in questo studio non rientrano in nessuno dei sottogruppi (BDV1-BDV7) fino ad ora attribuiti alla specie BDV. Si differenziano nettamente, quindi, dai recenti isolati italiani di BDV (Giam-

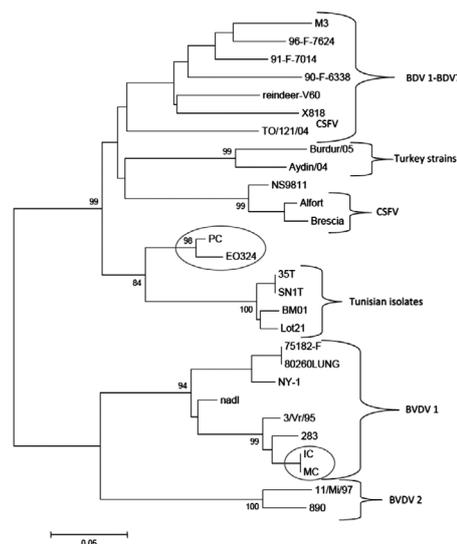


Figura 1 - Albero filogenetico *Pestivirus* isolati (PC, EO, IC, MC).

marioli et al., 2011) mentre mostrano maggiore similarità con gli "isolati Tunisini". In particolare l'analisi filogenetica colloca i ceppi ovini e caprini isolati nel 2007 in un sottocluster dei ceppi Tunisini (Fig. 1).

**CONCLUSIONI** - Sebbene in passato l'isolamento di *Pestivirus* da ovini e caprini fosse automaticamente interpretato come infezione da Border Disease Virus, molteplici studi hanno evidenziato la necessità di approfondimenti molecolari per conoscere la specie virale effettivamente coinvolta nell'infezione (Giammarioli et al., 2011; Pratelli et al., 2001). L'analisi genetica dei *Pestivirus* isolati in questo studio, infatti, ha permesso di evidenziare il coinvolgimento di due specie virali. Due *Pestivirus* isolati da capra nel 2011 sono stati attribuiti alla specie BVDV-1 ed in particolare al sottogruppo 1d, molto diffuso in Italia ma fino ad ora mai isolato in Sicilia (Cannella et al., 2011). Gli isolati del 2007, invece, sia di origine caprina che ovina sono da attribuire ad un nuovo gruppo della specie BDV. L'analisi effettuata quindi conferma la necessità dell'utilizzo delle tecniche di indagine molecolare ai fini dell'identificazione di specie nel caso di isolamenti di *Pestivirus* da ruminanti.

## Phylogenetic analysis of strains isolated from sheep and goats

**Key words:** *Pestivirus*, phylogenetic analysis, sheep, goats.

## Bibliografia

- Cannella V. et al. (2011), *Comp. Clin. Pathol.*; DOI 10.1007/s00580-011-1358-5.
- Decaro N. et al. (2011), *Emerg. Infect. Dis.*; 17: 1549-1552.
- Giammarioli M. et al. (2011), *Vet. Microbiol.*; 147: 231-236.
- Oguzoglu T.C. et al. (2009), *Vet. Microbiol.*; 135: 374-379.
- Nagai M. et al. (2008), *Virus Genes*; 36: 135-139.
- Pratelli A. et al. (2001), *Journal of Virology Methods*; 94: 81-85.
- Sullivan D.G. e Akkina R.K. (1995), *Virus Res.*; 38: 231-239.
- Tamura K. et al. (2007), *Molecular Biology and Evolution*; 24: 1596-1599.
- Thabti F. et al. (2005), *Arch. Virol.*; 150: 215-229.
- Vilcek S. et al. (1994), *Arch. Virol.*; 136: 309-323.

# Carcinoma mammario negli ovi-caprini: ruolo dei papillomavirus



F. SAVINI<sup>1</sup>, L. GALLINA<sup>1</sup>, A. SCAGLIARINI<sup>1</sup>, S. MIGNACCA<sup>2</sup>, P. DI MARCO<sup>2</sup>, G. PURPARI<sup>2</sup>, A. GUERCIO<sup>2</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>3</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Alma Mater Studiorum Università di Bologna<sup>2</sup>, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"<sup>3</sup>, Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino<sup>1</sup>

**Parole chiave:** ovini, carcinoma squamocellulare, papillomavirus.

**INTRODUZIONE** - Il carcinoma squamocellulare (SCC) è la più frequente forma di neoplasia cutanea degli ovini, ed è stata riscontrata in Australia, Brasile, Francia, Sud Africa e Spagna. Nei greggi le lesioni possono essere un'importante causa di perdita economica in quanto la localizzazione è frequentemente mammaria, ma possono riguardare anche vulva, perineo, orecchie, palpebre e naso. Tra i cofattori noti nel determinare l'insorgenza della patologia sono conosciuti gli alimenti immunosoppressori, e i raggi UV; la neoplasia si sviluppa infatti con maggiore frequenza in zone glabre e scarsamente pigmentate. Molti tipi di Papillomavirus (PV) dei vertebrati sono stati isolati da casi di SCC, e i più noti e studiati sono quelli dell'uomo (HPV). Negli ovini solo recentemente è stato isolato e caratterizzato OaPV-3 (*Ovis aries* Papillomavirus) in Sardegna da un SCC mammario in una pecora (Alberti *et al.*, 2010) mentre i tipi OaPV-1 e -2 sono stati costantemente associati a fibropapillomi. Tra il 2009 e il 2011 sono stati riportati diversi casi di carcinoma mammario in pecore di razza Comisana, Pinzirità e Valle del Belice di allevamenti ovi-caprini della Sicilia. Lo scopo del nostro studio è stato quello di caratterizzare istologicamente le lesioni e verificare la presenza di papillomavirus per stabilire una possibile associazione causale.

**MATERIALI E METODI** - I campioni analizzati erano costituiti da tessuti patologici prelevati tramite escissione chirurgica da ovini provenienti da diverse aree geografiche della Sicilia. Per ogni campione sono state preparate due aliquote, una per le indagini virologiche e una per l'esame istologico. Per quest'ultima indagine i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10%, inclusi in paraffina e le sezioni sono state colorate con ematosillina-eosina. Allo scopo di identificare la presenza di papillomavirus, il DNA è stato estratto con un kit commerciale e successivamente è stato amplificato mediante PCR e *Rolling Circle Amplification* (RCA). I primers utilizzati in PCR amplificano porzioni del gene L1 appartenente a diversi tipi di Papillomavirus. La copia di primers FAP 59-64 (Forsslund *et al.*, 1999) disegnata per amplificare il DNA di Papillomavirus umani (HPVs) è già stata utilizzata con successo anche per i PV di altre specie animali (Antonsson *et al.*, 2006); OCP 1s-2r amplificano specificatamente una porzione di 550 bp di papillomavirus ovi-caprini; mentre L1F-L1R amplificano specificatamente una porzione di 126 bp del gene L1 di OaPV 3. Ogni campione è stato amplificato anche con *Rolling Circle Amplification* utilizzando il protocollo recentemente ottimizzato per amplificare genomi completi di Papillomavirus (Rector *et al.*, 2004; Van Doorslaer *et al.*, 2006).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - All'esame istologico tutti i campioni eccetto uno hanno mostrato le tipiche lesioni istopatologiche del SCC caratterizzate da isole di cellule epiteliali variamente pleomorfe ripiene di materiale cheratinizzato e cellule in fase degenerativa che invadeva-

no il derma e/o il sottocute, associate ad un alto indice mitotico. Alcune lesioni mostravano una zona centrale di aspetto necrotico-caseoso ben delimitato. Uno dei casi, macroscopicamente descritto come lesione multipla con corni cutanei fusiformi in una pecora, ha mostrato all'esame istopatologico caratteristiche ascrivibili a papilloma. La lesione era infatti caratterizzata da evidente ipercheratosi superficiale e iperplasia dermica in forma di voluminose papille, supportate da stroma dermico fibro-vascolare. In tutti i casi identificati istologicamente come SCC non è stato possibile dimostrare la presenza di DNA di papillomavirus mentre nell'unico caso di papilloma, la PCR effettuata con i primers OaPV3 ha consentito di amplificare un frammento di DNA delle dimensioni attese. Infine, in tutti i casi da noi analizzati, la RCA non hanno permesso di identificare la presenza di genomi circolari.

**CONCLUSIONI** - In conclusione, i nostri risultati non permettono di affermare che i papillomavirus ad oggi identificati, possano essere definiti come agenti causali del carcinoma squamo cellulare negli ovini. I risultati negativi ottenuti mediante RCA hanno confermato l'assenza di materiale genetico di PV anche a livello episomiale, permettendo di escludere la possibilità di infezioni sostenute da PV non ancora identificati. La nostra indagine ci ha permesso di identificare la presenza di OaPV 3 in una lesione non carcinomatosa dimostrando che questo nuovo tipo virale è diffuso anche al di fuori della Sardegna ed il suo ruolo nella patogenesi del SCC potrebbe essere quello di co-fattore e non di agente causale. Infine, il risultato negativo in RCA merita ulteriori approfondimenti sulle possibilità di integrazione dell'acido nucleico di PV ovini nel genoma dell'ospite.

## ■ Mammary carcinoma in sheep and goat: role of papillomavirus

**Key words:** sheep, SCC, papillomavirus.

## Bibliografia

- Alberti A. Pirino S. Pintore F. Addis M. F. Chessa B. Cacciotto C. Cubeddu T. Anfossi A. Benenati G. Coraduzza E. Lecis R. Antuofermo E. Carcangiu L. Pittau M. (2010), *Virology*; 407(2): 352-359.
- Antonsson A. McMillan N.J. (2006), *Journal of general virology*; 87(11): 3195-200.
- Rector A. Bossart G. D. Ghim S. J. Sundberg J. P. Jenson A. B. Ranst M. V. (2004), *Journal of Virology*; 78(22): 12698-12702.
- Forsslund O. Antonsson A. Nordin P. Stenquist B. Hansson B. G. (1999), *Journal of General Virology*; 80 (9): 2437-43.
- Van Doorslaer K. Rector A. Vos P. Van Ranst M. (2006), *Virus Research*; 118 (1-2):164-169.

# Effetto terapeutico di un vaccino inattivato in corso di infezione da *M. agalactiae*



G.R. LORIA<sup>1</sup>, R. PULEIO<sup>1</sup>, A. TAMBURELLO<sup>1</sup>, F. MESSINA<sup>1</sup>, S. AGNELLO<sup>1</sup>, C. PRUDENTE<sup>1</sup>, G. MAROGNA<sup>2</sup>, S. TOLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreff" - Dipartimento di Produzioni

**Parole chiave:** agalassia contagiosa, vaccinazione, terapia.

**INTRODUZIONE** - La vaccinazione di pazienti malati è una procedura sconsigliata in Medicina Umana per la rischiosa possibilità di esacerbare la sintomatologia clinica. *Succede lo stesso in Medicina Veterinaria?* Gli autori presentano uno studio condotto in Sicilia durante un grave focolaio di agalassia contagiosa, in cui un limitato numero di pecore in lattazione sono state vaccinate in presenza di segni clinici/escrezione del micoplasma. Gli animali del gregge (affetti e sani) sono stati trattati mediante somministrazione del vaccino *M. agalactiae* ( $10^8$  CFU/ml) inattivato con saponina (2mg/ml) seguito da richiamo. Scopo del presente studio è stato quello di valutare il potenziale effetto benefico del vaccino nello stimolare il sistema immunitario degli animali già ammalati. L'azienda oggetto dell'indagine è ubicata nel territorio di Mazzarino (Enna), costituita da circa 1000 animali. Il giorno del sopralluogo il proprietario aveva isolato n. 30 soggetti clinicamente sospetti, di questi n. 11 venivano selezionati per l'esperimento in quanto già escretori del patogeno a titoli variabili (da  $10^3$  a  $10^8$  CFU/ml).

**INDAGINI CLINICHE E DI LABORATORIO** - Sul gruppo di 11 pecore, l'esame clinico veniva registrato tramite una scheda di campo (edita dal CRN Mastopatie Ovine e Caprini), mentre i test di laboratorio (isolamento del micoplasma e ricerca anticorpi con metodo ELISA ed Immunoblotting) venivano condotti su campioni di sangue e latte raccolti in quattro successivi sopralluoghi, effettuati con un intervallo di 15 gg a partire dalla prima vaccinazione (somministrata il giorno del primo sopralluogo). I campioni di latte in piccola aliquota (300 µl), venivano posti in coltura secondo procedure standard (Nicholas and Baker, 1998). I campioni di latte venivano ulteriormente coltivati in 5% sheep blood agar (Merck, Darmstadt, Germany) per evidenziare eventuali altri patogeni. I ceppi isolati venivano poi identificati secondo metodi biochimici (Poveda et al., 1998) e molecolari (16S rRNA gene PCR) come descritto da McAuliffe (2003, 2005). Ulteriori approfondimenti per la ricerca anticorpi sia nel siero che nel latte venivano condotti tramite un kit ELISA commerciale (Pourquier-Cedex France) ed Immunoblotting come descritto da Tola (1997).

**RISULTATI E COMMENTI** - I risultati degli esami clinici e di laboratorio sono riassunti nelle Tabelle 1 e 2. La vaccinazione, per oltre la metà dei soggetti osservati, ha portato ad un miglioramento nella qualità del latte, ad una progressiva normalizzazione delle emimammelle colpite, sia nel volume che nella consistenza alla palpazione. La ripresa della lattazione, in alcuni casi, riguardava soltanto una singola emimammella. L'escrezione del patogeno è progressivamente diminuita in 7 pecore per estinguersi del tutto nell'ultimo campionamento. Soltanto un singolo animale non ha registrato alcun miglioramento. Il test ELISA eseguito su campioni di siero in fase acuta durante il primo sopralluogo è risultato negativo per la presenza di anticorpi anti-*M. Agalactiae* in 8 pecore (confermando la fase iniziale del focolaio). A ciò ha fatto seguito una costante e sempre più intensa comparsa delle IgG, a partire dal secondo sopralluogo (2 settimane dopo). L'Immunoblotting ha confermato i risultati dell'ELISA mostrando caratteristiche bande soltanto dopo 15 giorni dall'escrezione del patogeno nel latte. I test di laboratorio utilizzati in questo studio preliminare non aggiungono nuove conoscenze sulla malattia: gli anticorpi sono comparsi sia nel siero che nel latte soltanto dopo la seconda settimana di infezione ed i loro differenti livelli umorali non sono risultati correlabili alla gravità della sintomatologia clinica dei soggetti. Tuttavia queste osservazioni preliminari mostrano l'evidenza di un miglioramento clinico della mammella in oltre il 50% degli 11 esaminati, ed una diminuzione dell'escrezione dell'antigene nell'ambiente dopo vaccinazione. Non è stata osservata alcuna esacerbazione dei sintomi anche se uno studio più approfondito è necessario per supportare queste ipotesi.

**Tabella 1**

Sheep n°	Day 0	Day 15	Day 30	Day 45
10	neg.	3x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>3</sup>	3x10 <sup>3</sup>
12	18x10 <sup>7</sup>	15x10 <sup>5</sup>	1x10 <sup>3</sup>	neg.
13	5x10 <sup>5</sup>	4x10 <sup>3</sup>	neg.	neg.
21192	neg.	50x10 <sup>6</sup>	2x10 <sup>6</sup>	25x10 <sup>4</sup>
21258	2x10 <sup>8</sup>	4x10 <sup>5</sup>	20x10 <sup>3</sup>	asc.
47826	115x10 <sup>8</sup>	8x10 <sup>7</sup>	1x10 <sup>4</sup>	neg.
47837	15x10 <sup>3</sup>	4x10 <sup>3</sup>	neg.	neg.
65023	17x10 <sup>6</sup>	12x10 <sup>7</sup>	4x10 <sup>6</sup>	asc.
90070	3x10 <sup>5</sup>	18x10 <sup>7</sup>	7x10 <sup>6</sup>	neg.
90085	83x10 <sup>8</sup>	13x10 <sup>7</sup>	20x10 <sup>3</sup>	neg.
65023	19x10 <sup>6</sup>	23x10 <sup>5</sup>	neg.	neg.

**Tabella 2**

Sheep n°	Day 0	Day 15	Day 30	Day 45
10	neg.	96	66	126
12	neg.	92	74	122
13	72	99	100	36
21192	neg.	98	115	141
21258	neg.	88	65	127
47826	neg.	93	100	122
47837	72	98	80	110
65023	neg.	72	101	69
90070	neg.	79	112	114
90085	neg.	87	40	82
65203	neg.	92	103	56

## ■ Therapeutic effect of an inactivated vaccine against CA

**Key words:** contagious agalactia, immunization, clinical examination.

## Bibliografia

- Nicholas R.A.J. (2008) Ovine mycoplasmal infections. *Small Rum. Research*, 76: 92-98.
- Emanuele M.C. (2004) Prevalenza dell'agalassia contagiosa in Sicilia. In: Atti del XIII Congresso SIPAOC, Siena 29/9-2/10 2004, pag. 158.
- J.B. Bashiruddin (1998) Extraction of DNA from mycoplasmas. In: Miles R.J. and Nicholas R.A.J. (Editors).
- Mycoplasma protocols, Methods in molecular biology*, vol. 104, Humana Books Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 141-144.
- Nicholas, R.A.J. (1998) Recovery of *Mycoplasma* from animals. In: Miles R.J. and Nicholas R.A.J. (Editors) *Mycoplasma protocols, Methods in molecular biology*, vol. 104, Humana Books Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 37-43.
- Tola S. (1997). Characterisation of membrane surface proteins of *Mycoplasma agalactiae* during natural infection. *FEMS Microbiol. Lett.*, 154, 355-362.

# Lesioni istopatologiche e pattern immunoistochimico in corso di infezione da *Mycoplasma mycoides subs. capri* in capre siciliane



R. PULEIO, S. AGNELLO, R. NICHOLAS<sup>1</sup>, G.R. LORIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy

<sup>1</sup> Mycoplasma Laboratory, Animal Health and Veterinary Laboratories Agency(AHVLA)- Weybridge, UK

**Parole chiave:** *Mycoplasma mycoides subs. capri*, capre, Sicilia.

**INTRODUZIONE** - *M. mycoides subs. capri* precedentemente classificato come *M. mycoides Large Colony* (Edy, 2006, Masoud Shahram, 2010), è stato segnalato in diverse regioni italiane. In questo studio gli autori descrivono le lesioni osservate nel corso di un grave focolaio di malattia registrato in una azienda zootecnica ubicata nel comune di Sperlinga (Provincia di Enna). L'infezione era caratterizzata da alta morbilità ( $\geq 50\%$  dei capretti) e mortalità (circa il 90% dei soggetti colpiti). I soggetti colpiti erano prevalentemente capretti in fase di svezzamento (7-30 giorni) i cui sintomi clinici principali erano costituiti da febbre elevata (41°-42°C) ed una severa poliartrite estesa a tutti e quattro gli arti, particolarmente evidente su carpi e tarsi. Le capre adulte non sembravano affette fatta eccezione per due soggetti che mostravano coinvolgimento dell'articolazione del carpo.

**MATERIALI E METODI** - Da n. 10 soggetti deceduti spontaneamente, si procedeva al prelievo del liquido articolare per tutte le articolazioni colpite, di tamponi nasali e congiuntivali; veniva inoltre prelevato il sangue ed il latte dalle madri dei soggetti infetti (apparentemente sane). Su quattro capretti è stato effettuato l'esame anatomopatologico completo. Sul siero veniva effettuata la ricerca di anticorpi anti-*M. agalactiae*, con tecnica ELISA per escludere la presenza di una eventuale coinfezione (Check-kit Agalactiae, Pourquier, France). Liquido articolare, tamponi congiuntivali, tamponi nasali, e latte sono state impiegate come matrici per l'esame colturale microbiologico effettuato entro le 24 ore dal prelievo secondo procedure standard (Nicholas e Baker, 1998). All'isolamento in coltura seguiva la conferma eziologica tramite PCR (McAuliffe *et al.*, 2005). Durante l'esame necroscopico si prelevavano porzioni di tessuto per l'esame istologico ed immunoistochimico, previa fissazione in formalina tamponata al 10% ed inclusione in paraffina secondo le procedure convenzionali. Le sezioni ottenute al microtomo venivano colorate con Ematossilina-Eosina, e con tecniche di immunoistochimica (LSAB kit Dako). L'anticorpo primario (AB policlonale di coniglio anti-*Mycoplasma myc. sub. capri*) è stato fornito dal AHVLA di Weybridge, utilizzando un controllo interno positivo, costruito in laboratorio secondo la tecnica di Recordati (2008).

**RISULTATI** - Gli esami di laboratorio (microbiologici e PCR) hanno confermato la presenza di *M. mycoides subs. capri* isolato dal liquido articolare. Gli esami sierologici sono risultati tutti negativi per anticorpi contro *M. agalactiae*. Al tavolo autoptico, si osservava una poliartrite con presenza di esudato sierofibrinoso e ispessimento della sinoviale. I linfonodi prescapolari, poplitei ed inguinali erano aumentati di volume, edematosi, talvolta emorragici. Un solo capretto presentava polmonite, pleurite, pericardite, epicardite, atrofia del timo, ed aspetto degenerato del parenchima renale. Le lesioni istologiche interessavano i polmoni, il cuore e con costanza le articolazioni e i linfonodi tributari, in cui si evidenziavano congestione ed emorragie. Il polmone mostrava polmonite interstiziale con atelettasia ed enfisema, associata a trombosi (Fig. 2). Le lesioni istologiche a carico delle articolazioni evidenziavano edema, iperplasia ed infiltrazione di macrofagi e linfociti nella capsula sinoviale e dei tessuti periarticolari, con accumulo di fibrina all'interno del lume articolare che spesso riempiva completamente la cavità (Fig. 1). I linfonodi tributari evidenziavano una linfadenite reattiva iperplastica (Fig. 3). Le indagini immunoistochimiche mostravano la

## QUADRI ISTOLOGICI DEGLI ORGANI COINVOLTI

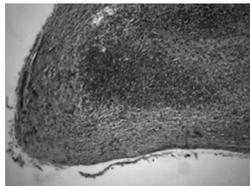


Figura 1 - Sinovia E-E 10x

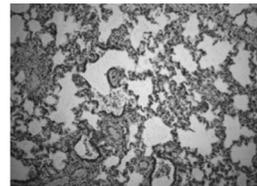


Figura 2 - Polmone E-E 20x

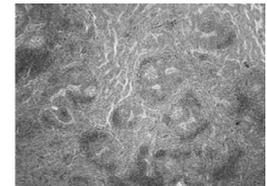


Figura 3 - Linfonodo E-E 10x

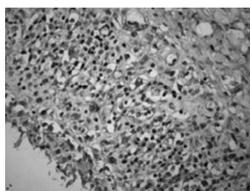


Figura 4 - IHC Sinovia 20x

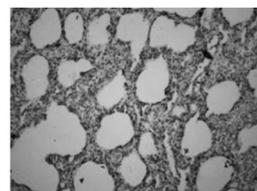


Figura 5 - IHC Polmone 20x

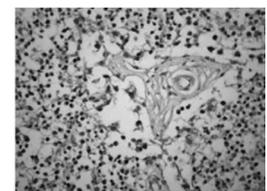


Figura 6 - IHC Linfonodo 20x

presenza dell'antigene *Mycoplasma mycoides subs. capri* nelle aree ove la reazione infiammatoria era maggiormente evidente, sia a carico del polmone, che nelle articolazioni coinvolte (Figg. 4, 5, 6).

**DISCUSSIONE** - *M. mycoides subspecies capri* è stato isolato durante un episodio di malattia setticemica ad alta mortalità in un gruppo di capretti durante lo svezzamento. Gli esami microbiologici e di biologia molecolare insieme agli esami istologici e immunoistochimici confermano l'ipotesi eziologica avanzata durante la visita clinica e rafforzata con gli esami anatomopatologici.

Alcuni studi hanno descritto, episodi di malattia paucisintomatici o asintomatici, sostenuti da *M. mycoides subs. capri*, riguardanti soprattutto soggetti adulti ritenuti responsabili della diffusione della malattia in allevamenti indenni (Bergonier 1997).

Tali evidenze impongono una stretta sorveglianza relativa all'introduzione di animali in una azienda zootecnica (controlli microbiologici e PCR) e severe misure di quarantena.

## ■ Histopathology and immunohistochemistry induced by *Mycoplasma mycoides subs. capri*

**Key words:** *Mycoplasma mycoides subs. capri*, goat, Sicily.

## Bibliografia

- Masoud Shahram, Robin A.J. Nicholas, Ann P. Wood and Donovan P. Kelly (2010), Further evidence to justify reassignment of *Mycoplasma mycoides subspecies mycoides Large Colony* type to *Mycoplasma mycoides subspecies capri*. *Systematic and Applied Microbiology*; 33 (1): 20 -24.
- McAuliffe L, Ellis RJ, Lawes JR, Ayling RD, Nicholas RA. (2005), 16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis; a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species. *J. Med. Microbiol.*; 54:731-9.
- Nicholas R.A.J. and Baker S.E.(1998). Recovery of mycoplasmas from animals. In: Miles R.J. and Nicholas R.A.J. Eds *Mycoplasma Protocols*. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp.37-44.
- Recordati C., Radaelli E., Simpson K.W., Scanziani E. (2008), A simple method for the production of bacterial controls for immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *J. Mol. Hist.* 39:459-462.

# Effetto del genotipo sulla PrP<sup>res</sup> in ovini infettati con scrapie, BSE e BASE



S. MIGLIORE<sup>1</sup>, C. D'AGOSTINO<sup>1</sup>, S. MARCON<sup>1</sup>, M.A. DI BARI<sup>1</sup>, G. VACCARI<sup>1</sup>, E. ESPOSITO<sup>1</sup>, E. SEZZI<sup>2</sup>, B. CHIAPPINI<sup>1</sup>, M. CONTE<sup>1</sup>, L. DE GROSSI<sup>2</sup>, C. CASALONE<sup>3</sup>, U. AGRIMI<sup>1</sup>, R. NONNO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare, Roma, Italia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Italia

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Italia

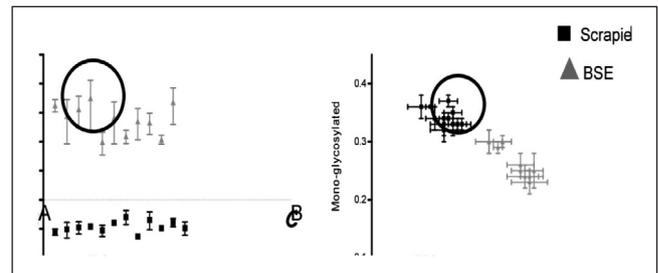
**Parole chiave:** PrP, EST, epitope mapping, PrP<sup>res</sup>.

**INTRODUZIONE** - Le caratteristiche molecolari della PrP<sup>res</sup> vengono studiate per distinguere i ceppi di Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (EST). Test molecolari hanno trovato applicazione anche nella sorveglianza delle EST ovi-caprine, al fine di individuare l'eventuale presenza dell'agente della BSE nella popolazione Europea, con conseguente diffusione e rischio per la salute pubblica. Questo studio ha lo scopo di valutare l'effetto del genotipo della PrP dell'ospite sulle caratteristiche molecolari della PrP<sup>res</sup> in ovini infettati con scrapie, BSE e BASE bovina. A tale scopo ci siamo avvalsi dell'ISSDWB (Western Blot) usato nella sorveglianza italiana per la discriminazione dei ceppi delle EST negli ovi-caprini, testandone l'adeguatezza in diverse condizioni sperimentali.

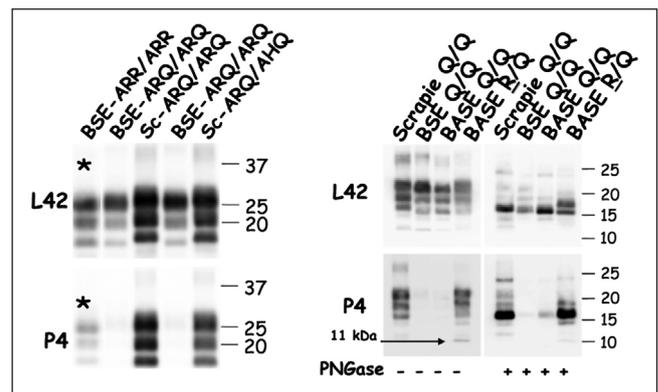
**MATERIALI E METODI** - 56 ovini di razza sarda, sono stati infettati per via intracerebrale con Scrapie (n=19), BSE bovina (n=14) e BASE bovina (n=23). Le pecore inoculate presentavano in omozigosi o in eterozigosi alleli suscettibili alle EST (che codificano nelle posizioni 136, 154 e 171 della PrP per gli amminoacidi Ala, Arg/His e Glu) e l'allele ARR ritenuto resistente. La PrP<sup>sc</sup> estratta dal SNC, è stata analizzata dopo digestione con proteinasi K (PrP<sup>res</sup>) per mezzo dell'ISSDWB, valutando i tre parametri molecolari previsti dal metodo: peso molecolare apparente, rapporto tra anticorpi C-terminali e N-terminali (L42/P4) e glicotipo. I parametri in questione sono stati confrontati statisticamente usando il test ANOVA a una via.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati della sperimentazione hanno mostrato che il genotipo della PrP, influenza in maniera determinante la suscettibilità a scrapie, BSE e BASE ed i relativi tempi di incubazione. Infatti gli animali con genotipo ARQ/ARQ hanno mostrato sintomatologia clinica dai 16 ai 30 mesi post-infezione (m.p.i.). L'allele ARR, sulla cui selezione si basano i piani di eradicazione della scrapie, conferisce protezione nei confronti della scrapie, sia in omozigosi che in eterozigosi. Al contrario, soggetti ARR/ARR, ma non ARR/ARQ, si sono ammalati in seguito ad infezione con BSE, seppur con un lungo tempo di incubazione (> 48 m.p.i.). Tra le pecore infettate con la BASE, gli ARR omozigoti dopo 85 m.p.i. risultavano ancora in vita, mentre i soggetti ARQ/ARR, sono risultati suscettibili all'infezione, seppur con un lungo tempo di incubazione (> 50 m.p.i.). La caratterizzazione della PrP<sup>res</sup> tramite l'ISSDWB, ha permesso di discriminare chiaramente i campioni di scrapie da quelli di BSE, indipendentemente dal genotipo dell'ospite. Tutti i campioni di BSE, hanno mostrato un rapporto relativo tra L42 e P4 maggiore di 2 (valore soglia previsto dal metodo) (Fig. 1A). La discriminazione della BSE è stata anche confermata dall'analisi del glicotipo (Fig. 1B). Tuttavia, tra i campioni di BSE è emersa variabilità molecolare in associazione al genotipo. Infatti le caratteristiche molecolari dei soggetti ARR/ARR, risultano più vicine a quelle della scrapie, pur permanendo differenze statisticamente significative ( $P > 0,0001$ ) che ne permettono la discriminazione tramite ISSDWB (Fig. 1).

Inoltre, i casi di scrapie, hanno mostrato lo stesso pattern molecolare, indipendentemente dall'anticorpo usato. Per contro, i campioni di BSE sono risultati poco riconosciuti e quindi discriminati dall'anticorpo P4 (Fig. 2). Gli ovini infettati con BASE, hanno mostrato un notevole effetto del genotipo sulla PrP<sup>res</sup> che ha permesso di distinguere all'interno del gruppo i soggetti ARQ/ARQ da quelli ARQ/ARR. Infatti, dopo deglicosilazione, gli ARQ/ARQ, mostrano un unico frammento di PrP<sup>res</sup> di 17 kDa poco riconosciuto dall'anticorpo P4, simile nella BSE e nella BASE bovina (Fig. 2). Al contrario, i campioni di BASE ARQ/ARR sono riconosciuti dal P4 e mostrano 3 differenti frammenti: 19 kDa e 11 kDa, tipici dei soggetti ARQ/ARR e 17 kDa simile negli ARQ/ARQ infettati con BSE e BASE (Fig. 2).



**Figura 1** - Grafici rappresentanti il rapporto tra L42 e P4 (A) e il glicotipo (B). I soggetti ARR/ARR BSE positivi sono quelli cerchiati.



**Figura 2** - Western blots rappresentativi raffiguranti campioni con diverso genotipo della PrP dell'ospite.

**CONCLUSIONI** - L'ISSDWB si è mostrato capace di discriminare tra i campioni di scrapie, BSE e BASE, indipendentemente dal genotipo della PrP dell'ospite. Tuttavia, nella BSE e soprattutto nella BASE, la presenza dell'allele ARR ha mostrato effetti sulle caratteristiche della PrP<sup>res</sup>. Ciò ci fa ipotizzare che la variazione di un singolo amminoacido nella PrP dell'ospite può influenzare le caratteristiche della PrP<sup>res</sup> e, di conseguenza, anche l'abilità dei test discriminativi meno sensibili dell'ISSDWB.

■ **Effect of genotype on PrP<sup>res</sup> in sheep infected with scrapie, BSE and BASE**

**Key words:** PrP, TSE, epitope mapping, PrP<sup>res</sup>.

## Bibliografia

- Vaccari, G., D'Agostino, C., Nonno, R., Rosone, F., Conte, M., Di Bari, M. A., Chiappini, B., Esposito, E., De Grossi, L. & other authors (2007). *J Virol* 81, 7306-7309.
- Pirsinu, L., Migliore, S., Di Bari, M. A., Esposito, E., Baron, T., D'Agostino, C., De Grossi, L., Vaccari, G., Agrimi, U. & Nonno, R. *Emerging Infectious Disease* (2011) 17, 695-698.
- Migliore, S., Esposito, E., Pirsinu, L., Marcon, S., Di Bari, M., D'Agostino, C., Chiappini, B., Conte, M., Sezzi, E., De Grossi, L., Agrimi, U., Vaccari, G. & Nonno, R. *Journal of General Virology* (2012), 93, 450-455.

# Diffusione di *Cryptosporidium* e *Giardia spp.* in aziende ovine e caprine della Sicilia



S. AGNELLO, M. VITALE, F. CAMPO, A. STANCANELLI, C. RUSSO,  
A. PIZZIMENTI, V. DI MARCO LO PRESTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, Sicilia.

**INTRODUZIONE** - I protozoi appartenenti ai generi *Giardia* e *Cryptosporidium spp.* sono frequentemente agenti eziologici di infezioni enteriche sia nell'uomo che negli animali. Negli allevamenti ovin e caprini l'infezione da parte di questi protozoi, spesso sottovalutata, può determinare l'insorgenza di diarrea neonatale con alti tassi di mortalità e morbilità. Le oocisti di *Cryptosporidi* e le cisti di *Giardia* sopravvivono a lungo nelle acque contaminate trasmettendo l'infezione agli animali e all'uomo. Per entrambi i parassiti è riportata anche una trasmissione diretta (Rose et al., 2002; Smith e Grimason, 2003). Entrambi i generi includono molteplici specie, all'interno delle quali esiste una grande variabilità fenotipica e genotipica ed in particolare un differente potenziale zoonotico (Cacciò et al., 1999; Xiao et al., 2004; Monis et al., 2003; Rimhanen-Finne et al., 2001; Cacciò et al., 2003). Sulla base delle indicazioni cliniche, delle perdite in termini di produzione e considerando anche il potenziale zoonotico di entrambi i protozoi, è stato intrapreso uno studio per indagare la prevalenza di *Giardia spp.* e di *Cryptosporidium spp.* in ovin e caprini, di aziende zootecniche Siciliane.

**MATERIALI E METODI** - In questo studio sono stati campionati 984 animali appartenenti a 165 aziende, per lo più presso i macelli presenti sul territorio. La popolazione di riferimento era composta da 8.734 aziende ovi-caprine presenti sul territorio siciliano. Allo scopo di verificare la presenza di *Giardia spp.* e di *Cryptosporidium spp.* negli allevamenti si è applicato uno schema di campionamento utile a determinare la prevalenza con un dato livello di accuratezza (errore standard). Per il calcolo della dimensione campionaria, pari a 136 aziende da saggiare, è stata considerata una prevalenza del 10% con un errore massimo ammesso nella determinazione della stima del livello di prevalenza (5%) ed un livello di confidenza che fornisce l'indicazione sulla veridicità dei risultati ottenuti (95%). Tuttavia, sono state campionate un numero maggiore di aziende rispetto alle 136 previste, per un ammontare di 165 aziende. È stato impiegato il metodo di campionamento stratificato proporzionalmente per provincia. In ogni azienda sono stati raccolti campioni di feci, direttamente dall'ampolla rettale in 6-7 animali e successivamente raggruppati in un unico pool fecale. L'età era compresa tra 1 e 16 settimane di vita, con maggiore frequenza tra le 4 e le 5 settimane. I campionamenti sono stati effettuati dal 2010 al 2012, durante le stagioni autunnali e primaverili. Per l'identificazione delle oocisti/cisti nel materiale fecale sono state utilizzate due diverse tecniche diagnostiche: l'Immunofluorescenza e l'Elisa. Per l'immunofluorescenza è stato utilizzato il MERIFLUOR C/G, (Meridian Diagnostic) un test per la ricerca simultanea di oocisti di *Cryptosporidium* e cisti di *Giardia*. Mentre per l'ELISA sono stati utilizzati due test il RIDASCREEN *Giardia* e il RIDASCREEN *Cryptosporidium* (r-Biopharm).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Dai dati emersi si evidenzia come nel 50,3% delle aziende controllate almeno uno dei due protozoi era presente (Tab. 1). L'infezione simultanea è stata riscontrata solo in 10 aziende. La prevalenza complessiva per *Giardia spp.* è stata del 41,21% per IFD e 15,15% per ELISA, mentre per *Cryptosporidium spp.* si sono riscontrati livelli del 15,15% per IFD e 5,45% per ELISA. Dalla lettura dei dati riportati si evidenzia come *Giardia* sia più presente sul territorio rispetto a *Cryptosporidium* e che il test IFD riscontra più del doppio di positività rispetto ad Elisa. Tutti i campioni positivi e alcuni negativi

**Tabella 1** - Diffusione di *Giardia spp.* e *Cryptosporidium spp.* nel territorio siciliano.

Provincia	Totale Aziende saggiate	Giardia		Cryptosporidium	
		IFD pos (P.%)	Elisa pos (P.%)	IFD pos (P.%)	Elisa pos (P.%)
AG	33	15 (45,45%)	4 (12,12%)	5 (15,15%)	1 (3,03%)
CL	20	9 (45,00%)	3 (15,00%)	5 (25,00%)	5 (25,00%)
CT	9	3 (33,33%)	2 (22,22%)	1 (11,11%)	0 (0,00%)
EN	28	9 (2,14%)	4 (14,29%)	3 (10,71%)	1 (3,57%)
ME	19	7 (36,84%)	1 (5,26%)	1 (5,26%)	0 (0,00%)
PA	24	13 (54,17%)	6 (25,00%)	4 (16,67%)	1 (4,17%)
RG	11	3 (7,27%)	2 (18,18%)	4 (36,36%)	1 (9,09%)
SR	8	5 (62,50%)	1 (12,50%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
TP	13	4 (30,77%)	2 (15,38%)	2 (15,38%)	0 (0,00%)
SICILIA	165	68 (41,21%)	25 (15,15%)	25 (15,15%)	9 (5,45%)

sono anche stati saggiati dal punto di vista molecolare con PCR specifiche dopo estrazione di DNA dalle feci congelate. Le positività sierologiche venivano confermate nel saggio molecolare rispettivamente nel 70% dei casi per *Giardia spp.* e nel 60% per *Cryptosporidium spp.*

**CONCLUSIONI** - Questo studio rappresenta la prima indagine di tipo quantitativo su ampio raggio per la ricerca di *Giardia* e *Cryptosporidium spp.* in Sicilia e dimostra che i due protozoi sono ampiamente presenti nei piccoli ruminanti delle aziende zootecniche. Tuttavia, sono necessari ulteriori studi per valutare pienamente l'impatto dell'infezione sulla produzione animale, e studi di epidemiologia molecolare per identificare i genotipi circolanti e i loro reali rischi zoonotici.

**RINGRAZIAMENTI** - Lavoro eseguito con il contributo della Ricerca Corrente IZS Si 13/08. Gli autori ringraziano i collaboratori P. Taibi, V. Pilato, E. Fascetto, S. Sabella, I. Costa, C. Cammarata, G. Failla, M. La Giglia per il supporto tecnico a sostegno di questo studio.

## ■ *Cryptosporidium* and *Giardia spp.* distribution in sheep and goat farms of Sicily

**Key words:** *Cryptosporidium spp.*, *Giardia spp.*, Sicily.

## Bibliografia

- S.M. Caccio (2004) *Parassitologia* 46: 151-155.  
M. Ruggeri, R. Damiani, F. Bencetti, A.R. di Cerbo, M.T. Manfredi. (2008) *suppl. Large Animal Review*; 14: 220.  
Aloisi et al. (2006) *Veterinary Parasitology* 142:154-158.  
J.A. Castro-Hermida et al. (2007) *Small Ruminant Research* 72:96-100.

# Le condizioni del mantello sono un valido indicatore di benessere nella capra?



M. BATTINI<sup>1</sup>, L. GROSSO<sup>1</sup>, S. BARBIERI<sup>1</sup>, I. AJUDA<sup>2</sup>, A. VIEIRA<sup>2</sup>, G. STILWELL<sup>2</sup>, S. MATTIELLO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Università degli Studi di Milano, Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica

<sup>2</sup> Faculdade Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa (Portugal)

**Parole chiave:** benessere, salute, capra, pelo.

**INTRODUZIONE** - Il seguente studio si inserisce nel più ampio progetto europeo AWIN (*Animal Welfare Indicators*) che, tra i diversi obiettivi, prevede la stesura di un protocollo di valutazione del benessere in campo per la specie caprina, utilizzando indicatori diretti. Tali indicatori devono avere alcune caratteristiche: oltre ad essere validi e ripetibili, devono essere facilmente e rapidamente osservabili (Blokhuis *et al.*, 2006; Knierim e Wincler, 2009). Accogliendo i suggerimenti di allevatori e tecnici del settore, è nata l'idea di indagare se le condizioni del mantello possano essere indicative dello stato di benessere nelle capre. Le cause di un mantello in cattive condizioni possono essere riconducibili a carenze alimentari e di minerali (Lengarite *et al.*, 2012), infestazioni parassitarie (Veit *et al.*, 1993; Sarkar *et al.*, 2010) o patologie croniche debilitanti (Smith e Sherman, 2009). Lo scopo di questo progetto è quello di confrontare lo stato di salute di capre con un mantello in buone condizioni con quello di capre con un mantello in cattive condizioni, al fine di verificare la possibilità di utilizzare questo parametro come indicatore diretto di benessere animale.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato effettuato su 30 capre Saanen in lattazione allevate nella stessa azienda intensiva nella regione di Benavente (PT): 15 capre presentavano pelo ruvido e opaco (A = "arruffato") e 15 pelo liscio e lucido (N = "normale"). I due gruppi erano simili per età, numero di parti e stadio produttivo. Tutte le capre sono state sottoposte a visita clinica completa (temperatura rettale, frequenza cardiaca e respiratoria, rumori polmonari e ruminali, colorazione delle mucose), prelievo del sangue e taglio del pelo per analisi delle carenze di minerali (rame, cobalto e zinco; Moraes, 2001), raschiato cutaneo e raccolta delle feci per la ricerca di ecto- (acari) ed endo-parassiti (uova di nematodi gastrointestinali e di acari, oocisti di eimeria). Inoltre, sono stati annotati la presenza di ascessi cutanei e lo stato corporeo degli animali (BCS: 0=troppo magra; 1=normale; 2=troppo grassa), valutato mediante palpazione della regione sternale e lombare. La scala semplificata utilizzata in questo studio è stata ritenuta utile per evidenziare le condizioni corporee estreme: questo metodo è stato già adottato in altri protocolli di valutazione del benessere animale (ad esempio, nei bovini; Welfare Quality<sup>®</sup> consortium, 2009). Le variabili continue sono state confrontate mediante analisi della varianza non parametrica (T di Student), mentre le frequenze delle variabili categoriche sono state confrontate mediante test esatto di Fisher.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La temperatura rettale e la frequenza respiratoria non hanno manifestato differenze tra i due gruppi, mentre la frequenza cardiaca è risultata maggiore nel gruppo A che nel gruppo N (A:113,83±15,26 vs N=97,73±28,47; P=0,06), superando notevolmente in A il range di riferimento per tale parametro (70-95 bpm; Smith e Sherman, 2009).

Le condizioni nutrizionali e sanitarie relative alla maggior parte dei parametri indagati sono risultate più scadenti nelle capre del gruppo A (Tab. 1).

Contrariamente alle aspettative, le condizioni del mantello non sono state influenzate dalla presenza di infestazioni parassitarie: infatti, non sono stati trovati campioni positivi alla presenza di ecto- ed endo-

**Tabella 1** - Percentuale di problemi riscontrati in capre con mantello normale (N) e arruffato (A), e relative differenze statistiche (test esatto di Fisher).

	N	A	P	Sig.
troppo magre (stern)	6,67	40,00	0,03	*
troppo magre (lomb)	6,67	66,67	0,000	***
mucosa anormale	0,00	13,33	0,24	n.s.
rumori ruminali	0,00	6,67	0,50	n.s.
rumori polmonari	0,00	53,33	0,001	***
presenza di ascessi	20,00	46,67	0,10	n.s.

rassiti, nonostante l'azienda non attui un piano regolare di trattamenti antiparassitari sulle capre in lattazione. Sono attualmente in corso le analisi del sangue (siero) e del pelo per evidenziare eventuali carenze di minerali.

**CONCLUSIONI** - I risultati preliminari sono incoraggianti per affermare che le condizioni del mantello possono rappresentare un valido indicatore della condizione di benessere nelle capre. Saranno necessari ulteriori studi per confermare i dati osservati e per definire correttamente ed in modo univoco tale indicatore.

## Is hair condition a good welfare indicator in goats?

**Key words:** welfare, health, goat, hair.

## Bibliografia

- Blokhuis H.J., Jones R.B., Veissier I., Geers R. (2006), COST Action 846 Measuring and Monitoring farm animal welfare. K.U. Leven.
- Franzmann A.W., Flynn A., Arneson P.D. (1975), *Journal of Wildlife Management*; 39 (2): 374-378. - Knierim U., Wincler C. (2009), *Animal Welfare*; 18: 451-458.
- Lengarite M.I., Mbugua P.N., Gachuri C.K., Kabuage L.W. (2012), *Livestock Research for Rural Development*; 24 (4): Article 57.
- Lund V., Algers B. (2003), *Livestock Production Science*; 80: 55-68.
- Moraes, S.S. (2001), *Principais deficiências minerais em bovinos de corte*; 17-21.
- Smith M.C., Sherman D.M. (2009), *Goat medicine*. Second edition. Wiley-Blackwell.
- Sarkar M., Rahman S.A., Sarker B.K., Anisuzzaman, Begum N., Mondal M.M.H. (2010), *Bangladesh Journal of Veterinary Medicine*; 8 (1): 41-50.
- Veit H.P., McCarthy F., Friedericks J., Cashin M., Angert R. (1993). *Revue d'Élevage et de Médecine Vétérinaire des Pays Tropicaux*; 46 (1-2): 27-38.
- Welfare Quality<sup>®</sup> consortium Lelystad, The Netherlands (2009), *Welfare Quality<sup>®</sup> Assessment protocol for cattle*.

# Prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo micronizzato (VALBAZEN 1,9%) verso *Dicrocoelium dendriticum* in ovini naturalmente parassitati



A. BOSCO<sup>1</sup>, L. RINALDI<sup>1</sup>, V. SALAMINA<sup>2</sup>, M. SANTANIELLO<sup>1</sup>, M.E. MORGOGNONE<sup>1</sup>, I. GUARIGLIA<sup>1</sup>, G. CAPPELLI<sup>1</sup>, A. SCALA<sup>3</sup>, G. CRINGOLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Settore di Parassitologia e Malattie Parassitarie, Dipartimento di Patologia e Sanità Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Napoli Federico II, CREMOPAR, Campania, Italia

<sup>2</sup> Pfizer Animal Health Italia, <sup>3</sup> CIRPAR

**Parole chiave:** *Dicrocoelium dendriticum*, ovini, albendazolo, efficacia antiparassitaria.

**INTRODUZIONE** - *Dicrocoelium dendriticum* (*Dd*) è uno degli elminti più diffusi negli allevamenti ovini al pascolo; in Italia, dalle indagini eseguite nel corso degli anni, sono emersi valori di prevalenza (riferiti agli allevamenti) sempre piuttosto elevati: 67,5% in un'area appenninica del sud Italia; 48% in Calabria - province di Catanzaro, Cosenza e Crotone; 57,7% nel Lazio - provincia di Latina; 66,9% sull'intero territorio della regione Campania (Cringoli et al, 2005) e 61,2% in Basilicata (Bosco et al., 2011). Il farmaco è lo strumento primario per il controllo di questo importante distoma, da ciò la necessità di disporre di molecole sicuramente efficaci e obiettivo della presente prova controllata di campo è stato di valutare l'efficacia dell'albendazolo micronizzato al dosaggio di 10 mg/kg p.v. (Valbazen 1,9%- Pfizer) in singola e doppia somministrazione in ovini naturalmente parassitati.

**MATERIALI E METODI** - La prova è stata condotta nel periodo aprile - giugno 2012 su gruppi di ovini al pascolo, provenienti da un allevamento stanziale in un'area del Sud Italia, costituito da circa 300 capi. Per la valutazione del quadro parassitologico aziendale e per la individuazione dei soggetti positivi, sono stati eseguiti esami copromicroscopici quali-quantitativi individuali per la ricerca e la conta delle uova di *Dd* su 100 soggetti. Sulla base dei risultati parassitologici sono stati selezionati ed identificati 60 soggetti positivi, tutti di sesso femminile, di età compresa tra 2 e 6 anni e del peso di 40-60 Kg. Ciascun soggetto è stato sottoposto ad esame copromicroscopico per tre volte nella settimana precedente il trattamento (giorni -7, -5, -3) e successivamente ripartiti *at random* in tre gruppi sperimentali di 20 soggetti cadauno, omogenei per età, peso e per responso coprologico:

**Gruppo A** - trattato con albendazolo micronizzato in singola somministrazione;

**Gruppo B** - trattato con albendazolo micronizzato per due volte successive a distanza di una settimana;

**Gruppo C** - controllo non trattato.

Il trattamento degli animali del Gruppo A e del Gruppo B è stato effettuato per via orale e con pistola dosatrice somministrando una sospensione di Valbazen 1,9% - Pfizer (Albendazolo Micronizzato - 10 mg/Kg peso vivo), 5 ml di sospensione ogni 10 Kg, così come indicato dalla ditta produttrice.

L'efficacia del trattamento è stata valutata mediante:

a) - Esami copromicroscopici quantitativi eseguiti sui 60 animali, 20 del Gruppo A, 20 del Gruppo B e 20 del Gruppo C, ai giorni 2, 4, 7, 14 e 30 dal primo trattamento, per la valutazione della Faecal Egg Count Reduction (FECR). Per la conta delle uova di *Dd* è stata utilizzata la FLOTAC double Technique con sensibilità pari a 2 uova per grammo feci (upg), utilizzando una soluzione flottante a base di zinco solfato (peso specifico = 1,350) (Cringoli et al., 2010).

b) - Esami necroscopici: diciotto animali, 6 del Gruppo A, 6 del Gruppo B e 6 del Gruppo Controllo, sono stati sacrificati 14 giorni dopo il primo trattamento (T14) per la conta degli esemplari di *Dd*.

L'efficacia (%) del trattamento è stata calcolata utilizzando la seguente formula (Sanz et al., 1987):

$$\text{Efficacia} = \frac{\text{MA upg Gruppo Controllo} - \text{MA upg Gruppo Trattato} \times 100}{\text{MA upg Gruppo Controllo}}$$

MA = Media Aritmetica

Questa formula è stata utilizzata anche per il calcolo della efficacia considerando i parassiti adulti isolati alle necroscopie. I valori ottenuti ai vari momenti sperimentali, giorni -7, -5, -3, 0, 2, 4, 7, 14 e 30, sono stati elaborati mediante l'analisi della varianza (ANOVA) dopo trasformazione logaritmica per il confronto dei valori di upg e di *Dd* dei tre gruppi.

**RISULTATI E CONCLUSIONI** - I risultati del test di FECR e degli esami necroscopici sono riassunti nelle tabelle 1 e 2.

In conclusione, seguendo i parametri della *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology*, ed utilizzando i valori della FECR, l'albendazolo micronizzato (Valbazen 1,9% - Pfizer), somministrato due volte a distanza di una settimana, alla dose di 10 mg/Kg ad ovini naturalmente infettati da *Dd* è risultato "altamente efficace"; la singola somministrazione ha fatto registrare valori di "efficacia". Il doppio trattamento, quindi, ha prodotto risultati migliori rispetto al singolo trattamento, sia al rilievo copromicroscopico che necroscopico.

*Ringraziamenti: si ringraziano per la collaborazione tecnica: Michele Del Vecchi, Dionisio Del Grosso e Mario Parrilla.*

■ **Field trial on the efficacy of albendazole micronized against *Dicrocoelium dendriticum* in naturally infected sheep**

**Key words:** *Dicrocoelium dendriticum*, sheep, albendazole, antiparasitic efficacy.

**Tabella 1** - Efficacia su responso copromicroscopico (FECR test).

Giorno rispetto al trattamento	GRUPPO C		GRUPPO A			GRUPPO B		
	UPG MA	UPG Min-Max	UPG MA	UPG Min-Max	FECR (%)	UPG MA	UPG Min-Max	FECR (%)
T - 7	168	96-552	157	96-228	/	159	90-234	/
T - 5	139	96-306	160	84-348	/	154	96-264	/
T - 3	172	66-684	165	90-420	/	169	96-270	/
T 0	171	78-768	179	78-516	/	170	102-258	/
T 2	203	120-612	77	36-168	62,1	76	42-126	63
T 4	206	42-1110	58	156-12	71,8	58	24-150	72
T 8	209	66-870	28	0-132	86,6	27	0-98	87
T 14	213	96-750	10	0-42	95	2	0-12	99
T 30	228	102-528	8	0-38	96,5	2	0-6	99

**Tabella 2** - Efficacia su responso necroscopico.

Giorno rispetto al trattamento	GRUPPO C		GRUPPO A			GRUPPO B		
	N° Dd MA	N° Dd Min-Max	N°Dd MA	N° Dd Min-Max	Eff. (%)	N°Dd MA	N° Dd Min-Max	Eff. (%)
T 14	1274	228-3328	87	47-164	93,2	70	7-109	94,5

## Bibliografia

Bosco A., Rinaldi L., Musella V., Pintus D., Santaniello M., MorgogNONE M.E., Zacometti G., Cringoli., 2011. SISVet, LXV:111-113.  
 Cringoli G., Rinaldi L., Maurelli M.P., Utzinger J., 2010. Nat Protoc., 5(3):503-15.  
 Sanz F., Tarazona J.M., Jurado R., Frias J., Tarazona J.V., Duncan J.L., 1987. Vet Rec. 17, 120(3):57-8.

# Patogeni emergenti nell'eziologia delle meningoencefaliti batteriche degli ovini



F. CASALINUOVO<sup>1</sup>, C. RIVERSO<sup>1</sup>, N. MACRÌ<sup>1</sup>, G. LUCIFORA<sup>1</sup>, A. GUARINO<sup>2</sup>

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno. <sup>1</sup> Sezione di Catanzaro, <sup>2</sup> Direzione IZSM

**Parole chiave:** ovino, meningoencefaliti, *Globicatella sanguinis*, *Gemella sanguinis*.

**INTRODUZIONE** - La specie ovina è particolarmente soggetta ad infezioni di natura batterica, virale e parassitaria del sistema nervoso centrale (SNC). Tra queste si riscontrano abbastanza comunemente la Scrapie, la Listeriosi, la Cenurosi e l'Encefalomielite infettiva (Louping-ill). Sono inoltre descritte altre infezioni, soprattutto di origine batterica, non ben caratterizzate dal punto di vista eziologico e clinico e che necessitano di essere adeguatamente approfondite. Possono manifestarsi sottoforma di sindrome generalizzata o localizzata, soprattutto a carico di soggetti giovani e di neonati in particolare (secondarie ad onfaloflebiti) ma anche nei soggetti adulti, in particolare nei soggetti defedati da patologie intercorrenti come le parassitosi (Martin, 1986). I batteri più frequentemente responsabili di infezioni a carico del SNC degli ovini sono: *E. coli*, *Pseudomonas spp*, *Pasteurella multocida* e *Pasteurella haemolytica*, i quali raggiungono il SNC soprattutto per via ematica con successiva localizzazione all'interno delle meningi dove in genere determinano processi infiammatori a decorso acuto (Martin, 1986). In letteratura sono inoltre riportati isolamenti di altri batteri dal SNC degli ovini, alcuni dei quali vengono indicati come agenti eziologici primari di infezione. Nel presente lavoro viene descritto l'isolamento di *Globicatella sanguinis* e di *Gemella sanguinis* dall'encefalo di 2 ovini appartenenti a 2 diversi allevamenti. Si tratta di cocchi Gram-positivi, catalasi positivi, anaerobi facoltativi, di forma ovoidale e disposti in corte catene nel genere *Globicatella* e a forma di tetrad nel genere *Gemella*, in grado di crescere sui terreni base come l'agar sangue ed agar cioccolato dove provocano  $\alpha$  emolisi (*Globicatella*) oppure  $\alpha$  o  $\gamma$  emolisi (*Gemella*). Entrambe le specie sembrano rivestire una crescente importanza in patologia umana. *Globicatella sanguinis* è stata infatti isolata nel corso di episodi di meningite (Arnaud et al. 2010), di infezioni all'apparato urogenitale (Matusnami et al. 2011) e di batteriemia, mentre *Gemella sanguinis* è stata isolata in corso di endocarditi, di infezioni di protesi valvolari cardiache (Gundre et al. 2010) e di infezioni di protesi articolare. In patologia veterinaria le segnalazioni sono ancora scarse, alcune però rivestono un notevole significato, come l'isolamento di *Globicatella sanguinis* da episodi di meningoencefalite in agnelli (Vela et al. 2000) e dall'apparato genitale delle pecore (El-Arabi 2009). *Globicatella sanguinis* è stata inoltre isolata dal sacco congiuntivale inferiore di 7 bufali su 57 esaminati in assenza di patologie oculari (Formicola M. 2011). Specie di *Gemella* diverse dalla *sanguinis*, sono state invece isolate da flogosi orali del cane (Collins et al. 1999), da lesioni ascessuali nel coniglio (Hoyles et al. 2000), mentre specie di *Globicatella* diverse dalla *sanguinis* sono state isolate da infezioni polmonari di vitello, pecora e suino (Vandamme et al. 2001).

**MATERIALI E METODI** - L'esame batteriologico è stato eseguito a partire dall'encefalo di 2 pecore decedute per cause sconosciute ed appartenenti a 2 diversi allevamenti ubicati in diversi territori e senza nessun apparente collegamento, ad indirizzo produttivo di latte destinato alla trasformazione e di agnelli e capretti. Il primo allevamento (A), era composto da 76 ovini, mentre il secondo allevamento (B) era di tipo misto e composto da 59 capi di cui 46 ovini e 13 caprini. L'encefalo dei due capi deceduti è stato prelevato nell'ambito del piano di sorveglianza attiva nei confronti della Scrapie ed inviato al laboratorio per la ricerca della proteina prionica. In entrambi i casi la semina è stata effettuata su agar addizionato con sangue di montone, incubato a 37 °C in atmosfera al 5% di CO<sub>2</sub> per 24 ore. Successivamente, le colonie sviluppate sono state sottoposte a colorazione di Gram, prova della catalasi e all'identificazione biochimica mediante il sistema automatico (Vitek Biomerieux).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I batteri isolati sono stati identificati come cocchi Gram positivi, catalasi negativi, con caratteristiche biochimiche riconducibili rispettivamente a *Globicatella sanguinis* per l'isolato dell'allevamento A e a *Gemella sanguinis* per l'isolato dell'allevamento B. Secondo le

informazioni raccolte presso gli allevatori e i custodi degli animali, non sono stati notati sintomi o lesioni riferibili a patologie nervose e nessun intervento diagnostico era stato effettuato per stabilire le probabili cause dei decessi dei due animali. Attraverso l'indagine epidemiologica, è stato invece possibile acquisire informazioni sufficienti per affermare che sicuramente gli allevamenti in questione erano interessati da problematiche sanitarie abbastanza serie. In particolare, è emerso che nell'allevamento A in meno di un anno si è verificato il decesso di 7 pecore (di cui 5 di sette/otto anni di età e 2 di due anni di età), ovvero circa il 10% dei capi allevati e lo smarrimento di altri 13 capi (17% del totale), tutti di età compresa tra i 7-8 anni. Per l'allevamento B non sono stati ufficialmente dichiarati altri casi di decesso di animali bensì lo smarrimento di 43 capi (42,7%) nell'arco di 6 mesi.

**CONCLUSIONI** - Negli ultimi anni molti nuovi generi sono stati introdotti nella tassonomia dei batteri cocchi Gram positivi catalasi-negativi. I dati riportati in letteratura e i risultati del presente lavoro indicano in *Globicatella* e *Gemella sanguinis* nuove specie batteriche emergenti e di crescente importanza in patologia umana e veterinaria, che le moderne tecniche diagnostiche di biologia molecolare hanno permesso di riconoscere e classificare. Per questi motivi, i laboratori di microbiologia devono adottare adeguate procedure in grado di isolare ed identificare questo gruppo di batteri. È necessario infatti approfondire lo studio su queste specie batteriche per meglio definire l'eziologia delle infezioni del SNC negli animali ed in particolare negli ovini, i quali al momento appaiono come la specie più sensibile all'azione patogena di questi batteri.

## Emerging pathogens in the etiology of bacterial meningoencephalitis in sheep.

**Key words:** sheep, meningoencephalitis, *Globicatella sanguinis*, *Gemella sanguinis*.

## Bibliografia

1. Arnaud G.H., Doloy A., Ansart S., Le Lay G., Le Flèche-Matéos A., Seizeur R., Garré M., Payan C., Bouvet A., (2010) *Globicatella sanguinis* meningitis associated with human carriage. J. Clin. Microbiol. 2010 April; 48(4): 1491-1493.
2. Collins M.D., Jovita M.R., Foster G., Sjsden B., Falsen E., (1999): Characterization of a *Gemella*-like organism from the oral cavity of a dog: description of *Gemella palaticanis* sp. nov. International Journal of Systematic Bacteriology 1999, 49, 1523-1526.
3. El-Arabi, Ali Amer Ali (2009): Bacteriology of the reproductive tract of the peri parturient ewe and its relationship with fertility. PhD thesis, University of Glasgow. Subject: SF600 Veterinary Medicine Library of Congress Subject Areas (2974).
4. Formicola M. (2011): Afezioni oculari ad eziologia batterica del bufalo mediterraneo. Tesi di laurea. 3 maggio 2011, Università degli Studi di Napoli.
5. Gundre P.R., Ramachandran K., Kupfer Y., Tessler S., (2010): A rare case of prosthetic valve endocarditis caused by *Gemella sanguinis*. Chest, October 2010, vol.138 n.4, 75A.
6. Hoyles L., Foster G., Falsen E., Collins M.D. (2000): Characterization of a *Gemella*-like organism isolated from an abscess of a rabbit: description of *Gemella cunicula* sp. nov. USEM, November 2000, vol.50, n.6, 2037-2041.
7. Martin W.B. (1986): Malattie della pecora. Edizione italiana a cura di V.Cilli. Esculapio Editore, 1986, 119.
8. Matusnami M., Otsuka Y., Ohkusu K., Sogi M., Kitazono H., Hosokawa N., (2011): Urosepsi caused by *Globicatella sanguinis* and *Corynebacterium jeikeium* in an adult: case report and literature review. Journal of Infection and Chemotherapy. Nov 12; 22080192.
9. Vandamme P., Hommez J., Snauwaert C., Hoste B., Cleenwerck I., Lefebvre K., Vancanneyt M., Swings J., Devriese L.A., Haesebrouck F. (2001): *Globicatella sulfidifaciens* sp. nov. isolated from purulent infections in domestic animals. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2001, 51, 1745-1749.
10. Vela A.I., Fernandez E., las Heras A., Lawson P.A., Dominguez L., Collins M.D., Fernandez-Garayzabal J.F., (2000): Meningoencephalitis associated with *Globicatella sanguinis* infection in lambs. J. Clin. Microbiol., 2000, Nov; 38(11):4254-5.

# Effetti della dieta sul profilo acido del latte di capre con diverso genotipo per l' $\alpha_{S1}$ -CN



A. BONANNO, A. DI GRIGOLI, V. BELLINA, G. TORNAMBÉ, F. MAZZA, M. TODARO

Dipartimento DEMETRA, settore di Produzioni Animali, Università degli Studi di Palermo

**Parole chiave:** capra, genotipo per l' $\alpha_{S1}$ -caseina, nutrizione, acidi grassi del latte.

**INTRODUZIONE** - Come è noto, fattori di natura genetica e nutrizionale concorrono a determinare la produzione, la composizione e le proprietà tecnologiche del latte. Nelle capre, le varianti genetiche dell' $\alpha_{S1}$ -caseina ( $\alpha_{S1}$ -CN) influenzano la qualità del latte, in particolare il tenore in caseina e, quindi, la sua attitudine casearia<sup>1</sup>. Poiché gli apporti nutrizionali esercitano anch'essi forti effetti su produzione e proprietà del latte, vi è interesse alla conoscenza delle relazioni che legano l'alimentazione e il genotipo delle capre per l' $\alpha_{S1}$ -CN. In tale ambito, è emerso come il polimorfismo ai loci dell' $\alpha_{S1}$ -CN (CSN1S1) si rifletta pure sulla composizione in acidi grassi (AG) del latte di capra, e in particolare sul contenuto in AG a corta e media catena e in acido oleico, e sull'attività della delta-9 desaturasi<sup>2</sup>; tale effetto sembra risentire, comunque, del livello energetico della dieta<sup>3</sup>. In questo studio si è voluto verificare, pertanto, l'influenza degli apporti energetici e proteici della dieta sulla composizione acidica del latte di capre di razza Girgentana il cui genotipo ai loci CSN1S1 è associato ad una diversa attitudine alla sintesi di  $\alpha_{S1}$ -CN.

**MATERIALI E METODI** - Da un nucleo di 40 capre Girgentane in lattazione, genotipizzate usando protocolli PCR a livello di DNA<sup>4</sup>, sono stati individuati 12 soggetti con analogo genotipo per  $\alpha_{S2}$ -CN (AA),  $\beta$ -CN (AA) e k-CN (AA) ma differenti per il genotipo (G) ai loci CSN1S1, associato alla sintesi di un alto (AA) o medio (AF) livello di  $\alpha_{S1}$ -CN. Le 6 capre di ciascun genotipo sono state alloggiare in box individuali e suddivise in 3 sottogruppi omogenei per stadio di lattazione (DIM = 50 o 120 d), ognuno dei quali ha ricevuto 3 diverse diete in successione, seguendo uno schema a quadrato latino 3x3 con fasi (F) di 21 d (14 d di adattamento e 7 d di sperimentazione). Le 3 diete (D) erano costituite da foraggio verde di sulla (*Hedysarum coronarium* L.) a volontà (SV), foraggio verde di sulla a volontà e 800 g di orzo (SVO), fieno misto a volontà e 800 g di orzo (FMO). La composizione in AG è stata determinata sui campioni di latte prelevati alla fine delle fasi sperimentali. L'estrazione dei lipidi e la metilazione degli AG sono state effettuate come descritto da Looor et al.<sup>5</sup>. Gli esteri metilici, diluiti in 1,5 ml di esano, sono stati iniettati in un GC HP 6890 con rivelatore FID (Agilent Technologies) e colonna capillare (100 m x 0,25 mm i.d., 0,25 mm; CP-Sil 88, Chrompack). Gli AG sono stati identificati confrontando i tempi di ritenzione con quelli di miscele standard (Sigma-Aldrich, Nu-Chek-Prep). L'Health Promoting Index (HPI) è stato calcolato con la formula di Chen et al.<sup>6</sup>. L'analisi statistica dei dati è stata effettuata con la procedura MIXED<sup>7</sup>, usando un modello con i fattori fissi F, DIM, G, D e l'interazione G\*D, e la capra come fattore casuale. Le medie sono state confrontate con il test di Tukey ( $P \leq 0,05$ ).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Per quanto riguarda l'effetto del genotipo (Tab. 1), le capre AA hanno evidenziato, rispetto alle capre AF, una maggiore attitudine alla sintesi *de novo* di AG a corta e media catena (S C6-C14) nei tessuti mammari, oltre che una minore esigenza al ricorso alle riserve adipose, come indicato dal più basso tenore di acido oleico (C18:1 c9) nel latte, che conferma la loro maggiore efficienza di utilizzazione energetica<sup>3</sup>. Pertanto, il grasso del latte delle capre con una maggiore attitudine alla sintesi di  $\alpha_{S1}$ -CN è stato caratterizzato da una più elevata dotazione in AG saturi, un minore contenuto in monoinsaturi e, di conseguenza, dal più alto rapporto saturi/insaturi. Il genotipo ha tendenzialmente interagito con la dieta solo per gli AG a corta e media catena, che sono stati sintetizzati in minor misura dalle capre eterozigoti AF rispetto alle AA quando entrambe sono state alimentate con la dieta SV che non prevede l'integrazione con il concentrato energetico (25,5 vs 32,5 g/100 g). La dieta SV, anche per l'azione dei tannini condensati della sulla, inibente la bio-idrogenazione ruminale degli AG insaturi, ha indotto la produzione di un latte con un maggiore contenuto in AG benefici per la salute umana, come quelli a catena dispari e ramificata (OBCFA), il CLA (C18:2 c9t11), i monoinsaturi, i polinsaturi e gli omega 3, e caratterizzato da più favorevoli rapporti saturi/insaturi e omega 6/omega 3, oltre che da un migliore HPI. In definitiva, i risultati dimostrano come l'effetto della dieta sia stato più pronunciato di quello

**Tabella 1** - Effetti del genotipo (G) delle capre per l' $\alpha_{S1}$ -CN e della dieta (D) sul profilo acido del latte (g/100 g di AG totali).

	G		D			Sign. <sup>1</sup>	
	AA	AF	SV	SVO	FMO	G	D
$\Sigma$ C6-C14 <sup>2</sup>	35,8	32,5	29,7 b	37,8 a	35,7 a	*	***
OBCFA	5,32	5,79	6,58 a	4,71 b	5,37 b		***
C18:1 t11	0,77	0,91	1,44 a	0,64 b	0,43 b		***
C18:1 c9	12,5	13,9	15,6 a	11,6 b	12,2 b	*	***
c18:2 n6	1,87	2,05	1,67 b	2,32 a	1,89 b		**
C18:3 n3	1,11	1,10	1,94 a	0,97 b	0,41 c		***
C18:2 c9t11 CLA	0,35	0,41	0,56 a	0,29 b	0,27 b		***
Saturi	77,2	74,9	70,8 b	78,6 a	78,8 a	*	***
Monoinsaturi	17,1	18,9	21,8 a	15,8 b	16,5 b	*	***
Polinsaturi	4,85	5,17	6,35 a	4,78 b	3,91 c		***
Saturi/insaturi	3,74	3,28	2,56 b	3,92 a	4,04 a	*	***
$\Sigma$ omega 3	1,56	1,61	2,56 a	1,30 b	0,91 b		***
omega 6/omega 3	2,53	2,40	1,14 c	2,29 b	3,96 a		***
HPI	0,30	0,32	0,44 a	0,25 b	0,24 b		***

<sup>1</sup> \*  $P \leq 0,05$ ; \*\*  $P \leq 0,01$ ; \*\*\*  $P \leq 0,001$ ; a, b, c:  $P \leq 0,05$ .  
<sup>2</sup> Interazione G\*D:  $P \leq 0,10$ .

del genotipo per l' $\alpha_{S1}$ -CN. Infatti, la dieta a base esclusiva del foraggio verde di sulla ha consentito di produrre latte con proprietà salutistiche migliori rispetto a quello ottenuto con le altre diete.

Ricerca finanziata dal MIUR, progetto PRIN 2007B4JBWN\_002

## Effect of diet on acidic profile of milk from goats differing for $\alpha_{S1}$ -CN genotype

**Key words:** goat,  $\alpha_{S1}$ -casein genotype, nutrition, milk fatty acids.

## Bibliografia

- Clark S., Sherbon J.W., 2000. AlphaS1-casein, milk composition and coagulation properties of goat milk. *Small Ruminant Research*, 38, 123-134.
- Chilliard Y., Rouel J., Leroux C., 2006. Goats alpha-S1-casein genotype influences its milk fatty acid composition and delta-9 desaturation ratios. *Animal Feed Science and Technology*, 131, 474-487.
- Valenti B., Pagano R.I., Pennisi P., Lanza M., Avondo M., 2010. Polymorphism at  $\alpha_{S1}$ -casein locus. Effect of genotype diet  $\times$  interaction on milk fatty acid composition in Girgentana goat. *Small Ruminant Research*, 94, 210-213.
- Sacchi P., Chessa S., Budelli E., Bolla P., Ceriotti G., Soglia D., Rasero R., Cauvin E., Caroli A., 2005. Casein haplotype structure in five Italian goat breeds. *Journal of Dairy Science*, 88, 1561-1568.
- Looor J.J., Herbein J.H., Polan C.E., 2002. Trans18:1 and 18:2 isomers in blood plasma and milk fat of grazing cows fed a grain supplement containing solvent-extracted or mechanically extracted soybean meal. *Journal of Dairy Science*, 85, 1197-1207.
- Chen S., Bobe G., Zimmerman S., Hammond E.G., Luhman C.M., Boylston T.D., Freeman A.E., Beitz D.C., 2004. Physical and sensory properties of dairy products from cows with various milk fatty acid compositions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (11), 3422-3428.
- SAS, 2004. SAS/STAT Qualification Tools User's Guide (version 9.1.2). Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA.

# Curve di emissione del latte registrate in allevamenti ovis



C. BOSELLI, G. GIANGOLINI, G. GIACINTI, F. FILIPPETTI, R. BIOCCHI, M.C. CAMPAGNA, S. AMATISTE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, - via Appia Nuova, 1411 - Roma - Centro Nazionale di Referenza per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati degli Ovis e dei Caprini (CRELDOC)

**Parole chiave:** curve di flusso, pecore, tempo di mungitura.

**INTRODUZIONE** - La cinetica di emissione del latte è tipica per ogni specie animale e risulta influenzata da fattori anatomici, fisiologici, ambientali e sanitari<sup>1</sup>. Negli ovis e nei caprini la frazione di latte cisternale prevale rispetto alla frazione alveolare<sup>2</sup>, condizionando l'emissione del latte e la curva di flusso. Numerosi studi condotti sulla cinetica di emissione del latte hanno consentito di classificare le curve di flusso ad un picco, a due picchi ed a plateau costante<sup>1,3,4,5</sup>. Tale informazione può trovare riscontro pratico nei piani di selezione genetica e per ottimizzare le operazioni di mungitura. L'obiettivo del presente studio è stato di analizzare i diversi profili di emissione del latte in pecore appartenenti a diverse razze ovis da latte allevate nella regione Lazio, associando ad esse il contenuto cellulare.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto in tre allevamenti ovis ubicati nella provincia di Roma. Le pecore campionate con disegno randomizzato (238) appartenevano alle seguenti razze: Assaf (28), Sarda (81), Lacaune (16), Comisana (86), Sopravissana (27). Le curve di emissione sono state rilevate nella mungitura serale. La produzione di latte e i principali parametri della curva di flusso sono stati registrati con il lattoflusometro elettronico LactoCorder® (SW Capre) utilizzato in modalità di autocampionamento. Su ciascun campione di latte individuale sono state determinate le cellule somatiche (Fossomatic 5000 - Foss Electric). Le principali fasi della curva di emissione (ascendente, plateau, discendente, mungitura in bianco, stripping) sono descritte nel manuale d'istruzione<sup>6</sup>. Le curve di flusso sono state classificate nel seguente modo: curve ad un picco (tipo 0), a due picchi (tipo 1 - Bimodali) e a plateau costante (tipo 2 - durata del plateau > 30 secondi). L'analisi statistica è stata eseguita con SW MedCalc® versione 11.4.2 con analisi della varianza (ANOVA), i valori sono espressi come media ± errore standard della media.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La media generale della produzione di latte ottenuta è risultata di 0,44±0,02 kg/capo per mungitura, con valori minimi di 0,22±0,01 kg/capo rilevati per la razza Sopravissana e massimi di 0,64±0,02 kg/capo rilevati per la razza Assaf. Rispetto alle 238 curve di flusso registrate, 55 (23,11%) sono state classificate come tipo 1 (Fig. 1, sinistra), 22 (9,24%) come tipo 2, mentre le restanti 161 (67,65%) come tipo 0 (Fig. 1, destra). La media generale dei risultati ottenuti ha mostrato che il profilo della curva di emissione è caratterizzato dalla prevalenza della fase discendente (0,43±0,02 min) rispetto alla fase ascendente (0,28±0,01 min) ed alla fase di plateau (0,17±0,02 min). I risultati relativi alle tre tipologie di curve di emissione considerate sono riportati nella Tabella 1. Le curve di tipo 1 hanno mostrato produzioni di latte superiori rispetto alle altre due tipologie, dovuto ad un maggiore svuotamento della ghiandola mammaria, il primo picco corrisponde alla frazione di latte cisternale mentre il secondo alla frazione di latte alveolare. Le curve di tipo 2 risultano caratterizzate da una fase di plateau più lunga rispetto alle altre fasi e da un flusso medio

**Tabella 1** - Valori medi dei principali caratteri produttivi, di mungibilità e citologici (Livelli di significatività: <sup>a-b</sup> P<0,05).

Parametri di mungibilità	Tipo 0 (161)	Tipo 1 (55)	Tipo 2 (22)
Produzione di latte (kg)	0,38±0,01 <sup>b</sup>	0,59±0,03 <sup>a</sup>	0,49±0,06 <sup>ab</sup>
Fase ascendente (m)	0,34±0,02 <sup>b</sup>	0,50±0,04 <sup>a</sup>	0,48±0,06 <sup>a</sup>
Fase di plateau (m)	0,11±0,01 <sup>b</sup>	0,10±0,01 <sup>b</sup>	0,74±0,09 <sup>a</sup>
Fase discendente (m)	0,44±0,02 <sup>a</sup>	0,46±0,05 <sup>a</sup>	0,28±0,05 <sup>b</sup>
Fase di mungitura in bianco (m)	0,38±0,03	0,27±0,05	0,19±0,06
Fase di stripping (m)	0,05±0,01 <sup>b</sup>	0,27±0,05 <sup>a</sup>	0,02±0,01 <sup>b</sup>
Flusso massimo (kg/m)	0,63±0,02 <sup>b</sup>	0,79±0,04 <sup>a</sup>	0,57±0,07 <sup>b</sup>
Flusso medio (kg/m)	0,50±0,01 <sup>b</sup>	0,59±0,03 <sup>a</sup>	0,40±0,05 <sup>b</sup>
Produzione di latte nel 1 minuto (kg)	0,33±0,01 <sup>b</sup>	0,48±0,02 <sup>a</sup>	0,38±0,05 <sup>ab</sup>
Cellule som (Log <sub>10</sub> /mL)	5,67±0,05 <sup>a</sup>	5,39±0,06 <sup>b</sup>	5,27±0,13 <sup>b</sup>
Tempo di mungitura (m)	1,32±0,03 <sup>b</sup>	1,62±0,04 <sup>a</sup>	1,71±0,11 <sup>a</sup>

ridotto. In ultimo le curve di tipo 0 hanno evidenziato una fase discendente accentuata rispetto alle altre fasi associata a tempi di mungitura inferiori. Il contenuto in cellule somatiche è risultato significativamente superiore nelle curve tipo 0 rispetto agli altri due tipi. La maggiore durata della fase discendente e di mungitura in bianco provocano una irritazione al capezzolo e al tessuto ghiandolare mammario<sup>7</sup>.

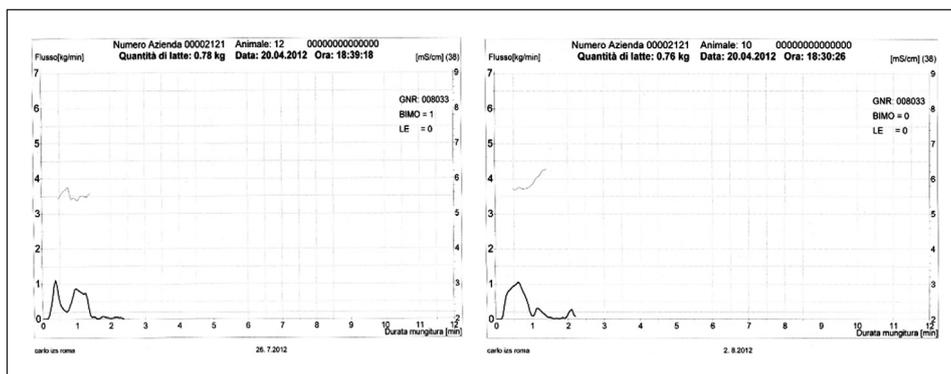
**CONCLUSIONI** - Lo studio evidenzia una elevata percentuale di curve tipo 0. Ulteriori ricerche sono necessarie, prendendo in esame tutti i parametri, per definire quale tipo di curva è da considerare per eventuali piani di selezione genetica.

## ■ Milk flow curves recorded in ovine herds

**Key words:** milk flow curves, sheep, milking time.

## Bibliografia

1. Bruckmaier R.M., Paul G., Mayer H., Schams D. (1997). Machine milking of Ostfriesian and Lacaune dairy sheep: udder anatomy, milk ejection, and milking characteristics. *Journal of Dairy Research*, 64: 163-172.
2. Caja G., Such X., Ruberte J., Carretero A., Navarro M. (1999). The use of ultrasonography in the study of mammary gland cisterns during lactation in ewe. In: Barillet, F. - Zervas, N.P. (Eds.), *Milking and Milk Production of Dairy Ewe and Goats*. EAAP Publication No. 95: 91-93.
3. Dzidic, A., Kaps, M., Bruckmaier, R. M., (2004). Machine milking of Istrian dairy crossbreed ewes: Udder morphology and milking characteristics. *Small Rum. Res.* 55: 183-189.
4. Labussière, J. (1988). Review of physiological and anatomical factors influencing the milking ability of ewes and the organization of milking. *Livest. Prod. Sci.*, 18: 253-274.
5. Mačuhova L., Uhrinčat' M., Mačuhova J., Margetin M., Tančin V. (2008). The first observation of milkability of the sheep breeds Tsigai, Improved Valachian and their crosses with Lacaune. *Czech Journal of Animal Science*, 53: 528-536.
6. www.lactocorder.ch (web site).
7. Tancin, V. Ipema, AH Peskovicova, D Hogewerf, PH Macuhova, J 2003. Quarter milk flow patterns in dairy cows: factors involved and repeatably Vet. Med. - Czech, 48, 2003 (10): 275-282.



**Figura 1** - Curve di flusso: tipo a due picchi (sinistra) e tipo ad un picco (destra).

# Il Cacio Magno: variazione dei principali parametri reologici, colorimetrici e chimico-fisici a fine stagionatura



M.C. CAMPAGNA, F. FILIPPETTI, N. BOTTALICO, L. DIONISI,  
R. CAVALLINA, R. ROSATI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, via Appia Nuova, 1411 - Roma - Italia

**Parole chiave:** cacio magno, formaggio, latte ovino.

**INTRODUZIONE** - Il Cacio Magno è un formaggio tradizionale a pasta molle, prodotto nella zona della bassa Sabina (Rieti). La forma tipica è a parallelepipedo, con un peso medio di 1,2 - 1,5 kg. Il periodo di stagionatura varia dai 20 ad oltre 30 giorni. Tale prodotto è caratterizzato da sapore dolce e aromatico con una colorazione giallo paglierino all'interno<sup>1</sup>. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare su diversi lotti di formaggio le variazioni delle principali caratteristiche reologiche, colorimetriche, del contenuto in lattosio ed acido lattico durante la fase terminale del periodo di stagionatura (20 e 30 giorni rispettivamente).

**MATERIALI E METODI** - Sono stati collezionati da un caseificio ubicato in provincia di Rieti, 15 diversi campioni di formaggio (maggio-giugno 2012) prodotti con la stessa tecnica di caseificazione. Ciascun campione analizzato proveniva da un diverso lotto di produzione, 7 campioni sono stati analizzati a 20 giorni di maturazione ( $t_{20}$ ) e 8 campioni sono stati analizzati a 30 giorni di maturazione ( $t_{30}$ ). Sono stati determinati i principali parametri reologici, colorimetrici, e chimici (contenuto in lattosio ed in acido lattico). I parametri reologici (durezza, coesività, adesività, gommosità, masticabilità, elasticità) sono stati determinati mediante dinamometro INSTRON (Universal testing machine mod. 3343), su cubetti di formaggio delle dimensioni di 20 mm. Per l'interpretazione dei parametri si rimanda al manuale d'uso<sup>2</sup>. I parametri colorimetrici  $L^*$  (luminosità),  $a^*$  (indice di rosso),  $b^*$  (indice di giallo) sono stati misurati mediante colorimetro Minolta CR 400 utilizzando due diverse tipologie di illuminante: illuminante D65 e illuminante C. Per l'interpretazione dei parametri si rimanda al manuale d'uso<sup>3</sup>. Il contenuto in lattosio ed in acido lattico sono stati determinati mediante metodo enzimatico, rispettivamente con kit Lactose (Enzyplus™ - BioControl) e D/L Lactic Acid (Enzyplus™ - BioControl). L'Analisi statistica è stata eseguita con SW MedCalc® versione 11.4.2 mediante analisi della varianza (Anova), i valori sono espressi come media  $\pm$  errore standard.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I principali valori dei parametri reologici determinati rispettivamente a  $t_{20}$  ed a  $t_{30}$  sono riportati nella Tabella 1. I risultati hanno mostrato un incremento della adesività ( $4,44 \pm 0,57$  mJ vs.  $6,92 \pm 0,65$  mJ;  $P < 0,05$ ) in accordo con quanto riportato da altri autori<sup>4</sup>, della gommosità ( $5,28 \pm 0,52$  N vs.  $6,95 \pm 0,21$  N;  $P < 0,05$ ), del contenuto in acido lattico ( $0,24 \pm 0,02\%$  vs.  $0,36 \pm 0,01\%$ ;  $P < 0,05$ ), della durezza ( $8,07 \pm 0,93$  N vs.  $10,27 \pm 0,41$  N;  $P < 0,05$ ) con l'aumentare della stagionatura. La durezza ha subito un incremento ( $P < 0,05$ ) da attribuire alla diminuzione dell'umidità e all'azione della lipolisi<sup>4</sup>. Il contenuto in acido lattico è aumentato ( $P < 0,05$ ) mentre il contenuto di lattosio è diminuito ( $P > 0,05$ ), tale variazione è da attribuire alla fermentazione lattica che è molto intensa nei primi giorni di maturazione, per poi decrescere in modo ponderale con l'avanzare della stagionatura, come dimostrato da altri Autori<sup>5</sup> per diverse tipologie di formaggi con periodi di stagionatura simili.

I principali valori dei parametri colorimetrici sono riportati nella Tabella 2. In particolare i parametri  $a^*$  (indice del rosso) e  $b^*$  (indice del giallo) hanno subito variazioni significative ( $P < 0,05$ ) durante il periodo considerato per entrambe le tipologie di illuminanti utilizzati. Il parametro  $L^*$  (luminosità) è diminuito con l'avanzare della stagionatura ( $P > 0,05$ ) per entrambe le tipologie di illuminanti utilizzati (D65 e C), associato probabilmente al fenomeno della proteolisi e alla diminuzione dell'umidità nel corso della maturazione, tale risultato è in accordo con quanto riportato da altri Autori per formaggi con tempi di stagionatura simili<sup>4</sup>.

**CONCLUSIONI** - Lo studio ha evidenziato come la durata del periodo di stagionatura influenza alcune caratteristiche reologiche e colori-

**Tabella 1** - Valori dei principali parametri TPA e chimici (Livelli di significatività: <sup>a-b</sup>  $P < 0,05$ ).

Parametri TPA e chimici	Tempo di stagionatura ( $t_{20}$ )	Tempo di stagionatura ( $t_{30}$ )
Durezza (N)	$8,07 \pm 0,93^a$	$10,27 \pm 0,41^b$
Coesività	$0,66 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,02$
Adesività (mJ)	$4,44 \pm 0,57^a$	$6,92 \pm 0,65^b$
Gommosità (N)	$5,28 \pm 0,52^a$	$6,95 \pm 0,21^b$
Masticabilità (mJ)	$14,38 \pm 3,19$	$15,71 \pm 2,31$
Elasticità (mm)	$2,57 \pm 0,45$	$2,16 \pm 0,34$
Lattosio (g/100 g)	$0,19 \pm 0,10$	$0,02 \pm 0,00$
Ac. Lattico (g/100g)	$0,24 \pm 0,02^a$	$0,36 \pm 0,01^b$

**Tabella 2** - Valori dei principali parametri colorimetrici D65 e C (Livelli di significatività: <sup>a-b</sup>  $P < 0,05$ ).

Parametri colorimetrici	Tempo di stagionatura ( $t_{20}$ )	Tempo di stagionatura ( $t_{30}$ )
Luminosità - $L^*_C$	$86,34 \pm 1,22$	$84,18 \pm 1,43$
Luminosità - $L^*_{D65}$	$86,05 \pm 1,22$	$83,95 \pm 1,45$
Indice del rosso - $a^*_C$	$- 5,18 \pm 0,17^a$	$- 4,54 \pm 0,14^b$
Indice del rosso - $a^*_{D65}$	$- 4,76 \pm 0,16^a$	$- 4,27 \pm 0,10^b$
Indice del giallo - $b^*_C$	$17,71 \pm 0,42^a$	$14,91 \pm 0,46^b$
Indice del giallo - $b^*_{D65}$	$17,89 \pm 0,39^a$	$15,46 \pm 0,40^b$

metriche del "Cacio Magno", in relazione alle modificazioni biochimiche in atto. La durata del periodo di stagionatura ha influenzato fra l'altro la gommosità, la durezza e l'adesività, parametri che contribuiscono in maniera importante alla caratterizzazione del prodotto finale. Sono in corso ulteriori indagini finalizzate a valutare le variazioni reologiche, colorimetriche, di pH ed umidità, su lotti di formaggio identici prodotti in diversi periodi dell'anno.

## ■ Cacio Magno: Variation of the main rheological, colorimetric and chemical-physical parameters, at the end of maturation

**Key words:** cacio magno, cheese, sheep's milk.

## Bibliografia

1. Web site: [www.arsial.it](http://www.arsial.it).
2. Web site: [www.Instron.com](http://www.Instron.com).
3. Web site: [www.konicaminolta.com](http://www.konicaminolta.com).
4. D. Sánchez-Macias, A Morales-Delanuez, I Moreno-Indias, LE Hernández-Castellano, V Mendoza-Grimón, N Castro, A Argüello (2010). Physicochemical analysis of full-fat, reduced-fat, and low-fat artisan-style goat cheese. *J.Dairy Sci.* 93:3950-3956.
5. M. Bertolino, P Dolci, M Giordano, L Rolle, G Zeppa (2011). Evolution of chemical-physical characteristics during manufacture and ripening of Castelmagno PDO cheese in wintertime. *Food Chemistry* 129: 1001-1011.

# Studio sui pattern SNPs nella popolazione ovina siciliana



S. REALE, M. BIVONA, T. LUPO, A. MIGLIAZZO, S. CASELLA, D. MACRÌ, F. VITALE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

**Parole chiave:** SNPs, Scrapie, Genotipizzazione.

**INTRODUZIONE** - La scrapie è una malattia infettiva degli ovini e caprini appartenente al gruppo delle TSE (Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili) patologie neurodegenerative letali le cui caratteristiche peculiari sono l'assenza di risposta immunitaria o infiammatoria e la difficoltà di diagnosi in vita. Questa patologia è dovuta all'accumulo progressivo nel corso dell'infezione, della isoforma patologica di una proteina normalmente presente nell'organismo e denominata PrP, considerata marker di infettività. Non è possibile identificare alcun acido nucleico associato con il prione e questo rende inutilizzabili le tecniche di biologia molecolare come la PCR. Sono stati identificati diversi polimorfismi specifici nella regione codificante la proteina prionica del gene PrP<sup>sc</sup>, che hanno consentito di spiegare la variabilità osservata da tempo nella suscettibilità degli ovini alla scrapie.

Scopo del lavoro è stato quello di effettuare uno studio sui pattern per la rilevazione dei genotipi caratteristicamente associati alla suscettibilità e alla resistenza alla scrapie con metodiche alternative e innovative.

Obiettivo della ricerca è stato la generazione di un certo numero di dati che possa rappresentare la base di uno studio di popolazione dal quale evincere i genotipi originari e quelli ottenuti in seguito alle modalità di selezione.

L'obiettivo finale è quindi l'eliminazione di tutti i genotipi a vario livello di suscettibilità e l'arricchimento del patrimonio ovino con genotipi resistenti.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su una popolazione ovina di 1054 soggetti (714 nel 2011 e 340 nel 2012).

Diverse sono state le tecniche analitiche utilizzate ai fini dello studio dei siti polimorfici; i campioni in esame sono stati analizzati tramite Real Time PCR e nei casi non conclusivi o di dubbia interpretazione si è preferita eseguire la metodica del sequenziamento. La caratteristica di questi test è la loro eseguibilità su campioni biologici dell'animale in vita. I campioni in esame (sangue in edta) sono stati estratti tramite appositi kit basati sull'uso di colonnine di affinità; i DNA estratti e quantizzati allo spettrofotometro sono stati poi caricati su piastra e sottoposti al test di discriminazione allelica tramite Real Time PCR per la determinazione del genotipo ai codoni 136, 154, 171 del gene PrP<sup>sc</sup>, tecnica che si basa sull'utilizzo di due sonde TaqMan MGB per ogni SNP una complementare all'allele 1, l'altra all'allele 2.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Nelle tabelle seguenti vengono raccolti i dati di genotipizzazione relativi all'ultimo biennio, e rappresentano alcuni dei genotipi presenti sul territorio siciliano. Per alcuni campioni l'approccio di PCR real time ha dato alcuni dubbi d'interpretazione dovuti alla sovrapposizione di picchi di colore diverso. Dato che le sonde marcate con fluorocromi diversi, differiscono solo per una base, è possibile che nelle condizioni di reazione dei singoli test, si ottengano delle ibridazioni leggermente aspecifiche che portano alla coesistenza di più segnali.

In questi casi si ricorre normalmente al sequenziamento classico su analizzatore genetico AB 3130.

**CONCLUSIONI** - La concordanza dei risultati ottenuti attraverso i due metodi può essere utile alla validazione di un metodo che, seppure non intuitivo e non alla portata di tutti i laboratori, risulta infallibile nella determinazione degli SNPs, laddove il risultato è fondamentale per la gestione degli incroci negli allevamenti.

■ SNPs pattern investigation in ovine from Sicilian breeding

**Key words:** SNPs, Scrapie, Genotyping.

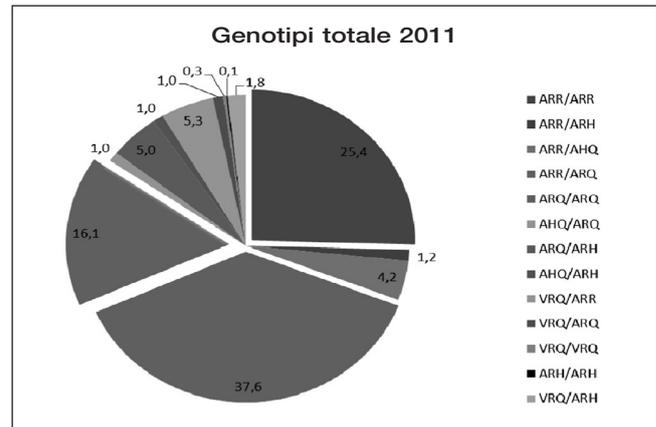


Tabella 1 - Distribuzione percentuale genotipi 2011.

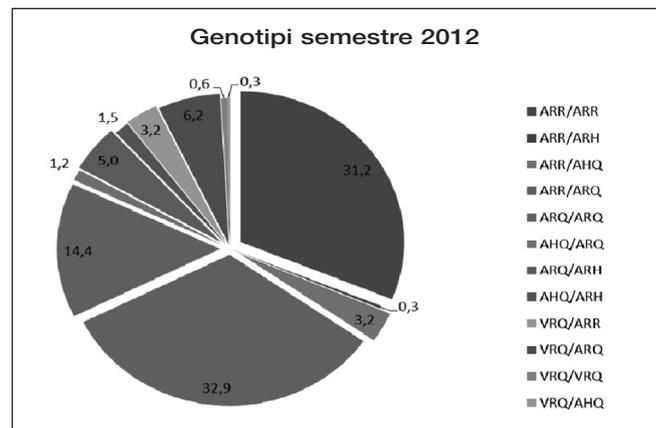


Tabella 2 - Distribuzione percentuale genotipi I semestre 2012.

## Bibliografia

- Epidemiology and control of scrapie within a sheep flock M. E. J. Woolhouse<sup>1\*</sup>, S. M. Stringer<sup>2</sup>, L. Matthews<sup>1</sup>, N. Hunter<sup>3</sup> and R. M. Anderson. doi: 10.1098/rspb.1998.0421 Proc. R. Soc. Lond. B 7 July 1998 vol. 265 no. 1402 1205-1210.
- La PCR e le sue varianti. Quaderno di laboratorio. Scialpi, Angela; Mengoni, Alessio. Casa editrice Firenze università Press 2008.
- Intraspecies Prion Transmission Results in Selection of Sheep Scrapie Strains Takashi Yokoyama, Kentaro Masujin, Mary Jo Scherrer, Yujing Shu<sup>1</sup>, Hiroyuki Okada<sup>1</sup>, Yoshifumi Iwamaru<sup>1</sup>, Morikazu Imamura<sup>1</sup>, Yuichi.
- PrP<sup>sc</sup> in Salivary Glands of Scrapie-Affected Sheep\_Marta Vascellari, Romolo Nonno, Franco Mutinelli, Michela Bigolaro, Michele Angelo Di Bari<sup>2</sup>, Erica Melchionti, Stefano Marcon, Claudia D'Agostino, Gabriele Vaccari, Michela Conte, Luigi De Grossi, Francesca Rosone, Francesco Giordani, and Umberto Agrimi. Published ahead of print 14 February 2007, doi: 10.1128/JVI.02148-06 J. Virol. May 2007 vol. 81 no. 9 4872-4876.
- Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance. Scrapie prevalence in sheep of susceptible genotype is declining in a population subject to breeding for resistance.
- Thomas J Hagenaars, Marielle B Melchior, Alex Bossers, Aart Davidse<sup>1</sup>, Bas Engel<sup>2</sup> and Fred G van Zijderveld. BMC Veterinary Research 2010, 6:25 doi:10.1186/1746-6148-6-25.

# Indagine preliminare sulle caratteristiche chimico-fisiche del Cacio Magno



F. FILIPPETTI, M.C. CAMPAGNA, C. BOSELLI, G. GIANGOLINI, D. PATRIARCA, S. AMATISTE, R. ROSATI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma - Italia  
CRELDOD - Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti Derivati degli Ovini e dei Caprini

**Parole chiave:** cacio magno, formaggio di pecora, regione Lazio, prodotti tradizionali.

**INTRODUZIONE** - Nell'ambito delle produzioni tradizionali Italiane va annoverato il "Cacio Magno", formaggio a pasta molle dal gusto pieno ma delicato e burroso, il sentore ovino è poco percettibile, mentre si nota una nota di acidulo; la crosta, edibile, con la sua callosità, compensa l'adesività molle della pasta. La forma è parallelepipedica, il colore giallo paglierino interno e grigio (per aspersione della fecola) all'esterno. Questo formaggio molle è ottenuto dalla lavorazione di latte ovino prodotto da pecore di razza Comisana, Sarda e Lacaune. L'allevamento si estende a pascolo polifita coltivato seguendo la conduzione biologica certificata. Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare le caratteristiche chimiche del "Cacio Magno", formaggio tradizionale della Regione Lazio, proveniente dalla Riserva Naturale Tevere-Farfa e precisamente tra le località di Poggio Mirteto e Montopoli di Sabina (Provincia di Rieti). Questo formaggio, risalente a diversi secoli fa, è stato riscoperto da pochi anni in queste due città.

**MATERIALI E METODI** - La lavorazione di questo formaggio è pressoché particolare: viene trasformato il latte di due munte (la mungitura serale refrigerata e quella della mattina inserita direttamente in caldaia), il latte filtrato è subito lavorato (o termizzato) e la cagliatura si ottiene a freddo (~ 20°C) coagulando il latte con presame in pasta di agnello lattante selezionato in azienda. Una volta rappresa, la cagliata viene rotta fino a che i grumi assumano la dimensione di una noce (~ 3 cm); avviene poi la cottura a 38°C e una sosta sotto siero per almeno 10 minuti prima della messa in forma. Il formaggio, messo in forma, subisce tre stufature: la prima e la seconda avvengono a vapore, la terza avviene ad aria calda secca. La salatura si effettua in salamoia e dura quattro ore; la stagionatura si protrae per circa 25 giorni in cella di stagionatura su assi di legno, durante i quali le forme vengono girate almeno un paio di volte. A maturazione il formaggio viene trattato con fecola di patate che ha lo scopo di aiutare la formazione della crosta. Nel corso dell'indagine (maggio - giugno 2012) sono stati analizzati 15 campioni di formaggi appartenenti a lotti diversi, prodotti da un caseificio locale dove conferiscono 3 aziende ovine biologiche. Per ciascun campione, sono state determinate le seguenti caratteristiche chimico-fisiche: acqua libera (aw) e pH, chimiche: grasso (G), grasso sostanza secca (GrSS), proteine (P), solidi totali (ST), residuo secco magro (RSM) e umidità (U). I parametri sono stati determinati usando un analizzatore ad infrarossi FoodScanTM (FOSS, Danimarca). La tecnologia analitica NIR è una tecnica spettroscopica che utilizza la lettura dello spettro elettromagnetico (regione tra 850 e 1050 nm).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati ottenuti sono stati elaborati mediante analisi statistica (ANOVA). La media del contenuto G è risultata di 31,32 ± 2,18% e GrSS 55 ± 1,35%. I valori minimi e massimi del GrSS sono risultati rispettivamente del 53% e del 57%. Per le proteine si registra una media di 22,57% ± 1,64%, per il RSM di 25,63 ± 0,64%, per i ST 57,25 ± 3,06% e per l'U 42,75 ± 3,06% (Tab. 1). La media del rapporto grasso/proteine è risultata di 1,39 ± 0,04% con un minimo di 1,31 ed un massimo di 1,42. La media del pH è risultata di 4,20 ± 0,15% con un minimo di 4,10 ed un massimo di 4,40. Per aw si registra una media di 0,985 ± 0,006%.

**CONCLUSIONI** - I valori analitici del "Cacio Magno", emersi da questa indagine, mostrano contenuti percentuali variabili per i diversi parametri considerati, registrando un range ampio tra i valori minimi e

**Tabella 1** - Caratteristiche chimico-fisiche del "Cacio Magno".

	G	GrSS	Prot	U
Media	31,32	55	22,57	42,75
Dev. Std	2,18	1,35	1,64	3,06
Mediana	30,46	54	22,01	44,2
Minimo	29,15	53	20,70	38,32
Massimo	35,17	57	24,83	45,9

**Tabella 1 bis** - Caratteristiche chimico-fisiche del "Cacio Magno".

	RSM	ST	pH	aw
Media	25,63	57,25	4,2	0,985
Dev. Std	0,64	3,06	0,15	0,006
Mediana	25,51	55,8	4,2	0,988
Minimo	24,94	54,1	4,1	0,977
Massimo	26,65	61,68	4,4	0,989

massimi, in particolare per quanto riguarda il grasso, l'umidità e i solidi totali. Tutto ciò è dovuto presumibilmente sia alle diverse razze di pecore presenti negli allevamenti che conferiscono il latte al caseificio, sia alla differente composizione chimica riscontrata nel latte di caldaia che al periodo di lattazione.

Sono in corso ulteriori studi per l'approfondimento dell'andamento delle caratteristiche chimiche del "Cacio Magno" durante tutto il periodo produttivo; inoltre si sta svolgendo un'indagine sul controllo dei parametri igienico-sanitari durante tutte le fasi del processo di produzione e di conservazione di questo prodotto.

## ■ Preliminary investigation on chemical characteristics of the Cacio Magno cheese

**Key words:** cacio magno, sheep cheese, Lazio region, traditional products.

## Bibliografia

- Filippetti F., Campagna M.C., Boselli C., Giangolini G., Dionisi L., Gulli A., Amatiste S., Cavallina R., Rosati R. 2012, Physico-chemical and color characteristics of "Pecorino della Sabina" cheese during ripening. First International WwtCA Conference, January 28, 2012 - Ragusa, Italy.
- Filippetti F., Campagna M.C., Boselli C., Giangolini G., Dionisi L., Patriarca D., Amatiste S., Cavallina R., Rosati R. 2012, Evolution of Physicochemical, Microbiological, Rheological and Colorimetric Properties of the "Pecorino della Sabina" Cheese during the curino process.
- IDF Cheese Ripening Technology symposium. May 21-24, Madison, Wisconsin, USA.

# Staphylococcus aureus nel latte di massa e individuale in allevamenti ovini della regione Lazio



G. GIACINTI, D. SAGRAFOLI, G. ROSA, A. TAMMARO, E. BOVI, C. VESCHETTI, S. AMATISTE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma  
Centro di Referenza nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti derivati degli ovini e dei caprini

**Parole chiave:** *Staphylococcus aureus*, latte di massa, latte individuale, ovino.

**INTRODUZIONE** - Il latte e i derivati sono frequentemente contaminati da *Staphylococcus aureus* (Normanno et al. 2005, Giacinti et al. 2010, Muehlherr et al. 2003) rappresentando un potenziale rischio per la sicurezza alimentare e la salute pubblica. Anche se la contaminazione del latte e dei derivati può avvenire durante le diverse fasi di lavorazione, la presenza di animali con infezione intramammaria sostenuta da *S. aureus* costituisce il principale fattore di rischio (Vautor et al. 2003). Diversamente dalla specie ovina, nel bovino da latte la relazione tra contaminazione del latte e presenza di animali infetti è stata ampiamente studiata al fine di valutare il livello d'infezione intra-allevamento (Bertocchi et al. 2010).

L'obiettivo del lavoro è stato di studiare la diffusione di *S. aureus* nel latte crudo di aziende ovine del Lazio e di valutare la capacità predittiva del latte di massa come stima del livello d'infezione intra-allevamento.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati esaminati 286 campioni di latte di massa ovino prodotto da altrettanti allevamenti, per la ricerca quantitativa di *S. aureus*. I campioni di latte sono stati prelevati, nel periodo dicembre 2011 maggio 2012, da Cooperative di Produttori e/o Caseifici per il controllo della qualità del latte. Dagli allevamenti risultati positivi a *S. aureus* dal controllo del latte di massa, sono state selezionate 19 aziende con consistenza media di 271 ovini in lattazione (min 90 max 538) per un totale di 5140 animali. Al fine di valutare la prevalenza d'infezione per ogni azienda selezionata è stato effettuato un campione sterile di latte individuale (pool delle due emimammelle) di tutti i soggetti in lattazione e un campione di latte di massa rappresentativo dell'intera mungitura. Sui campioni di latte di massa, entro 24 ore dal prelievo, è stata eseguita la semina in terreno Baird Parker + Rabbit Plasma Fibrinogen (BP-RPF) secondo la ISO 6888-2:1999 per la ricerca quantitativa di *S. aureus* (la conferma di *S. aureus* è stata eseguita con metodo biomolecolare). In base alle unità formanti colonia per ml (UFC) rilevate, i campioni sono stati suddivisi in 6 classi: <100, ≥ 100 <500, ≥ 500 <1000, ≥ 1000 <2000, ≥ 2000 <10000, ≥ 10000. I campioni di latte individuale sono stati seminati, entro 24 ore dal prelievo, in ragione di 10 µl con ansa monouso sterile su terreno BP-RPF per la ricerca qualitativa di *S. aureus*. Per lo studio del valore predittivo del latte di massa come stima del livello d'infezione, è stato applicato il modello di regressione lineare con variabile dipendente la percentuale dei soggetti infetti e variabile indipendente le UFC in forma logaritmica.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La presenza di *S. aureus* è stata osservata nel 53,5% dei campioni di latte (153/286) con un contenuto medio di  $3,31 \times 10^2$  e un range di concentrazione tra  $10^1$  e  $10^4$  UFC (Tab. 1). Tale prevalenza è risultata più alta rispetto a quanto osservato da Muehlherr et al (2003) (33,3%).

La distribuzione percentuale è risultata piuttosto eterogenea nelle classi considerate, mostrando una maggiore prevalenza (41,8%) nel range di concentrazione ≥100<500 UFC, mentre solo tre campioni hanno evidenziato contenuti maggiori a  $10^4$  UFC.

Per quanto riguarda i 19 allevamenti selezionati è stata osservata una percentuale media di soggetti positivi a *S. aureus* del 4,5% (234/5140) con un range di prevalenza tra 0,4% e 20,1%. Nei corrispondenti campioni di massa il contenuto medio di *S. aureus* è stato di  $1,5 \times 10^3$  UFC con un range di concentrazione tra  $1 \times 10^1$  e  $5,4 \times 10^4$  UFC.

L'incremento della percentuale d'infezione intra-allevamento è mostrato nella tabella 2. Come si può osservare, con bassi valori di UFC ( $10^1$ ) la percentuale media d'infezione risulta molto contenuta (0,6%) mentre in presenza di concentrazioni elevate ( $10^4$  UFC) il livello medio d'infezione subisce un notevole incremento (11,7%).

**Tabella 1** - Distribuzione dei campioni positivi a *S. aureus* in classi di UFC.

UFC	N°campioni positivi	% campioni positivi
<100	29	18,9
≥ 100 <500	64	41,8
≥ 500 <1000	19	12,4
≥ 1000 <2000	16	10,5
≥ 2000 <10000	22	14,4
≥ 10000	3	2

**Tabella 2** - % media di animali positivi a *S. aureus* in classi di UFC massa.

UFC massa	$10^1$	$10^2$	$10^3$	$10^4$
% media sogg. pos.	0,60%	3,10%	4,10%	11,70%

La correlazione tra le due variabili, percentuale d'infezioni e UFC, risulta significativa ( $r^2 = 0.80$ ;  $p < 0.01$ ). Il modello di regressione lineare applicato, indica che la prevalenza d'infezione aumenta di 0,41 unità logaritmiche all'aumentare di una unità logaritmica di UFC nel latte di massa.

**CONCLUSIONI** - Dai risultati ottenuti emerge una elevata diffusione di *S. aureus* negli allevamenti ovini controllati, mentre appare contenuta la prevalenza d'infezione a livello aziendale. I dati evidenziano l'importanza della valutazione microbiologica del latte crudo alla stalla che rappresenta un valido strumento operativo sia per l'applicazione di specifiche misure di prevenzione e di profilassi delle mastiti causate da *S. aureus* sia per il controllo del rischio associato al consumo di latte o derivati.

## Staphylococcus aureus in bulk milk and udder milk in dairy sheep in Lazio Region

**Key words:** *S. aureus*, raw milk, udder milk, sheep.

## Bibliografia

- Bertocchi L., Bolzoni G., Zanardi G., Nassuato C., Bonometti G. Benicchio S., Varisco G. Conteggio delle unità formanti colonia di *Staphylococcus aureus* nel latte di massa come dato predittivo del livello d'infezione intra-allevamento. XII Congresso Nazionale SIDILV. 27-29 Ottobre 2010.
- Normanno A, et al.2005. Coagulase-positive *Staphylococci* and *S. aureus* in food products marketed in Italy. *Journal of Food Microb.*98 73-79.
- Giacinti G., Amatiste, A. Tammaro, D. Sagrafoli, G. Giangolini, R. Rosati 2010. *S. aureus* enterotossinogeni isolati da latte crudo ovino. AIVI 2010.
- Muehlherr J.E. et al 2003. Microbiological quality of raw goat's and ewe's bulk-tank milk in Switzerland. *J. Dairy Sci.* 86. 12: 3849-3856.
- Vautor, E., G. Abadie, J. M.Guibert, C. Huard, M. Pepin. 2003. Genotyping of *S. aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Vet. Microbiol.* 96:69-79.

# Monitoraggio delle cellule somatiche nel latte di massa ovino in allevamenti della regione Lazio nel periodo 2008-2011



G. GIANGOLINI, S. AMATISTE, C. BOSELLI, G. GIACINTI, A. PROIETTI, R. ROSATI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, - Via Appia Nuova, 1411 - Roma  
Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti derivati degli Ovini e dei Caprini (CRILDOC)

**Parole chiave:** ovini, latte di massa, cellule somatiche.

**INTRODUZIONE** - È ormai dimostrato che un aumento delle cellule somatiche nel latte influenza negativamente produzione, attitudine alla coagulazione, resa casearia e caratteristiche igienico sanitarie del prodotto finale e quindi il reddito dell'azienda zootecnica. È molto importante perciò migliorare la gestione e la profilassi delle mastiti, in particolare delle forme subcliniche, causa principale dell'aumento delle cellule somatiche nel latte ovino. Le attuali normative non prevedono per il latte ovino un limite per le cellule somatiche ma è evidente l'importanza del controllo di tale parametro nel latte di massa. Con il lavoro effettuato nell'ambito della Ricerca Corrente 2000 (RC) per la definizione del valore medio nazionale e del valore fisiologico di cellule somatiche nel latte ovino e caprino (Rosati et al. 2005), è stato individuato un valore medio di 1.133.000 cell/ml (media geometrica) nel latte di massa ovino su scala nazionale. Le medie mensili hanno oscillato tra 916.000 e 1.253.000 cell/ml rilevate rispettivamente nei mesi di aprile e dicembre. Alla luce di questi risultati abbiamo voluto verificare il valore medio mensile delle cellule somatiche in campioni di latte di massa ovino pervenuti da allevamenti monitorati nell'ambito di un programma volontario, basato sullo studio dei parametri qualitativi.

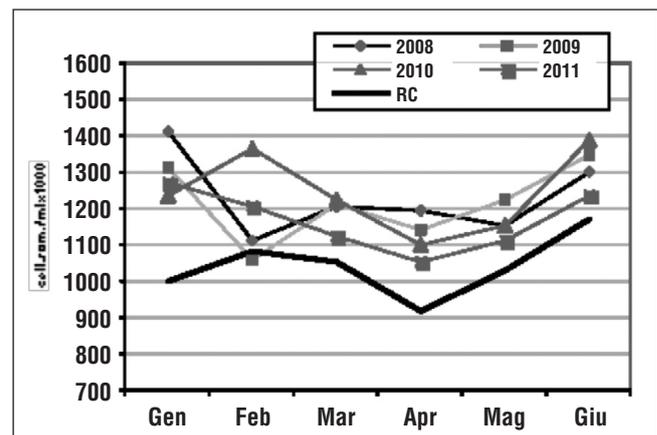
**MATERIALI E METODI** - Nel periodo 2008-2011 sono stati prelevati 7238 campioni di latte di massa ovino da un totale di 521 allevamenti distribuiti nelle province di Roma, Viterbo, Latina e Rieti che conferiscono in 5 caseifici della regione Lazio. In Tabella 1 sono elencati il numero di allevamenti controllati nei diversi anni considerati. I campionamenti sono stati effettuati da gennaio a giugno con cadenze diverse per ogni allevamento (Tab. 2). Le razze prevalentemente allevate sono risultate la Sarda e la Comisana. I campioni di latte sono stati analizzati entro 48 ore dal prelievo senza uso di conservante. Le cellule somatiche sono state determinate mediante Fossomatic 5000 (Foss Electric).  
**RISULTATI E DISCUSSIONE** - In tutti gli anni considerati si registra pressoché lo stesso andamento medio mensile (media geometrica) che risulta sempre superiore rispetto a quello ottenuto nel lavoro di Rosati et al., eccetto nel mese di febbraio 2009 (Fig. 1). Distribuendo il totale dei campioni in classi di cellule somatiche, si evidenzia una percentuale maggiore nelle classi comprese tra 1.000.000 e 2.000.000 cell/ml ed una percentuale minore nelle altre classi, rispetto alla stessa distribuzione effettuata nella ricerca citata (Fig. 2). Le differenze maggiori si riscontrano nelle classi <500.000 cell/ml e 1.001.000-1.500.000 cell/ml. Ben il 70,6% dei campioni risulta avere un numero di cellule somatiche >1.000.000/ml (Fig. 2). In base agli studi effettuati da altri A.A.<sup>2</sup> un contenuto in cellule somatiche nel latte di massa compreso tra 1.000.000 e 2.000.000/ml, indica la presenza di una percentuale di animali affetti da mastite che va dal 20 al 40%; con un numero di cellule somatiche di 2.000.000/ml la perdita di produzione può arrivare al 12%<sup>3</sup>.

**Tabella 1** - Numero di allevamenti controllati per anno.

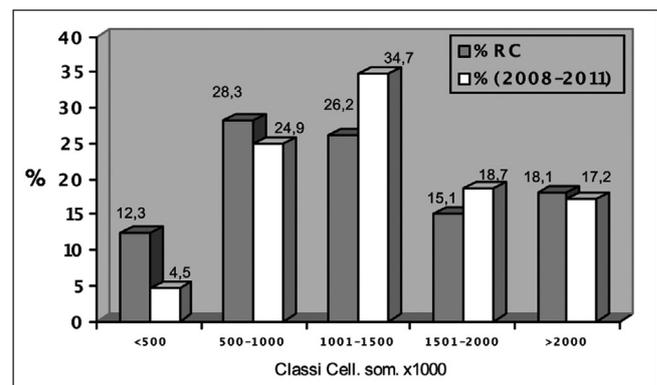
	2008	2009	2010	2011
N° allevam	506	315	230	175

**Tabella 2** - Numero dei campioni di latte di massa prelevati.

	2008	2009	2010	2011
Gennaio	243	134	220	177
Febbraio	164	173	183	258
Marzo	209	237	456	278
Aprile	326	264	518	264
Maggio	599	332	456	265
Giugno	582	225	471	204
Totale	2123	1365	2304	1446



**Figura 1** - Andamento medio mensile (media geometrica) delle cellule somatiche degli anni considerati e Ricerca Corrente 2000 (RC).



**Figura 2** - Distribuzione percentuale del numero dei campioni di latte in classi di cellule somatiche.

**CONCLUSIONI** - I risultati ottenuti denotano la persistenza di valori medi di cellule somatiche elevati nel latte di massa ovino, a conferma di un'ampia diffusione delle mastiti e della scarsa importanza attribuita alla prevenzione delle stesse, nonostante la perdita economica in termini di quantità e qualità del latte prodotto.

■ Somatic cell count of ewe bulk milk samples from herds of Lazio region during the years 2008-2011

**Key words:** ewe, bulk milk, somatic cell count.

## Bibliografia

- Rosati R., Militello G., Boselli C., Giangolini G., Amatiste S., Brajon G., Gazzoni S., Casini M., Scatassa M., Bono P., Cannas A., Mugoni G., Simula M., Denti G., Gradassi S., Fagiolo A. (2005). - Determination of the national value of bulk tank somatic cell count and physiological threshold in sheep's and goats' milk. *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*. vol. 56, pp. 161-181.
- Berthelot X., Lagriffoul G., Concordet D., Barillet F., Bergonier D. (2006) - Physiological and pathological threshold of somatic cell counts in ewe milk. *Small Ruminant Research* 62: 27-31.
- Leitner G., Silanikove N., Merin U. (2008) - Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research* 74: 221-225.

# Identificazione di una nuova variante alla $\kappa$ -caseina nella razza caprina Girgentana



R. DI GERLANDO, L. TORTORICI, M.T. SARDINA, G. MONTELEONE, B. PORTOLANO

Dipartimento DEMETRA, Università degli Studi di Palermo

**Parole chiave:** caseina, polimorfismi, capra Girgentana.

**INTRODUZIONE** - I geni delle caseine sono organizzati in un *cluster* che include  $\alpha_{s1}$ -,  $\alpha_{s2}$ -,  $\beta$ - e  $\kappa$ -caseina, mappato sul cromosoma 6 del genoma caprino. Il polimorfismo genetico delle caseine caprine è noto, ormai da anni, considerando la relazione con la qualità e le proprietà tecnologiche del latte (Martin *et al.*, 2002). La  $\kappa$ -caseina è la lattoproteina che determina la grandezza e la funzione specifica delle micelle nel latte e la sua idrolisi, chimosina dipendente, è responsabile della coagulazione del latte stesso. Il gene della  $\kappa$ -caseina comprende 5 esoni (Coll *et al.*, 1993, 1995), con una regione codificante per la proteina matura di 171 aminoacidi, di cui 9 presenti nell'esone 3 e 162 nell'esone 4 (Yahyaoui *et al.*, 2003). Ad oggi, grazie all'avvento di metodi di analisi del DNA, sono state identificate 16 varianti alleliche, di cui 13 sono varianti proteiche e 3 mutazioni silenti, per un totale di 15 siti polimorfici (Prinzenberg *et al.*, 2005). La razza caprina Girgentana è una delle più importanti razze autoctone caprine da latte allevate in Sicilia. Considerata la ridotta consistenza della razza, che ad oggi conta circa 480 capi allevati in Sicilia (ASSONAPA, 2011), potrebbe essere utile far recuperare un valore economico alla sua produzione di latte sia per il consumo fresco che per la trasformazione in prodotti di nicchia. Lo scopo di questo lavoro è stato la caratterizzazione dell'esone 4 del gene della  $\kappa$ -caseina nella razza caprina Girgentana.

**MATERIALI E METODI** - Un totale di 100 campioni sono stati prelevati casualmente all'interno di differenti allevamenti situati sul territorio siciliano. Il DNA genomico è stato estratto da sangue intero utilizzando un protocollo *salting-out*. Un frammento di 552 bp dell'esone 4 del gene della  $\kappa$ -caseina, è stato amplificato mediante il protocollo di PCR descritto da Prinzenberg *et al.*, 2005. I prodotti di amplificazione sono stati purificati e sequenziati mediante *ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Le sequenze ottenute sono state analizzate utilizzando il *software SeqScape v2.5 (Applied Biosystems)* e successivamente allineate con il *software Clustal W* contenuto nel pacchetto *BioEdit* (Hall *et al.*, 1999). I siti polimorfici sono stati confermati da un esame visivo degli elettroferogrammi. La traduzione delle sequenze nucleotidiche in aminoacidiche è stata ottenuta utilizzando il *software ExPASy-Translate*. Le frequenze alleliche e genotipiche, e l'equilibrio Hardy-Weinberg sono stati calcolati mediante il *software GENEPOP* (Rousset *et al.*, 2008).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - L'analisi delle sequenze nucleotidiche ha mostrato la presenza, all'interno della razza Girgentana, degli alleli A, B e D, identificati in precedenti lavori e riportati con la nomenclatura definitiva da Prinzenberg *et al.*, 2005. Nei campioni analizzati è stata riscontrata una nuova variante allelica nell'esone 4 del gene della  $\kappa$ -caseina. La nuova variante, provvisoriamente denominata X, è stata riscontrata in 8 individui dei 100 animali genotipizzati. L'allele X differisce dall'allele A (*GenBank* X60763) per 5 *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNPs) situati in posizione 245 T/C, 284 G/A, 309 G/A, 471 G/A e 591 T/C, mentre differisce dall'allele C (*GenBank* AY350425) per una transizione T/C in posizione 583 (Tab. 1). L'analisi della sequenza aminoacidica della variante X rispetto alla variante A ha mostrato, rispettivamente, i seguenti aminoacidi *Tyr*<sub>43</sub>/*Tyr*<sub>43</sub>, *Leu*<sub>56</sub>/*Leu*<sub>56</sub>, *Val*<sub>65</sub>/*Ile*<sub>65</sub>, *Val*<sub>119</sub>/*Ile*<sub>119</sub> e *Ser*<sub>159</sub>/*Pro*<sub>159</sub>. Dal confronto con l'allele C, la variante X mostra solo il cambio *Val*<sub>156</sub>/*Ala*<sub>156</sub>. La Tabella 2 mostra le frequenze alleliche e genotipiche degli individui analizzati. Gli alleli A e B sono risultati i più frequenti con valori rispettivamente di 0,485 e 0,370. L'allele D ha mostrato una frequenza pari a 0,105, mentre la nuova variante allelica X pari a 0,040. A questo *locus* Gigli *et al.* (2008), in individui di razza Girgentana, avevano evidenziato risultati discordanti riscontrando una maggiore frequenza dell'allele B (0,416) rispetto ad A (0,127), ed una frequenza di D pari a 0,083. Il genotipo che si è presentato con maggiore frequenza è stato AB (0,40) seguito da AA (0,20), BB (0,12) e AD (0,11). I restanti genotipi si sono presentati con una frequenza inferiore a 0,10 (Tab. 2). La popolazione è risultata in equilibrio di Hardy-Weinberg mostrando un *P-value* pari a 0,782.

**Tabella 1** - Confronto delle posizioni degli SNPs e delle varianti aminoacidiche (aa) tra la nuova variante X e gli alleli A (X60763) e C (AY350425).

Posizione SNP	A	C	X	Posizione aa	A	C	X
245	T	C	C	43	Tyr	Tyr	Tyr
284	G	A	A	56	Leu	Leu	Leu
309	G	A	A	65	Val	Ile	Ile
471	G	A	A	119	Val	Ile	Ile
583	C	T	C	131	Thr	Thr	Thr
591	T	C	C	156	Ala	Val	Ala
				159	Ser	Pro	Pro

**Tabella 2** - Frequenze alleliche e genotipiche al locus della  $\kappa$ -caseina nella razza caprina Girgentana.

Alleli	Frequenze	Genotipi	Frequenze
A	0,485	AA	0,20
B	0,370	AB	0,40
D	0,105	BB	0,12
X	0,040	AD	0,11
		BD	0,08
		DD	0,01
		AX	0,06
		BX	0,02
		DX	-
		XX	-

**CONCLUSIONI** - Ulteriori analisi saranno effettuate su un più ampio numero di individui al fine di confermare la presenza dello SNP in posizione 583 e di verificare un possibile cambiamento nella struttura della proteina.

*Ringraziamenti:* questo studio è stato finanziato dal PSR Sicilia 2007-2013, Misura 1.2.4, CUPG66D11000039999

■ **Identification of a new variant of  $\kappa$ -casein in Girgentana goat breed**

**Key words:**  $\kappa$ -casein, SNPs, Girgentana goat breed.

## Bibliografia

- ASSONAPA (2010), [Online] Available at [http://www.assonapa.it/norme\\_ecc/Consistenze\\_Caprini.htm](http://www.assonapa.it/norme_ecc/Consistenze_Caprini.htm).
- Coll A., Folch J.M., Sanchez A. (1993), *Journal of Animal Science* 71: 2833.
- Coll A., Folch J.M., Sanchez A. (1995), *Journal of Dairy Science* 78: 973-977.
- ExPASy-Translate website <http://expasy.org/>.
- Gigli I., Maizon D.O., Riggio V., Sardina M.T., Portolano B. (2008), *Journal of Dairy Science* 91: 3687-3692.
- Hall, T.A. (1999), *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.
- Martin P., Szymanowska M., Zwierzchowski L., Leroux C. (2002), *Reproduction Nutrition Development* 42: 433-459.
- Prinzenberg E.-M., Gutscher K., Chessa S., Caroli A., Erhardt G. (2005), *Journal of Dairy Science* 88: 1490-1498.
- Rousset F. (2008), *Molecular Ecology Resources* 8: 103-106.
- Yahyaoui M.H., Angiolillo A., Pilla F., Sanchez A., Folch J.M. (2003), *Journal of Dairy Science* 86: 2715-2720.

# Analisi dei principali parametri microbiologici utilizzabili per la valutazione della shelf life di campioni di carne di agnello



A.M.F. MARINO<sup>1</sup>, G. CORPINA<sup>1</sup>, M.L. PUGLISI<sup>1</sup>, L. INSERRA<sup>2</sup>, G. LUCIANO<sup>2</sup>, G. CARACAPPA<sup>1</sup>, A. SALVAGGIO<sup>1</sup>, R.P. GIUNTA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

<sup>2</sup> Università degli Studi di Catania Facoltà di Agraria

**Parole chiave:** shelf life, parametri microbiologici, carne, agnelli.

**INTRODUZIONE** - Secondo le disposizioni del "Pacchetto Igiene" ed in particolare del Reg. CE 2073/2005 e successive modifiche ed integrazioni, è responsabilità dell'OSA (Operatore del Settore Alimentare) garantire la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti messi in commercio, prendendo in considerazione anche le condizioni di conservazione e le modalità di utilizzo da parte del consumatore<sup>1</sup>. L'obiettivo di questo lavoro è stato quello di confrontare la *shelf life* di campioni di carne di agnelli alimentati con diverse tipologie di mangime e di valutare l'eventuale influenza della dieta su di essa. In Sicilia, le formule all'ingrasso per gli agnelli prevedono l'integrazione con sottoprodotti di lavorazioni agricole locali quali la polpa di carrubo e il pastazzo di agrumi. Questo è il motivo dell'interesse del lavoro per dei mangimi addizionati con tali integratori, ampiamente disponibili nelle aziende del mediterraneo, di basso costo e dotati di proprietà che agiscono sul benessere animale<sup>2</sup>. In particolare migliorano la qualità della carne e il colore. Contengono infatti fenoli e tannini condensati che hanno proprietà antiossidanti<sup>3</sup> ed inoltre migliorano la digestione nel ruminante aumentando la secrezione di soluzioni acide nello stomaco. La polpa di arancia ha un elevato potere nutritivo dato dal rilevante contenuto di pectina e dal ridotto livello di lignina che la rende facilmente digeribile<sup>4,5</sup>. La carruba è sicuramente un alimento nutraceutico perché racchiude in sé importanti proprietà nutrizionali e salutistiche, potenzialità antiossidanti e chemio-preventive. Contiene polifenoli (acido gallico in particolare, 2,57 ml per grammo) e (antocianidine) sostanze antiossidanti che, secondo recenti studi, contrastano malattie vascolari e degenerative ed inibiscono la proliferazione tumorale cellulare.

**MATERIALI E METODI** - Per la realizzazione di questo studio sono stati utilizzati 30 agnelli (1 è deceduto durante la stabulazione), di proprietà della Facoltà di Agraria dell'Università di CT, stabulati subito dopo lo svezzamento presso un'azienda sita nella provincia di Enna e suddivisi in tre gruppi differenziati in base al tipo di alimentazione. Il primo gruppo, detto controllo (C), è stato alimentato con una miscela di concentrati per agnelli; il secondo gruppo con la stessa miscela addizionata con una percentuale del 35% di polpa di carruba (C35) ed il terzo gruppo con la miscela addizionata con una percentuale del 35% di pastazzo essiccato di arance (P35). Dopo una fase sperimentale di alimentazione differenziata durata 60 giorni, si è proceduto alla macellazione degli animali, quindi le mezzene sono state poste alla T di 4°C per 24h in cella refrigerata. Si è quindi proceduto al campionamento del muscolo *longissimus dorsi*, che è stato conservato sottovuoto alla T di 4°C per 4 gg., al termine dei quali è stato sezionato in fette trasversali, mantenendo adeguate condizioni di sterilità. Le analisi di laboratorio sono state eseguite su una prima aliquota di fettine a tutto spessore immediatamente dopo il loro taglio (giorno 0) e successivamente, su una seconda aliquota, dopo sei gg. di conservazione a T di refrigerazione (giorno 6). Gli esami microbiologici sui campioni di muscolo sono stati eseguiti utilizzando come riferimento metodi normati ufficiali ed in particolare i parametri scelti per la valutazione della *shelf life* sono stati i seguenti: carica microbica totale (CMT), numerazione di *Pseudomonas* spp., numerazione di *E. coli*. La carica microbica totale (CMT), effettuata secondo l'ISO 4833: 2003 con l'utilizzo del Plate Count Agar, è un indicatore generale della condizione igienica dei campioni. L'enumerazione di *Pseudomonas* spp. è stata effettuata secondo l'ISO 13720:2010 con l'utilizzo dell'agar CFC. Lo *Pseudomonas* spp., anche se ha una T ottimale di sviluppo di 25°C, può moltiplicarsi a T di refrigerazione in quanto organismo psicrotollerante, e può arrivare a costituire fino al 90% della flora microbica totale di un alimento provocando numerosi fenomeni alterativi, come ad esempio la comparsa di odori e colorazioni anomali nelle carni. In particolare, il genere *Pseudomonas* è responsabile della produzione di composti contenenti solfuri e putrescine

derivanti da arginina e ornitina<sup>6-7-8</sup>. Infine l'enumerazione di *E. coli* effettuata secondo l'ISO 16649-2:2010, utilizzando il TBX agar, è usata come parametro di valutazione per l'eventuale contaminazione fecale.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Dai risultati si evince che in 52 dei campioni esaminati, su un totale di 58, non c'è stata crescita di *E. coli* (<1X10<sup>1</sup> ufc/g), solo per 6 campioni è stata osservata una crescita numericamente rilevabile ed in particolare: - in 3 dei campioni del giorno 0 (appartenenti 1 al gruppo C e 2 al gruppo P35) si è avuto un valore di ufc/g, al di sopra del limite inferiore m (50 ufc/g), ma comunque al di sotto del limite superiore M (500 ufc/g), riferibili al Reg. CE 2073/05 e successive modifiche; - in 1 campione del giorno 6 (appartenente al gruppo C), si è avuto un valore di carica di 460 ufc/g compreso tra il limite inferiore m (50 ufc/g) ed il limite superiore M (500 ufc/g); - in 2 dei campioni del giorno 6 (1 del gruppo P35 e 1 del gruppo C35) esaminati si è avuto un valore al di sotto di m (50 ufc/g). Per quanto riguarda la CMT, nei campioni esaminati al giorno 0 si riscontrano valori compresi tra 10<sup>3</sup> e 10<sup>6</sup> e successivamente, dopo i 6 gg. di conservazione refrigerata, la carica subisce un fisiologico aumento con valori compresi tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup>. Dall'analisi dei valori di CMT si è notato che il gruppo di controllo al giorno 0 presenta valori inferiori a quelli degli altri due gruppi, mentre al giorno 6 tale differenza non è più rilevabile, ed i valori tendono ad equivalersi. Infine, relativamente allo *Pseudomonas* spp., per 11 campioni (2 appartenenti al gruppo C, 5 al C35 e 4 a quello P35) al giorno 0 è stata rilevata una CMT con valori compresi tra 10<sup>1</sup> e 10<sup>3</sup> mentre al giorno 6 è stata rilevata una positività per 27 campioni su 29 con un aumento dei valori di carica compresi tra 10<sup>6</sup> e 10<sup>8</sup>. I dati sperimentali riportati nei lavori scientifici presenti in bibliografia indicano i valori di carica di *Pseudomonas* spp. > di 10<sup>8</sup> ufc/g come capaci di indurre evidenti fenomeni alterativi negli alimenti<sup>9</sup>.

**CONCLUSIONI** - La valutazione statistica è stata effettuata tramite analisi della varianza ad una via. Dai valori ottenuti si evince come non vi sia una differenza statisticamente significativa (P-value > 0.05) tra la *shelf life* della carne del gruppo di controllo e quella dei gruppi alimentati con le miscele addizionate, evidenziando come entrambi questi supplementi non influiscano sulla conservabilità del prodotto.

## Microbiological evaluation of the shelf life in lambs meat samples

**Key words:** Shelf life, microbiological parameters, meat, lambs.

## Bibliografia

1. Reg. (CE) n. 2073/2005 della Comm. del 15.11.005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari e successive modifiche.
2. Lanza M., Priolo A., Biondi L., Bella M., Ben Salemb H. (2001), Anim. Res; 50, 1: 21-30.
3. Ulises Macías-Cruz, et al. (2010), Trop Anim Health Prod 42:223-232.
4. Custodio L., Fernandes E., et al. (2011), J Agric Food Chem. 13;59(13): 7005-12.
5. Caparra P., Foti F., Scerra M., et al. (2007), Small Ruminant Research 68:303-311.
6. Stanley G., Kevin J., Egan A.F.S. (1981), Appl. and Env. Microbiology 41, 816-818.
7. Ingram M., Dainty R.H. (1971), Journal applied bacteriology 34, 21-39.
8. Jay J.M., Vilai J.P., Hughes M.E. (2003), Int. journal of food microbiology 81, 105-111.
9. Gennaro M., Dragotto F. (1992), Journal of Applied Bacteriology, 72: 281-28.
10. One-Way Analysis of Variance for Independent sample.

# Genotipizzazione degli SRLV in Italia: stato dell'arte



M. BAZZUCCHI, C. CASCIARI, C. TORRESI, E. ROSSI, M. GIAMMARIOLI, F. FELIZIANI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** analisi filogenetica, lentivirus dei piccoli ruminanti.

**INTRODUZIONE** - Le infezioni da lentivirus dei piccoli ruminanti (SRLV) provocano malattie a decorso lento e progressivo e sono responsabili di significative perdite economiche negli allevamenti ovi-caprini. Sebbene per lungo tempo l'infezione sia stata considerata specie-specifica, diversi studi dimostrano la trasmissione naturale di questi virus tra pecore e capre e viceversa (Pisoni et al. 2005). Negli ultimi anni è stata proposta una nuova classificazione di tipo filogenetico, che tiene conto dell'elevata eterogeneità di questo gruppo di virus. Su questa base, i prototipi riferibili a Maedi-Visna (MVV), sono stati isolati principalmente da pecore e sono stati inseriti nel gruppo A, a sua volta diviso in parecchi sottotipi con stipiti provenienti da pecore (A1, A2), da capre (A5, A7, A8) o da entrambe le specie (A3, A4, A6, A9) (Grego et al., 2007; Shah et al., 2004a e da Shah et al., 2004b); i prototipi riferibili al virus dell'artrite encefalite caprina (CAEV) invece, sono stati isolati per lo più dalle capre e si riferiscono al gruppo B, diviso in due sottotipi (B1, B2) isolati da entrambe le specie (Shah et al., 2004a e Pisoni et al., 2005). Due isolati hanno mostrato un'alta divergenza da altri gruppi e sono stati classificati nei gruppi C e D (Shah ed altri, 2004a). Recentemente, alcuni autori riferiscono l'esistenza di un nuovo genotipo E (Reina et al. 2009) isolato in Sardegna ad ulteriore conferma dell'estrema variabilità genetica di questa popolazione virale. L'aspetto filogenetico eterogeneo e l'ampio spettro d'ospite di questi virus hanno diverse implicazioni nello sviluppo di test diagnostici e quindi nell'implementazione di misure di controllo (Peterhans et al. 2004, de Andres et al. 2005); il presente studio ha perciò analizzato numerosi campioni provenienti da diverse regioni italiane dal punto di vista filogenetico con l'obiettivo di approfondire gli studi già effettuati allargando la base campionaria disponibile.

**MATERIALI E METODI** - Nel presente lavoro sono stati analizzati 112 isolati provenienti da otto regioni italiane (Lombardia, Marche, Piemonte, Sardegna, Sicilia, Toscana, Trentino Alto Adige, Umbria). Il DNA totale è stato estratto da cellule infette provenienti dalle varie matrici (*buffy coat* e latte) utilizzando il kit QIAGEN QIAamp® DNA Mini. Dagli organi infetti invece è stato estratto l'RNA totale, per mezzo del kit QIAGEN RNeasy® Mini. Il DNA o l'RNA ottenuti sono stati utilizzati per amplificare, a seguito di una nested PCR, una regione di 800bp a cavallo tra le regioni geniche *gag* e *pol* come descritto precedentemente da Rosati e collaboratori (Grego et al., 2007). Il prodotto finale di amplificazione di 800bp è stato sequenziato direttamente utilizzando il kit ABI PRISM® Big Dye® Terminator v3.1 mediante un sequenziatore ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer della Applied Biosystem. Con le sequenze forward e reverse, prodotte per ciascun isolato in tre esperimenti indipendenti, che hanno mostrato una basecalling elevata, è stata prodotta una sequenza consenso mediante il software Lasergene® del pacchetto DNASTAR. Tutte le sequenze ottenute sono state allineate con quelle di riferimento presenti in Genbank utilizzando il software Clustal X V.1.83. Il dataset di sequenze è stato quindi analizzato mediante il software BioEdit V.2.1. L'albero filogenetico è stato costruito con il software Mega V. 3.1 utilizzando il metodo di Neighbor-Joining. La validità dell'analisi filogenetica e la robustezza dell'albero è stata determinata effettuando una analisi di bootstrapping su 10.000 replicati.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - L'analisi filogenetica, condotta su questi dati preliminari, conferma la grande eterogeneità degli SRLV circolanti in Italia, rivelando, oltre alla presenza di due nuovi subgenotipi, A11, B3 (Giammarioli et al. 2011) e alla presenza del subgenotipo E anche in Umbria e alla presenza di tre isolati riconducibili ad eventi di ricombinazione virale (uno A9/A11 e due A3/A9), anche la presenza di B1 in tutti gli isolati provenienti dal Trentino Alto Adige, ad eccezione di uno appartenente

al subgenotipo A4, e, sempre di B1, in tutti gli isolati Siciliani. La presenza dei diversi subgenotipi probabilmente è il risultato della naturale variabilità del virus, ma anche dell'assenza di misure di controllo nei confronti delle infezioni da SRLV nel nostro paese. La variabilità genetica dei ceppi isolati è infatti probabilmente legata oltre che alle caratteristiche biologiche e patogenetiche del virus anche a fattori epidemiologici: le peculiarità dell'allevamento ovi-caprino, la promiscuità di greggi e delle specie allevate, unite all'assenza di misure di controllo nei confronti delle infezioni da SRLVs facilita infatti la circolazione di diversi ceppi virali in popolazioni animali anche apparentemente distanti tra loro. Oltre all'assenza di uno specifico piano di controllo sono ancora consolidate alcune pratiche di allevamento, basate sul commercio e la movimentazione dei capi che possono facilitare l'introduzione dell'infezione in allevamenti indenni o di nuovi ceppi in allevamenti già infetti.

**CONCLUSIONI** - I risultati del presente studio confermano l'elevata variabilità genetica degli SRLVs circolanti in Italia e pongono l'esigenza di sviluppare le attuali conoscenze allargando la base campionaria anche ai territori non ancora saggiati.

L'evidenza di nuovi sub-genotipi (A11, B3) come anche il riscontro di eventi di ricombinazione ci impone inoltre la necessità di opportuni approfondimenti per individuare i fattori che possono aver condizionato la variabilità delle popolazioni virali. L'adeguata conoscenza delle sequenze nucleotidiche e amminoacidiche degli SRLV e la disponibilità di dati provenienti da diverse aree geografiche sono la base indispensabile per affrontare con nuove tecnologie gli studi sull'evoluzione molecolare dei lentivirus con l'obiettivo di migliorare le performances delle tecniche di diagnostica molecolare e sierologica e programmare al meglio la gestione di piani di controllo ed eradicazione.

## Bibliografia

- Pisoni G., Quasso A. and Moroni P. (2005), Phylogenetic analysis of small-ruminant lentivirus subtype B1 in mixed flocks: evidence for natural transmission from goats to sheep, *Virology* 339, pp. 147-152.
- Grego E., Bertolotti L., Quasso A., Profiti M., Lacerenza D., Muz D., Rosati S. (2007), Genetic characterization of small ruminant lentivirus in Italian mixed flocks: evidence for a novel genotype circulating in a local goat population. *J Gen Virol*; 88(Pt 12):3423-7.
- Shah C., Boni J., Huder J.B., Vogt H.R., Muhlherr J., Zanoni R., Miserez R., Lutz H. and Schupbach J. (2004), Phylogenetic analysis and reclassification of caprine and ovine lentiviruses based on 104 new isolates: evidence for regular sheep-to-goat transmission and worldwide propagation through livestock trade, *Virology* 319, pp. 12-26.
- Shah C., Huder J.B., Boni J., Schonmann M., Muhlherr J., Lutz H. and Schupbach J. (2004), Direct evidence for natural transmission of small-ruminant lentiviruses of subtype A4 from goats to sheep and vice versa, *J. Virol.* 78, pp. 7518-7522.
- Reina R., Bertolotti L., Dei Giudici S., Puggioni G., Ponti N., Profiti M., Patta C., Rosati S. (2010), Small Ruminant Lentivirus genotype E is widespread in Sarda Goat. *Vet Microbiol.* Jul 29;144(1-2):24-31.
- Peterhans E., Greenland T., Badiola J., Harkiss G., Bertoni G., Amorena B., Eliasiewicz M., Juste R.A., Krassnig R., Lafont J.P., Lenihan P., Pettersson G., Pritchard G., Thorley J., Vitu C., Mornex J.F. and Pepin M. (2004), Routes of transmission and consequences of small ruminant lentiviruses (SRLVs) infection and eradication schemes, *Vet. Res.* 35, pp. 257-274.
- de Andrei D., D. Klein, N.J. Watt, E. Berriatua, S. Torsteinsdottir, B.A. Blacklaws and G.D. Harkiss G.D. (2005), Diagnostic tests for small ruminant lentiviruses, *Vet. Microbiol.* (107), pp. 49-62.
- Giammarioli M., Bazzucchi M., Puggioni G., Brajon G., Dei Giudici S., Taccori F., Feliziani F., De Mia G.M. (2011), Phylogenetic analysis of small ruminant lentivirus (SRLV) in Italian flocks reveals the existence of novel genetic subtypes. *Virus Genes* 43, 380-384.

# Effetto del contenuto in cellule somatiche del latte sulle proprietà chimico-fisiche e sensoriali del formaggio pecorino



D. MIRAGLIA<sup>1</sup>, D. RANUCCI<sup>1</sup>, A. VALIANI<sup>3</sup>, M. TRABALZA MARINUCCI<sup>2</sup>, G. ACUTI<sup>2</sup>, M. ORRÙ<sup>2</sup>, R. BRANCIARI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** cellule somatiche, formaggio, caratteristiche chimico-fisiche.

**INTRODUZIONE** - Attualmente per il latte ovino il Regolamento CE 853/2004, non stabilisce limiti per il contenuto in cellule somatiche. Alcuni autori ritengono che un contenuto in cellule somatiche pari a 2.000.000 cellule/ml possa considerarsi normale (Konig et al., 1985). Tuttavia diversi studi affermano che le proprietà chimico-fisiche e sensoriali di formaggi ovini fatti con latte ad elevato contenuto in cellule somatiche possono essere influenzate negativamente (Pirisi et al., 2000; Revilla et al., 2007). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto del contenuto in cellule somatiche del latte su alcune importanti caratteristiche chimico-fisiche e sensoriali di formaggio Pecorino.

**MATERIALI E METODI** - La sperimentazione è stata condotta su un gregge di ovini di razza sarda di circa 3 anni di età. Per tutta la durata della prova, i soggetti sono stati sottoposti al medesimo regime alimentare. Il latte di ogni pecora in lattazione è stato quindi analizzato per la conta delle cellule somatiche e in base ai risultati ottenuti il gregge è stato suddiviso in due gruppi, ciascuno formato da 20 soggetti, al fine di ottenere latte con un contenuto in cellule somatiche rispettivamente inferiore a 500.000 cellule/ml (B) e superiore a 2.500.000 cellule/ml (A). Nell'arco di 2 settimane a partire dal cinquantesimo giorno di lattazione, con il latte di ogni gruppo sono state eseguite caseificazioni separate, previa termizzazione (65°C per 10 secondi) e aggiunta di colture starter selezionate. Prima di ogni caseificazione il latte utilizzato è stato valutato per confermare il contenuto in cellule somatiche dei gruppi. I formaggi sono stati stagionati in cella climatizzata (12°C, 85% U.R.) per 60 gg. Durante tale periodo, ad intervalli di tempo prestabiliti sono stati eseguiti prelievi per analisi microbiologiche e chimico-fisiche. In particolare i microrganismi ricercati sono stati: Microrganismi a 30°C (ISO 8433:2003); enterobatteri (ISO 21528-2:2004); stafilococchi coagulanti + (ISO 6888-1:2004); enterococchi (ISO 7899-2:2003); lattobacilli (MRS Agar acidificato, Oxoid, a 37°C per 72h in anaerobiosi); lattococchi (M17 Agar, Biokar Diagnostics, a 30°C per 48h). Per le analisi chimico-fisiche è stato valutato il pH mediante pHMetro a infissione (MP 120 Mettler-Toledo), il colore con sistema CIE L\*a\*b\* mediante colorimetro (CR400 Minolta), la composizione centesimale (AOAC, 2000) e la stabilità ossidativa con il metodo TBARs secondo quanto descritto da Mele et al., 2011 con alcune modifiche. La quantificazione è stata effettuata con la costruzione di una curva standard con l'1,1,3,3-tetrametoxipropane (Sigma Aldrich, St. Louis). A fine stagionatura i campioni di formaggio sono stati sottoposti anche a valutazioni sensoriali mediante giudizio di un panel di esperti (n=12) utilizzando test triangolare (ISO 4120:2004) allo scopo di individuare differenze sensoriali. I campioni di formaggio sono stati serviti in pezzi (2 cm x 2 cm x 2 cm) dopo essere stati lasciati a temperatura ambiente per 2 ore prima della prova. Per ogni valutazione sensoriale è stato eseguito inoltre un test di preferenza secondo il metodo del confronto a coppie (UNI ISO 5495: 2005).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Le analisi microbiologiche dei formaggi non hanno evidenziato differenze tra le due tipologie per tutte le determinazioni effettuate, mentre l'analisi centesimale ha rilevato valori sovrapponibili per proteine, grassi e ceneri ma un'umidità maggiore nei formaggi (A) (P<0,05). I valori medi di pH, L\* e di TBARs sono illustrati in Tabella 1. A 30 e a 60 giorni di stagionatura i formaggi con alte cellule somatiche sono risultati significativamente meno acidi (rispettivamente P<0,05 e P<0,01). Questo, secondo alcuni autori, è legato all'azione proteolitica delle cellule somatiche sulla caseina durante la stagionatura, con maggiore formazione di gruppi amminici (Sousa et al., 2001). Dopo 30 (P<0,01) e 60 giorni (P<0,001) di stagionatura i formaggi (A) sono risultati anche meno luminosi. Come riportato da altri

**Tabella 1** - Valori medi di pH, di L\* e di TBARs nei formaggi durante la stagionatura.

Stagionatura	1 gg		30 gg		60 gg	
Formaggio	(A)	(B)	(A)	(B)	(A)	(B)
pH	5.28 <sup>a</sup>	5,23 <sup>a</sup>	5.32 <sup>a</sup>	5.15 <sup>b</sup>	5.38 <sup>a</sup>	5.15 <sup>b</sup>
L*	91,64 <sup>a</sup>	91,91 <sup>a</sup>	85,13 <sup>a</sup>	87,91 <sup>b</sup>	82,92 <sup>a</sup>	86,19 <sup>b</sup>
TBARs (mg/kg)	0,14 <sup>a</sup>	0,16 <sup>a</sup>	0,26 <sup>a</sup>	0,19 <sup>b</sup>	0,48 <sup>a</sup>	0,36 <sup>b</sup>

Lettere diverse nella stessa riga per lo stesso periodo di stagionatura, indicano medie significativamente diverse.

autori il valore di L\* di un formaggio può infatti essere influenzato dal quantitativo di cellule somatiche presenti nel latte (Luruena-Martinez et al., 2010). A fine stagionatura i formaggi (A) sono anche risultati più gialli (P<0,01). Il contenuto delle cellule somatiche ha influenzato significativamente (P<0,01) anche i valori di TBARs che sono risultati più alti nei formaggi (A) a 30 e 60 giorni. Questo testimonia un aumento dei processi ossidativi che potrebbero essere messi in relazione con un aumento dell'attività lipolitica nei formaggi con alte cellule somatiche (Jaeggi et al.2003). Il test triangolare ha evidenziato l'esistenza di differenze sensoriali tra i campioni di formaggio proveniente dai due diversi gruppi di animali (P<0,01). Per quanto riguarda i risultati del test di preferenza, i giudici hanno preferito i formaggi (B), definendo, nelle osservazioni, più duri e granulosi quelli (A).

**CONCLUSIONI** - Dai dati ottenuti si conferma come il contenuto in cellule somatiche del latte influisca sull'umidità, sul colore e, relativamente alla nostra sperimentazione anche sui valori di TBARs del formaggio. L'insieme delle variazioni dei parametri chimico-fisici sono tali da rendere differenti da un punto di vista sensoriale i prodotti che, come confermato da altri autori, risultano più graditi quando il contenuto delle cellule somatiche presenti nel latte è basso.

## Effect of milk somatic cells count on physical-chemical and sensory characteristics of pecorino cheese

**Key words:** somatic cells, cheese, chemical and physical characteristics.

## Bibliografia

- AOAC (2000) - Methods of analysis of AOAC International, 17th ed., Arlington, VA.
- Jaeggi JJ., Govindasamy-Lucey S., Berger YM., Johnson ME., McKusick BC., Thomas DL., Wendorff WL. (2003). J. Dairy Sci. 86, 3082-3089.
- Konig CDW., Fieten JHE., Gelling GW. (1985). Sel. Vet. XXVI 2, 216.
- Luruena-Martinez MA., Revilla I., Severiano-Perez P., Vivar-Quintana AM. (2010). Int. J. Dairy Technol. 63, 216-223.
- Mele M., Contarini G., Cercaci L., Serra A., Buccioni A., Povoletto M., Conte G., Fusaro A., Banni S., Lercker G., Secchiari P. (2011). Int. Dairy J., 21, 365-372.
- Pirisi A., Piredda G., Corona M., Pes M., Pintus S., Ledda A. (2000). Proc. 6th Great Lakes Dairy Sheep Symposium, Guelph, Ontario, Canada, pp. 47-59.
- Revilla I., Rodriguez-Nogales JM., Vivar-Quintana AM. (2007). J Dairy Res., 74, 127-136.
- Sousa MJ., Ardo Y., McSweeney PLH. (2001). Int. Dairy J. 11, 327-345.

# Trattamento con silimarina in pecore di razza sarda nel periparto



G. GIACINTI<sup>1</sup>, D. SAGRAFOLI<sup>1</sup>, U. BERNABUCCI<sup>2</sup>, S. AMATISTE<sup>1</sup>, B. RONCHI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale per le Regioni Lazio e Toscana, Roma

<sup>2</sup> Università degli Studi della Tuscia, Dipartimento DAFNE, Viterbo

**Parole chiave:** flavanolignani, silimarina, ovini, periparto.

**INTRODUZIONE** - Nel corso delle ultime settimane di gestazione la pecora va incontro a profonde modificazioni del quadro nutrizionale e metabolico, generalmente caratterizzate da un bilancio energetico negativo, dall'iperchetonemia e da stress ossidativo (Al-Qudah, 2011). Lo stato dismetabolico può, anche nelle forme subcliniche, causare effetti negativi sul sistema immunitario e sulla suscettibilità a malattie della pecora e degli agnelli (Lacetera et al., 2001; Ronchi et al., 2008), nonché sulla efficienza produttiva e riproduttiva (Boscaro De Castro et al., 2012). Studi condotti nella fase di transizione su diverse specie di ruminanti da latte hanno messo in evidenza l'utilità di impiego di alcune sostanze nutraceutiche, quali gli estratti dai semi di *Silybum marianum* (Tedesco et al., 2004; Ronchi et al., 2007). L'obiettivo del presente lavoro è di verificare l'effetto di diversi livelli di somministrazione di silimarina nella pecora da latte nel corso della fase di transizione.

**MATERIALI E METODI** - È stata allestita una prova sperimentale in condizioni di campo, presso una azienda zootecnica sita nel comune di Roma. Sulla base della presunta data di parto e di verifiche cliniche sono state selezionate 30 pecore gravide di razza Sarda, suddivise in 3 gruppi omogenei per numerosità e body condition score (BCS). I tre gruppi sono stati mantenuti per tutta la durata della prova in box separati e contigui all'interno di una struttura coperta e sono stati alimentati con fieno polifita e di erba medica e con concentrati. Il trattamento è consistito nella integrazione giornaliera di silimarina (*Silymarin Phytosome*®, Indena, Milano) miscelata in 50 g di farina di mais nel periodo compreso da ca. -30 gg dal parto fino a +35 gg dopo il parto, secondo il seguente schema: gruppo A (controllo negativo); gruppo B (0,5 g/capo/die); gruppo C (1,0 g/capo/die). Nel corso della prova sono stati eseguiti prelievi di sangue (2 per settimana), controlli settimanali del BCS e dei consumi alimentari, prelievi di alimenti e dei residui. È stato rilevato il numero dei nati per pecora ed eseguiti controlli del peso degli agnelli alla nascita e successivamente a 25 e 35 giorni di età. Sul plasma sono stati determinati: glucosio, NEFA, beta-OH butirato (BHBA), urea, colesterolo, albumine, bilirubina totale, gamma-GT, fosfatasi alcalina, AST/GOT, mediante analizzatore automatico di chimica clinica (ILAB-300, IL, USA). I dati ottenuti sono stati analizzati mediante procedura MIXED (Statistica 7 software, Stat Soft, Inc., Tulsa, OK, USA).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Il numero di agnelli nati per pecora è risultato pari a 1,5 nel gruppo A e B e 1,25 nel gruppo C. Solo nel gruppo A è stata rilevata mortalità neonatale (17%). Il peso vivo medio degli agnelli alla nascita è risultato influenzato ( $P < 0.01$ ) dal trattamento in maniera dose-dipendente (3,1, 3,7 e 3,9 kg per i trattamenti A, B e C rispettivamente). Anche gli accrescimenti medi-giornalieri a 25 e 35 giorni di età sono stati influenzati positivamente dal trattamento in maniera dose-dipendente (Tab. 1).

Il gruppo C ha mostrato un minore ( $P < 0,05$ ) calo del BCS rispetto agli altri due gruppi (-0,44, -0,52 e -0,29, in A, B e C, rispettivamente). Contestualmente i gruppi B e C hanno mostrato valori più elevati ( $P < 0,05$ ) di glucosio e più bassi ( $P < 0,01$ ) di BHBA nella fase preparto. I gruppi

**Tabella 1** - Accrescimenti medi giornalieri (AMG) nei tre gruppi (A = Controllo, B = 0,5 g/capo/die; C = 1,0 g/capo/die di silimarina) dalla nascita (0) al 25° e dal 26° al 35° giorno di età.

AMG, g/die	A	B	C
0 - 25° giorno	146 <sup>a</sup>	161 <sup>b</sup>	180 <sup>c</sup>
26° - 35° giorno	305 <sup>a</sup>	343 <sup>b</sup>	457 <sup>c</sup>
a,b,c = $P < 0.01$			

trattati con silimarina hanno mostrato valori più elevati ( $P < 0,05$ ) di colesterolo e di albumine e livelli più bassi ( $P < 0,05$ ) di bilirubina totale, gamma-GT e fosfatasi alcalina rispetto al gruppo controllo. Tra i due trattamenti il gruppo C ha mostrato livelli più alti ( $P < 0,05$ ) di colesterolo e più bassi ( $P < 0,05$ ) di bilirubina totale rispetto al gruppo B.

**CONCLUSIONI** - I risultati indicano effetti positivi della silimarina nel prevenire problemi dismetabolici tipici della pecora da latte nel periparto. Inoltre, risultano evidenti effetti positivi sulle prestazioni produttive che meritano di essere ulteriormente approfonditi.

*Lavoro svolto nell'ambito della Ricerca Corrente IZS LT 01/07 Applicazione della fitoterapia al trattamento delle mastiti e delle dismetabolie nei piccoli ruminanti.*

## ■ Treatment with silymarin in sardinian sheep in the peripartum

**Key words:** flavanolign, silymarin, sheep, peripartum.

## Bibliografia

- Al-Qudah K. M. (2011). Oxidant and antioxidant profile of hyperketonemic ewes affected by pregnancy toxemia. *Veterinary Clinical Pathology* 40/1: 60-65.
- Boscaro De Castro F.A., Ribeiro E. L., Mizubuti I. Y., Ferriera da Silva L. D., Barbosa M. A., De Sousa C. L., Pereira de Paiva F. H., Koritiaki N. A. (2012). *Revista Brasileira de Zootecnia*, 41/4.
- Ronchi B., Molina Casanova A.M., Bernabucci U., Giacinti G., Rosati R. (2007). Pregnancy toxemia prevention by feeding Sarda ewes a specific herbal extract compound. *Options Méditerranéennes, Series A*, N° 74: 407-410.
- Ronchi B., Lacetera N., Bernabucci U. (2008). Dismetabolie e risposta immunitaria nei piccoli ruminanti: il caso della tossiemia gravidica. *Large Animal review*, 14: 138-141.
- Tedesco D., Tava A., Galletti S., Tamani M., Varisco G., Costa A., Steider S. (2004). Effects of silymarin, a natural hepatoprotector, in periparturient dairy cows. *Journal of Dairy Science*, 87: 2239-2247.

# Caratterizzazione genetica mediante microsatelliti di una popolazione caprina siciliana



S. MASTRANGELO, M. TOLONE, M.T. SARDINA, B. PORTOLANO

Dipartimento DEMETRA, Università degli Studi di Palermo

**Parole chiave:** caratterizzazione genetica, microsatelliti, popolazione caprina.

**INTRODUZIONE** - Negli ultimi anni c'è stato un grande interesse per il recupero e la conservazione di razze e popolazioni locali. La Mascaruna è una capra allevata in piccoli nuclei nelle province di Palermo e Agrigento per la produzione di latte, non è soggetta a schemi di miglioramento genetico e non è ufficialmente riconosciuta come razza o popolazione. I microsatelliti sono ad oggi i marcatori molecolari maggiormente utilizzati per la caratterizzazione genetica nei caprini. Lo scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare la struttura genetica della capra Mascaruna per verificare se può essere definita come una popolazione o deve essere considerata semplicemente come un gruppo di animali derivanti da incroci tra diverse razze e popolazioni.

**MATERIALI E METODI** - L'analisi è stata condotta utilizzando un pannello di 18 microsatelliti. Il DNA è stato estratto da 60 individui di cui 20 Mascaruna (MAS), 20 Girgentana (GIR) e 20 animali derivanti da diversi incroci (MIX), al fine di paragonare la struttura genetica della Mascaruna con quella di una razza ben definita, come la Girgentana e con quella di un gruppo di individui non definiti. Il numero medio di alleli (MNA), l'eterozigosità osservata ed attesa ( $H_o$ ,  $H_e$ ) e il coefficiente di consanguineità ( $F_{is}$ ) per popolazione sono stati calcolati col software *FSTAT* (Goudet, 1995). Il contenuto di informazione polimorfica (PIC) e l'equilibrio HW sono stati calcolati col software *Cervus* (Marshall e coll., 1998). Le distanze di Nei (Nei, 1987) e Reynolds (Reynolds e coll., 1983) sono state calcolate per stimare le differenze genetiche tra le popolazioni. L'analisi delle corrispondenti fattoriali (ACF) è stata eseguita col software *GENETIX* (Belkhir e coll., 1996), mentre il dendrogramma *neighbor-joining* (NJ) è stato costruito con il software *PHYLIP* (Felsenstein, 2009). *STRUCTURE* (Pritchard e coll., 2000) è stato utilizzato per analizzare la struttura genetica delle popolazioni.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Un totale di 148 alleli sono stati osservati di cui 106 in GIR, 107 in MAS e 129 in MIX; il valore del PIC è di 0,69 e tutti i marcatori hanno mostrato un numero di alleli superiori a 4 (soglia minima per utilizzare un microsatellite negli studi di diversità genetica). Solo il microsatellite BM321 non è risultato in equilibrio HW. I parametri di diversità genetica per ciascun gruppo sono riportati in Tabella 1. I valori più alti di MNA,  $H_o$  e  $H_e$  sono stati trovati in MIX (MNA=7,17,  $H_o$ =0,700 e  $H_e$ =0,731), seguito da MAS (MNA=5,94,  $H_o$ =0,697 e  $H_e$ =0,703) e GIR (MNA=5,89,  $H_o$ =0,590 e  $H_e$ =0,666). Il più alto valore del  $F_{is}$ , che misura il livello di *inbreeding* all'interno di ciascuna popolazione, è stato trovato in GIR, mentre MAS ha mostrato il più basso valore. Alleli privati, in particolare in MAS, sono stati trovati con frequenza relativamente alta (13% e 20%). Questi alleli rappresentano importanti elementi di differenziazione

**Tabella 1** - Parametri di diversità genetica.

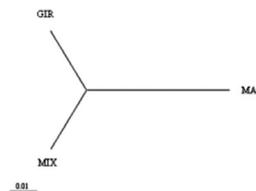
Breed	MNA	$H_o$	$H_e$	$F_{is}$
GIR	5,89	0,590	0,666	0,140
MAS	5,94	0,697	0,703	0,045
MIX	7,17	0,700	0,731	0,068

**Tabella 2** - Distanze genetiche di Nei (sotto la diagonale) e Reynolds (sopra la diagonale).

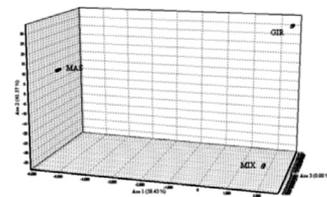
Breed	GIR	MAS	MIX
GIR	-	0,044	0,018
MAS	0,055	-	0,020
MIX	0,034	0,041	-

**Tabella 3** - Test di assegnazione di ogni popolazione ad ognuno dei clusters trovati.

Breed	1	2	3	4	5
GIR	0,506	0,154	0,033	0,220	0,087
MAS	0,098	0,131	0,476	0,085	0,210
MIX	0,240	0,365	0,018	0,147	0,230



**Figura 1** - Dendrogramma NJ.



**Figura 2** - Analisi delle corrispondenti fattoriali.

tra le popolazioni al fine di potere distinguere MAS dalle altre razze/popolazioni. L'analisi delle distanze genetiche di Nei e Reynolds, stimate utilizzando le frequenze alleliche, indicano una maggiore distanza tra MAS e GIR (Tab. 2). Le distanze genetiche di Reynolds sono state utilizzate per costruire il dendrogramma NJ (Fig. 1), dove MAS forma un cluster definito, differenziandosi dagli altri gruppi. Anche l'ACF (Fig. 2) mostra una chiara separazione di MAS rispetto agli altri due gruppi. Questi risultati mostrano quindi che MAS è il gruppo più distante, sottolineando l'ipotesi che potrebbe essere una popolazione con una struttura genetica definita, nonostante l'assenza di registro anagrafico, la possibilità di scambio con altri genomi e, in alcuni casi, la mancata disponibilità di maschi riproduttori puri. Il test di assegnazione effettuato con *STRUCTURE* (per K compreso tra 2 e 5) mostra per MAS un cluster meno definito rispetto a quello di GIR, ma più definito rispetto a MIX; infatti MAS vede l'assegnazione al cluster 3 con una percentuale quasi del 50%, confermando l'ipotesi di una probabile popolazione con un certo grado di unicità e distinzione.

**CONCLUSIONI** - Questo studio riporta i primi risultati sulla caratterizzazione genetica della capra MAS. I dati ottenuti mostrano una uniformità genetica confrontabile con quella riportata per altre razze o popolazioni ufficialmente riconosciute. Ulteriori studi verranno condotti al fine di confermare i risultati ottenuti e definire le origini della capra MAS.

## Genetic characterization of Sicilian autochthonous goat population using microsatellite markers

**Key words:** local goat population, Genetic characterization, Microsatellite markers.

## Bibliografia

- Belkhir K, Borsa P, Goudet J, Chikhi L, Bonhomme F. (1996). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows<sup>TM</sup> pour la génétique des populations. Université de Montpellier II.
- Felsenstein J. (2009). Phylogeny Inference Package PHYLIP. Version 3.69. Department of Genome Sciences and Department of Biology, University of Washington, USA.
- Goudet J. (1995). Journal of Heredity 8:485-486.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM. (1998). Molecular Ecology 7:639-655.
- Nei M. (1987). Molecular Evolutionary Genetics. Columbia University Press, New York.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. (2000). Genetics 155:945-959.
- Reynolds J, Weir BS, Cockerham C. (1983). Genetics 105: 767-779.

# Identificazione di *B. melitensis* vaccinale Rev.1 in ovini e caprini siciliani



S. CARACAPPA, V. CURRÒ, S. MARINEO, S. BRIGANÒ, A. PIAZZA, F. CUSUMANO, A. TORINA

Istituto Zooprofilattico della Sicilia "A. Mirri", Palermo

**Parole chiave:** *B. melitensis*, ceppo vaccinale Rev.1, ovini, caprini.

**INTRODUZIONE** - Le indagini epidemiologiche costituiscono una parte importante dei programmi di profilassi ed eradicazione. Una migliore comprensione delle fonti e delle modalità di trasmissione dei focolai può implementare l'efficacia delle misure di controllo. *B. melitensis* è, in Sicilia, il principale agente eziologico della brucellosi seguito, in ordine di prevalenza d'infezione, da *B. abortus*. Sono noti 3 biovar di *B. melitensis* (sebbene non tutti presenti in Sicilia) e 7 di *B. abortus*. La patologia ha ripercussioni sulla sfera riproduttiva (sterilità, aborti tardivi e parti prematuri) e sulla produzione di latte in quanto provoca micromastiti. Le strategie di controllo della brucellosi prevedono l'eliminazione dei capi infetti (stamping out) con prelievi di organi e visceri per l'isolamento e contestualmente la pastorizzazione del latte, e, talora la vaccinazione degli animali con il vaccino Rev.1. La vaccinazione è considerata uno strumento importante ed efficace per il controllo della brucellosi nei piccoli ruminanti ed è raccomandata dall'organizzazione mondiale della sanità. Il vaccino Rev.1 è considerato il più efficace per la prevenzione della brucellosi nei piccoli ruminanti<sup>3</sup> ed è stato approvato dall'OIE. Questo vaccino è stato messo a punto a partire da un ceppo vivo attenuato, non streptomycin-dipendente (la streptomycin è uno degli antibiotici usati per il trattamento della brucellosi) in fase S di *B. melitensis*<sup>4,5</sup>. L'efficacia di questo vaccino è basata sulla persistenza del ceppo negli animali vaccinati che determina una duratura risposta immunitaria<sup>6</sup>. Il ceppo vaccinale Rev. 1 ha mostrato come effetto collaterale la persistenza del microrganismo negli animali vaccinati e la possibile conseguente trasmissione orizzontale. Inoltre, nessun test sierologico può differenziare, al di là di ogni ragionevole dubbio, animali vaccinati con Rev.1 da animali infettati da ceppi naturali<sup>7</sup>. A partire da luglio 2002 la vaccinazione contro la brucellosi è stata regolamentata e il vaccino vivo attenuato Rev.1 è stato autorizzato per capi ovini e caprini di sesso femminile di età compresa tra i tre e i sei mesi. In accordo con la decisione 2002/598/CE la conservazione, la vendita e la distribuzione devono essere regolate. Gli animali vaccinati devono essere opportunamente marchiati con microchip o bolo ruminale ed esclusi dagli scambi comunitari. Scopo di questo studio è quello di riportare gli isolamenti del ceppo vaccinale Rev.1 in allevamenti siciliani.

**MATERIALI E METODI** - I campioni pervenuti in laboratorio sono stati prelevati da milza, linfonodi, testicoli, utero, placenta ecc. in impianti di macellazione, da capi positivi ai test sierologici mentre altre matrici (aborti, latte, tamponi vaginali, prepuziali) provenivano da allevamenti con patologie riferibili alla sfera riproduttiva. Gli isolamenti sono stati effettuati secondo la POS-DIA20 OIE. Tutti i ceppi di *Brucella* spp. isolati sono stati tipizzati e inviati successivamente al Centro di Referenza Nazionale per le brucellosi (Istituto G. Caporale, Teramo).

**RISULTATI** - Fino al 2009 il ceppo vaccinale Rev.1 non era mai stato isolato in allevamenti siciliani<sup>9</sup>. Nel 2010 5 isolati e nel 2011 14 isolati sono stati caratterizzati presso il Centro di Referenza Nazionale come ceppi vaccinali Rev.1. In tabella 1 sono riportati l'anno, la specie e il comune di isolamento. È possibile notare un maggior numero di isolamenti nella provincia di Messina. In uno dei comuni interessati l'isolamento è avvenuto sia nel 2010 che nel 2011.

**DISCUSSIONE** - Nel biennio 2010-2011 sono stati isolati in allevamenti siciliani 19 ceppi appartenenti al ceppo vaccinale Rev.1 di *B. melitensis*. Prima di questo periodo non erano mai stati isolati ceppi vaccinali ed è degno di nota l'incremento del numero degli isolati dal 2010 al 2011. Il ceppo Rev.1 è un ceppo vivo attenuato e anche se inoculato in animali impuberi può essere eliminato contaminando gli ambienti e provocando il contagio di animali di qualsiasi età in particolare gli animali a gravidanza inoltrata. Recentemente il ceppo vaccinale Rev.1 è stato isolato da un cane affetto da febbri ricorrenti, discospandilite e disuria e conseguentemente morto nonostante la terapia antibiotica. Il cane non aveva avuto nessun contatto con animali d'allevamento<sup>8</sup>. So-

**Tabella 1** - Tabella riepilogativa delle specie e dei comuni in cui sono stati isolati i ceppi Rev.1 di *B. melitensis*.

Specie	Anno	Mese	Comune	Prov.
ovina	2010	Ago	Riesi	CL
caprina	2010	Set	Rodi Milici	ME
caprina	2010	Ott	Fondachelli Fantina	ME
caprina	2010	Ott	Rodi Milici	ME
ovina	2010	Ott	Maniace	CT
ovina	2011	Set	Piazza Armerina	EN
caprina	2011	Mag	Barcellona PG	ME
caprina	2011	Mag	Montalbano Elicona	ME
ovina	2011	Giu	Montalbano Elicona	ME
caprina	2011	Mag	Tripi	ME
ovina	2011	Set	San Cataldo	CL
ovina	2011	Giu	Imbaccari	CT
ovina	2011	Mag	Fondachelli Fantina	ME
ovina	2011	Set	Vicari	PA
ovina	2011	Set	Licata	AG
ovina	2011	Set	Pietraperzia	EN
ovina	2011	Giu	Motta Camastra *	ME
caprina	2011	Giu	Motta Camastra *	ME
ovina	2011	Mag	Mineo	CT

\* Stesso allevamento.

no state riportate anche infezioni umane dovute al ceppo vaccinale<sup>9</sup>. Recentemente sono stati proposti vaccini acellulari privi di virulenza residua e di interferenze con la diagnosi sierologica<sup>10</sup>.

*Ringraziamenti:* Si ringraziano G. Rubino, V.D. Costantino, D. Colletta, R. D'Agostino per il supporto tecnico fornito.

## Identification of *B. melitensis* vaccine strains REV.1 in Sicilian ovines and caprines

**Key words:** *B. melitensis*, vaccine strain Rev.1, ovine, caprine.

## Bibliografia

- Picciotto D, Verso MG, Lacca G, Mangiapane N, Caracappa S, Vitale F, Vesco G (1999) Med Lav. 1999 Nov-Dec; 90(6):786-90.
- Balbo SM, Vesco G, Caracappa S (1989) XI International Symposium of the World Association of Veterinary Microbiologist, Immunologists and specialists in infectious diseases. Pg. 108.
- Alton G, Elberg S, 1967. Vet. Bull. 37, 793.
- Elberg S, Faunce K, 1957. J. Bacteriol. 73, 211-217.
- Blasco J.M. (2006). Small Ruminant Research. 62:33-37.
- Godfroid J, Scholz HC, Barbier T, Nicolas C, Wattiau P, Fretin D, Whatmore AM, Cloeckaert A, Blasco JM, Moriyon I, Saegerman C, Muma JB, Al Dahouk S, Neubauer H, Letesson JJ. Prev Vet Med. 2011; 102(2):118-31.
- Curro V, Marineo S, Vicari D, Galuppo L, Galluzzo P, Pugliese M, Migliazzo A, Torina A and Caracappa S (2012) Small Ruminant Research, in press.
- Hinić V, Brodard I, Petridou E, Filioussis G, Contos V, Frey J, Abril C. (2010). Vet Microbiol. 141(3-4):391-2.
- Blasco JM, Díaz R, (1993). The Lancet, 342 (805).
- Da Costa Martins R, Irache JM e Gamazo C (2012) Acellular Vaccines for Ovine Brucellosis Expert Rev Vaccines 11(1):87-95.

# Studio dei fattori genetici associati alla resistenza alla paratubercolosi ovina: uso di diversi test diagnostici per la classificazione del fenotipo degli animali negli allevamenti infetti



S. SECHI<sup>1</sup>, N. PONTI<sup>2</sup>, A. CARTA<sup>1</sup>, S. CASU<sup>1</sup>, C. MAESTRALE<sup>2</sup>, C. LIGIOS<sup>2</sup>, G. FOUCRAS<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Settore Genetica e Biotecnologie, AGRIS Sardegna, Italy

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italy, Dip. di Sanità Animale, 07100

<sup>3</sup> IHAP; ENVT; INRA, 31076 Toulouse Cedex 03, France

**Parole chiave:** paratubercolosi, resistenza genetica, Elisa, istopatologia.

**INTRODUZIONE** - La paratubercolosi è una malattia infettiva dei ruminanti provocata dal *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis (Map). La malattia è causa di notevoli perdite economiche per gli allevatori. Non è inoltre completamente chiarito il ruolo del Map nell'eziologia di alcune malattie dell'uomo (morbo di Chron's, sclerosi multipla) (Sechi L. et al. 2006, Cossu D. et al., 2012). Le tecniche di controllo consistono nell'eliminazione degli animali infetti e nella vaccinazione, la cui efficacia non è stata ancora provata. Alcuni studi hanno confermato l'esistenza di una componente genetica che influenza la suscettibilità alla malattia sia nei bovini (Shook G.E. et al., 2012) che negli ovini (Sechi S. et al, 2010). La selezione genetica appare, quindi, un approccio possibile per la prevenzione e il controllo della malattia. Una delle limitazioni per lo studio della resistenza genetica alla paratubercolosi è per l'individuazione di zone del genoma che influenzano questo carattere è l'assenza di fenotipi affidabili. I test diagnostici attualmente in uso sono efficaci per screening massali mirati a valutare la prevalenza della malattia ma non consentono di identificare con precisione lo status del singolo animale. La paratubercolosi ha un periodo di incubazione di alcuni anni e i test diagnostici non mostrano sensibilità elevate, dato altresì che le performance dei diversi test variano con lo stadio della malattia (Nielsen S. S. and Toft N., 2008). La difficoltà di discriminare correttamente tra animali 'sani' e 'malati' può influenzare la stima nelle analisi genetiche (Osterstock J.B. et al., 2010). Per ovviare all'assenza di singoli test diagnostici definitivi, è possibile utilizzare test diagnostici multipli. Scopo del presente lavoro è quello di verificare la capacità di differenti combinazioni dei test nella definizione dello stato sanitario del singolo individuo.

**MATERIALI E METODI** - In un gregge creato con l'obiettivo di individuare le zone del genoma ovino implicate nei meccanismi di resistenza alle patologie, tra cui la paratubercolosi, sono state realizzate diverse analisi per la definizione dello stato sanitario dei singoli animali. Innanzitutto, sono stati registrati tutti gli animali che durante il periodo della prova (2000-2012) presentavano sintomatologia clinica. I capi deceduti per sospetta paratubercolosi sono stati confermati a partire dal 2006 con l'analisi sierologica e istopatologica. L'analisi sierologica è stata eseguita sull'intero gregge, una volta all'anno nei primi 5 anni e ogni sei mesi in seguito. Al momento della macellazione, a 4 anni di età, sono stati prelevati tessuti dell'ileo e del linfonodo meseraico sui quali sono state eseguite le analisi anatomico-istologiche e la colorazione di Ziehl-Nielsen. Inizialmente si è definito un unico status dell'animale per l'intera carriera attraverso l'utilizzo delle varie analisi sierologiche realizzate. Sono state prese in considerazione due diverse soglie di Sample to Positive Ratio (il rapporto tra le densità ottiche del campione e i controlli): una soglia al 50% (S50) e una al 60% (S60). Per la definizione dello status per carriera sono stati presi in considerazione solo gli animali con più di 4 prelievi. Un animale è stato considerato 'sano' se era sieronegativo all'ultimo controllo e aveva un numero di controlli positivi inferiore al 33%. Viceversa un animale con anche il solo ultimo controllo positivo è stato classificato 'positivo'. Gli animali con alternanza tra controlli sieropositivi e sieronegativi sono stati esclusi dall'analisi. Definito lo status sierologico si è provveduto a classificare i dati secondo 2 diverse modalità: 1) un'interpretazione 'parallela' dei test, considerando un animale 'malato', se almeno uno dei test diagnostici, risultava positivo e 'sano' se tutti i test erano negativi; 2) un'interpretazione 'combinata' che ha valutato i diversi test contemporaneamente attribuendogli un diverso peso: un animale con sintomi viene considerato 'malato'; in assenza di sintomi un animale che presenta sierologia e istologia positive viene considerato 'malato' così come con la sola istologia positiva. Sono considerati 'sani' gli animali che non hanno avuto sintomi e sono negativi sia per la sierologia che per l'istologia. Gli animali 'positivi' solo per la sierologia vengono esclusi dal calcolo.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Gli animali con almeno 4 controlli sierologici e un controllo istologico (1571) o che sono stati segnalati come sintomatici (301) sono 1872. Il numero medio di prelievi per l'analisi sierologica per animale è stato di  $5.82 \pm 1.28$ . La prevalenza, escludendo i sintomatici, di animali sieropositivi S50 è stata del 20.16% mentre la prevalenza S60 è stata del 17.47%. 83 animali sono stati esclusi dal calcolo perché presentavano risultati sierologici di difficile definizione. Si è scelto di utilizzare la soglia S50 per le successive analisi perché il numero di animali sintomatici individuati con questa soglia è risultato superiore alla S60. La prevalenza degli animali con lesioni all'esame istologico, esclusi i sintomatici, è stata del 15.72%. Solo il 43% degli animali con lesioni all'istologico sono stati individuati come positivi dall'analisi sierologica. Viceversa il 16% degli animali senza lesioni all'istologico è stato definito come 'positivo' dall'analisi sierologica (199). Tra gli 83 animali che hanno presentato sintomatologia clinica e lesioni istologiche 11 sarebbero stati definiti 'sani' dall'analisi sierologica. Gli animali che sono risultati positivi ad almeno uno dei tre test diagnostici, sono il 33.59%. L'analisi combinata dei test, così come precedentemente definita, risulta in una prevalenza inferiore (23.25%), sebbene un numero più elevato di animali (500) sia stato escluso dall'analisi. Come evidenziato, non vi è concordanza tra le diverse analisi, e l'utilizzo di un test diagnostico rispetto ad un altro, così come una loro combinazione, porta a classificare gli animali in maniera differente introducendo possibili bias nell'analisi genetica.

**CONCLUSIONI** - La definizione corretta dello stato sanitario di un animale è di primaria importanza per gli studi genetici. Sono necessari ulteriori dati per la definizione di metodiche basate su test singoli o combinati che consentano di classificare più precisamente lo stato sanitario dei singoli animali. Più in generale, gli studi per la valutazione della componente genetica della resistenza alle malattie necessitano di test diagnostici precisi e applicabili su larga scala che consentano di classificare inequivocabilmente gli individui.

## Genetic resistance to paratuberculosis: using multiple diagnostic tests to classify disease status

**Key words:** paratuberculosis, genetic resistance, ELISA, histopathology.

## Bibliografia

- Cossu D, Cocco E, Paccagnini D, Masala S, Ahmed N, Frau J, Marrosu M.G., Sechi L. A. 2011. Association of Map with Multiple Sclerosis in Sardinian Patients. PLoS ONE 6(4).
- Nielsen S.S., Toft N. 2008. Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: A review of accuracies of ELISA, interferon-g assay and faecal culture techniques. Vet. Mic. 129 217-235.
- Osterstock J. B., Sinha S., Seabury C.M., Cohen N.D. 2010. Effect of classifying disease states in genetic association studies for paratuberculosis; Prev. Vet. Med. 95 41-49.
- Sechi L. A, Gazouli M., Sieswerda L. E, Molicotti P, Ahmed N., Ikononopoulos J, Scanu A.M., Paccagnini D., Zanetti S. 2006. Relationship between Crohn's disease, infection with Map and SLC11A1 gene polymorphisms in Sardinian patients. W J G 12(44): 7161-7164.
- Sechi S., Salari S., Ligios C., Ponti N., Foucras G., Casu Sara 2011. Genetic parameters for antibody response to MAP in natural infected flock. IJAS volume 10: supplement 1.
- Shook G. E., Chaffer M., Wu X.-L. and E. Ezra 2012. Genetic parameters for paratuberculosis infection and effect of infection on production traits in Israeli Holsteins; Anim Gen 43, 56-64.

# Studio delle popolazioni di batteri lattici presenti nell'intestino di agnelli sottoposti ad alimentazione diversificata



A. SALVAGGIO<sup>1</sup>, A. SCALIA<sup>1</sup>, A. MURATORE<sup>1</sup>, L. INSERRA<sup>2</sup>, R. SANTANGELO<sup>1</sup>, R.P. GIUNTA<sup>1</sup>, A.M.F. MARINO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

<sup>2</sup> Università degli Studi di Catania Facoltà di Agraria

**Parole chiave:** batteri lattici, intestino, feci, agnelli.

**INTRODUZIONE** - L'importanza della presenza della naturale microflora intestinale per la prevenzione di patologie nell'uomo e negli animali è nota da tempo. È ampiamente dimostrato in bibliografia che la composizione della microflora gioca un ruolo cruciale sia nei processi digestivi che nella resistenza alle patologie.

Diversi fattori esterni possono influenzare la microflora intestinale, tra questi vi è la dieta, lo stress, l'età e le condizioni generali di vita (1).

Scopo di questo studio è stato quello di identificare le popolazioni di batteri lattici isolati dalle diverse aree del tratto gastro-intestinale di gruppi di agnelli alimentati con diete differenti.

**MATERIALI E METODI** - Per questo lavoro sono stati utilizzati sia campioni di feci prelevati da animali in vita che tratti intestinali (duodeno, digiuno ed ileo) prelevati dagli stessi animali dopo macellazione. Il campionamento è stato eseguito su 50 agnelli di proprietà della Facoltà di Agraria dell'Università degli Studi di Catania stabulati presso un'Azienda sita nella provincia di Enna. Questi sono stati suddivisi in cinque gruppi differenziati tra loro per la tipologia di alimentazione, costituita, per il primo gruppo, utilizzato come controllo (C), da una miscela di concentrati per agnelli, per il secondo e il terzo gruppo da una miscela addizionata rispettivamente con una percentuale del 24% e del 35% di pastazzo essiccato di arance, per il quarto e quinto gruppo da una miscela addizionata da una percentuale del 24% e del 35% di polpa di carruba.

Per i campioni di feci sono stati eseguiti tre campionamenti nell'arco di due mesi, con la programmazione di un campionamento ogni 20 gg. circa a partire da 20 gg dall'inizio della fase di alimentazione sperimentale fino alla macellazione.

Successivamente, durante la macellazione degli animali sono stati campionati i tratti intestinali.

In laboratorio l'isolamento dei batteri lattici è stato effettuato utilizzando il seguente protocollo di lavoro:

- semina diretta in piastre di MRS agar dei campioni precedentemente diluiti in MRS broth e incubazione delle stesse per 48h a 37°C, a 25°C e a 42°C in condizioni di anaerobiosi;

- incubazione dell'MRS broth per 72h a 37°C in condizioni di anaerobiosi e successiva semina in MRS agar e incubazione per 48h a 37°C.

Dopo l'incubazione, dalle piastre sono state isolate le colonie dalla morfologia più significativa, ed effettuati gli opportuni test di identificazione: colorazione di Gram, test dell'ossidasi, della catalasi e tipizzazione biochimica mediante strumento Biolog.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Dai campioni di feci ed intestini esaminati sono state isolate 17 specie del genere *Lactobacillus*: *L. acidophilus*, *L. reuteri*, *L. oris*, *L. salivarius* ss *salicinius*, *L. plantarum*, *L. alimentarius*, *L. buchneri*, *L. murinus*, *L. paracasei*, *L. fermentum*, *L. mali/sakei*, *L. brevis*, *L. bifementans*, *L. helveticus*, *L. delbruecki*, *L. bifementans*, *L. paracasei* ss *tolerans*, *L. parabuchneri* e 6 specie appartenenti al genere *Bifidobacterium*: *B. bifidum*, *B. merycium*, *B. adolescentis*, *B. pseudolongum*, *B. longum*, *B. magnum*.

Dai risultati si osserva la crescita di un maggior numero di colonie di lattobacilli dai campioni biologici (feci ed intestino) dopo arricchimento in brodo selettivo MRS broth, rispetto alla semina diretta su MRS agar.

Inoltre una crescita maggiore di colonie si è avuta dai campioni di feci rispetto ai tratti intestinali. Per quanto riguarda gli isolamenti dalle feci, tra i vari gruppi di agnelli la maggiore varietà di specie di Lattobacilli isolate si è avuta dai campioni provenienti dagli animali alimentati con le miscele contenenti polpa di carruba. I campioni di feci rappresenta-

no un importante strumento per lo studio della flora microbica dominante e insieme ai tratti intestinali permettono di avere una maggiore rappresentatività delle specie presenti (2,3,4).

I bifidobatteri sono stati isolati esclusivamente dai campioni di feci, e non vi è stata differenza di crescita in relazione al diverso tipo di alimentazione ai quali erano sottoposti i vari gruppi di animali.

Tra tutte le specie isolate ed identificate la più frequente è stata *L. reuteri*, (naturalmente presente nell'ecosistema del tratto gastrointestinale dei vertebrati).

Per quanto riguarda gli isolamenti dagli intestini il segmento dal quale si è ottenuto il maggior numero di specie è il duodeno. In relazione alla diversa alimentazione dei gruppi di animali non si è evidenziata una differenza di risultati, e la specie di lattobacilli maggiormente identificata è stata *L. salivarius*.

Favorire la presenza dei lattobacilli attraverso l'alimentazione negli agnelli nelle prime fasi della loro vita può risultare utile al fine di esaltare le performance produttive e il benessere degli animali. Infatti in letteratura è dimostrato che la presenza di batteri lattici in piccoli agnelli porta ad un maggior incremento ponderale giornaliero, ad un migliore indice di conversione e ad una minor frequenza di episodi diarroici (5). Su agnelli di 2-3 mesi l'uso di probiotici ha indotto una maggiore efficienza del sistema immunitario. (6)

**CONCLUSIONI** - Dai risultati ottenuti si evince che, sebbene non vi sia una differenza nella varietà delle specie di batteri lattici in relazione al diverso tipo di miscela di concentrati distribuita ai diversi gruppi di animali, una maggiore quantità di isolamenti è stata ottenuta con una alimentazione composta da miscele contenenti polpa di carruba.

È possibile ipotizzare quindi un effetto positivo sullo sviluppo dei lattobacilli nel tratto intestinale, esercitato da un'alimentazione a base di polpa di carruba, con conseguenti benefici sull'incremento ponderale giornaliero e sul benessere generale dell'animale.

## ■ Study of lactic acid bacteria in the intestinal tract of lambs with diversified diet

**Key words:** lactic acid bacteria, intestinal tract, faeces, lambs.

## Bibliografia

1. Vilková E., Grmanová M., Rada V., Homutová I., Dubná S., Czech J. 2009 Anim. Sci., 54 Selection of probiotic bifidobacteria for lambs (12): 552-565.
2. Zoetendal, E.G., Collier, C.T., Koeke, S., Mackie, R.I., Gaskins, H.R., 2004 Molecular ecological analysis of the gastrointestinal microbiota: a review.
3. Drakslar D., Locascio M., Gonzalez S., Oliver G. (2002) Elsevier Small Ruminant Research 46 The development of faecal flora in young Creole goats 67-70.
4. Collado M.C., Sanz Y. 2007 Science Direct Veterinary Microbiology 121 Quantification of mucosa-adhered microbiota of lambs and calves by use of culture methods and fluorescent in situ hybridization coupled with flow cytometry techniques (299-306).
5. Ripemonti B. Stella S. 2009 Large animal review 15.7 Bacterial spore formers as probiotics for animal nutrition. -12.
6. Kalic S., Zhao T., Harmon B.G., Doyle M.P., Brown C.A., Zhao P. (2003).
7. Fecal shedding of henteroemorrhagic E.coli in weaned calves following treatment with robiotic E. coli. Journal of food protection, 66,1184-1189.

# Valutazione del rischio di re-introduzione della brucellosi ovicaprina in regioni ufficialmente indenni



E. BANDINO, M. MULAS, L. GODDI, A. COCCOLLONE, S. CAPPAL, S. ROLESU

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi" - Sassari

**Parole chiave:** movimentazione animali, *Brucella melitensis*, test sierologici.

**INTRODUZIONE** - Nel corso del 2011, in occasione dei controlli sierologici previsti dal DAIS n. 17 del 28.03.2011 sui capi ovis e caprini di introduzione comunitaria (Spagna), è stato individuato precocemente un focolaio di brucellosi, con successivo isolamento di *Brucella melitensis* biovar 1, stipite batterico non presente nel territorio italiano.

Scopo del lavoro è mettere a confronto l'attuale procedura di controllo, messa in atto su tutti i capi in entrata, con una che preveda il controllo di un campione degli stessi. In tal modo si intende valutare il rischio di re-introduzione della brucellosi ovicaprina in regioni, come la Sardegna, ufficialmente indenni.

Per la validazione del modello teorico, basato sulle linee guida O.I.E., sono stati utilizzati i dati di introduzione di capi da uno stato membro (Spagna) nel corso del 2011 nel territorio della regione Sardegna.

**MATERIALI E METODI** - L'analisi del rischio di reintroduzione in Sardegna di animali infetti da *Brucella melitensis*, è stata eseguita utilizzando VetRAS\*, un apposito software statistico in grado di effettuare l'analisi dei rischi correlati al commercio internazionale di animali e dei loro prodotti. Sono stati utilizzati i parametri relativi alle importazioni di ovis e caprini dalla Spagna. Nel 2011 sono stati importati dalla Spagna 11 lotti di animali, la numerosità dei quali variava da un minimo di 15 capi fino ad un massimo di 335. In Spagna la prevalenza della malattia è, secondo dati ufficiali del Ministero dell'Agricoltura spagnolo, dello 0,45% sugli animali e dell'1,63% per quanto riguarda gli allevamenti. La sensibilità e la specificità delle prove di sieroagglutinazione rapida (SAR) e fissazione del complemento (FdC) utilizzate in parallelo, così come previsto dalla normativa comunitaria, sono rispettivamente del 96,7% e del 99,9%.

\* VetRAS: *Veterinary risk assessment simulations* - prodotto dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise con la collaborazione del Ministero della Sanità, Dipartimento Alimenti, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Dal grafico nella figura 1 è possibile osservare le curve degli scenari che potrebbero presentarsi qualora si effettuasse un controllo, sui capi importati nel nostro territorio, inferiore al 100% degli animali. Nella relativa tabella gli stessi dati sono riportati sotto forma di rischio, espresso in percentuale, di avere uno o due focolai di Brucellosi ovicaprina a seguito di importazione di animali.

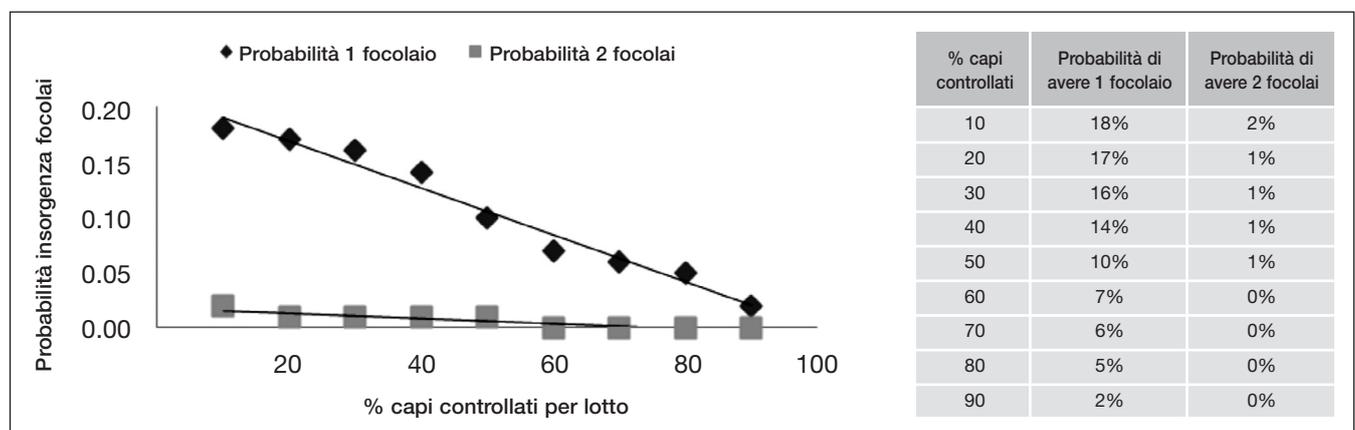
**CONCLUSIONI** - La curva di rischio ottenuta, nonché la positività riscontrata in occasione del controllo ufficiale degli animali, dimostrano che la sola certificazione veterinaria della provenienza degli animali (ovini e caprini in questo caso) da allevamenti Ufficialmente Indenni (UI) da brucellosi non è sufficiente a scongiurare il rischio di re-introduzione della malattia in un territorio UI. L'esecuzione dei due test in serie (SAR e FdC) continua ad essere valida, al fine di individuare i capi infetti e di poter, quindi, evitare il diffondersi dell'infezione.

## Risk assessment of reintroducing small ruminant brucellosis in officially free regions

**Key words:** intra Community Trade Animal, *Brucella melitensis*, serological tests.

## Bibliografia

- Direttiva 91/68/CEE del Consiglio, del 28 gennaio 1991, relativa alle condizioni di polizia sanitaria da applicare negli scambi intracomunitari di ovini e caprini.
- Minas A., Stournara A., Minas M., Stack J., Petridou E.  
Christodoulopoulos G., Krikelis V. (2007) *Journal of Immunological Methods* 320 94-103.
- Programa Nacional de Erradicación de la Brucellosis Ovina y Caprina (*B. melitensis*). Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino, Espana 2011.
- Risk analysis, animal health and trade; *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, Vol.12 n.4, 1993. Paris - France.



**Figura 1** - La curva di rischio esprime la probabilità dell'insorgenza di focolai di brucellosi ovicaprina in un territorio ufficialmente indenne a seguito di introduzioni di capi dalla Spagna. Il calcolo è stato effettuato in funzione della percentuale di capi in entrata sottoposti a controllo sierologico. Nella tabella le stesse informazioni sono espresse in termini percentuali.

# Modello di gestione di un piano operativo straordinario nel Servizio di Sanità Animale della ASL di Sassari: Piano Straordinario per l'identificazione elettronica e la Selezione Genetica degli arieti per la resistenza alle EST – Utilizzo sistema GIS



F. SGARANGELLA, G. BITTI, D. MARONGIU, P.P. CUCCURU, S. MASALA, V. FLORIS, C. SANNA, B. MOSSA

Asl di Sassari-Dipartimento di Prevenzione-Servizio Sanità Animale

**Parole chiave:** arieti, identificazione elettronica, procedure, gis.

**INTRODUZIONE** - Nell'ambito del Piano di Selezione Genetica per la resistenza alle EST, approvato con delibera N. 4 del 29 aprile 2009, la Giunta della Regione Sardegna ha previsto l'identificazione elettronica di tutti gli arieti nati prima del 1 Gennaio 2010 con delibera n°48/6 del 27/07/09.

Il territorio dell'azienda ASL di Sassari si estende per una superficie di 428.208 ettari, divisi tra i Distretti di Sassari, Alghero, Goceano ed Ozieri. Le aziende ovine presenti erano 3426, con un patrimonio di 946.294 capi di cui circa 20.000 erano gli arieti stimati, in gran parte da sottoporre ad identificazione elettronica, perché sprovvisti di tale mezzo identificativo.

Il Servizio di Sanità Animale della ASL di Sassari ha predisposto un programma straordinario che aveva come obiettivi: l'identificazione elettronica e la genotipizzazione di tutti gli arieti presenti nelle aziende ovine nell'arco di 6 mesi. Al fine di raggiungere gli obiettivi, il Servizio di Sanità Animale ha previsto l'uso di moderni strumenti di programmazione (procedura documentata) e di innovativi sistemi informativi (software dedicato, GIS).

**MATERIALI E METODI** - Le modalità esecutive sono state organizzate in una procedura documentata che ha avuto lo scopo di uniformare le operazioni di realizzazione del programma. Questa è stata articolata in 11 fasi di processo con relativa individuazione delle "responsabilità" e con vari allegati forniti ai veterinari per la rilevazione e la registrazione dei dati prodotti nelle varie fasi. Il Servizio di Sanità Animale si è quindi dotato di un *software* dedicato, una banca dati locale (E-VET), costituita dai dati ufficiali acquisiti dalla BDN e da informazioni raccolte nel territorio dai veterinari. E-VET ha permesso la realizzazione di un'anagrafe individuale di tutti gli arieti presenti nelle aziende identificati elettronicamente e genotipizzati. La banca dati locale ha, inoltre, permesso la realizzazione di un GIS per la produzione di mappe e report utilizzati per l'assegnazione dei carichi di lavoro, l'individuazione delle criticità, il monitoraggio dello Stato Avanzamento Lavori del programma, l'eventuale scostamento dagli obiettivi e la riprogrammazione delle attività.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I dati sull'attività svolta sul campo venivano raccolti settimanalmente con una reportistica a livello distrettuale, attraverso la compilazione dell'apposita modulistica prevista in procedura che riguardava sia le operazioni di identificazione elettronica che la genotipizzazione degli arieti. È stato in questo modo possibile alimentare il sistema informativo e monitorare l'andamento del piano. Si è inoltre attivato un servizio di *Help desk* attraverso l'apertura di una casella di posta elettronica per fornire informazioni e assistenza agli attori del programma straordinario.

Alla fine del progetto sono stati quindi inseriti in Banca Dati Nazionale 16.394 arieti genotipizzati in 3126 allevamenti ovini (in 496 allevamenti non erano presenti arieti).

Durante il programma straordinario sono stati inoltre identificati elettronicamente ("bolati") 11.922 capi.

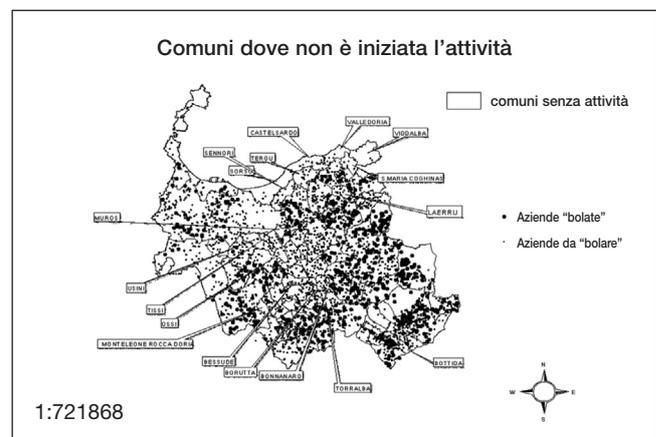


Figura 1

**CONCLUSIONI** - Il corretto utilizzo dei sistemi messi in essere dal Servizio di Sanità Animale della ASL di Sassari ha permesso il monitoraggio degli stati di avanzamento delle attività con mappe tematiche (Fig. 1) e report realizzati col GIS. Grazie al modello utilizzato l'attività è stata svolta in maniera uniforme in tutto il territorio di competenza della ASL con un'azione di supporto organizzativo-gestionale ai veterinari impegnati nel programma straordinario e quindi con una puntuale e adeguata programmazione. La realizzazione del *database* consente inoltre una migliore gestione delle movimentazioni degli arieti attraverso una puntuale tracciabilità e rintracciabilità degli stessi.

Un'efficace epidemiosorveglianza nei confronti della *scrapie* non può prescindere da una corretta identificazione degli arieti e da basati affidabili e puntuali in territori quali, la provincia di Sassari, che ha il più alto numero di ovini in Italia, e allevamenti di così alto valore genetico. I risultati ottenuti indicano la validità del metodo e la possibilità che questo possa essere efficace nella realizzazione di analoghi progetti. Ogni fase del processo potrebbe essere adattata ad altri programmi straordinari per la lotta alle varie malattie infettive.

Oggi è possibile affermare che il piano operativo straordinario realizzato dal Servizio di Sanità Animale della ASL di Sassari (1/3 circa del patrimonio ovino della Regione Sardegna) ha dato un contributo rilevante all'attuazione del piano di selezione genetica adottato dalla Regione Sardegna, e ha fornito un modello operativo esportabile in altre realtà.

■ Management of an extraordinary plan for the electronic identification and the selection of rams for TSE resistance. Using the GIS system

**Key words:** rams, electronic identification, procedures.

# La tulatromicina nelle infezioni respiratorie della pecora



F. NACCARI<sup>1</sup>, F. GIOFRÈ<sup>2</sup>, M. MICHENZI<sup>3</sup>, A. LAURIA<sup>3</sup>, V. NACCARI<sup>3</sup>, G.E. ARCADIPANE<sup>1</sup>, A. BASSINI<sup>4</sup>, A. SORIOLO<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria Università di Messina;

<sup>2</sup> ASP. n. 8 Vibo Valentia; <sup>3</sup> Libero Professionista; <sup>4</sup> Pfizer Italia

**Parole chiave:** tulatromicina, infezioni respiratorie, pecore, Calabria.

**INTRODUZIONE** - La tulatromicina è un macrolide di ultima generazione utilizzato, per la sua farmacodinamica e farmacocinetica (Nowakowski et al., 2004), in un'unica somministrazione i.m. o s.c. nelle infezioni respiratorie batteriche sostenute da germi Gram-negativi quali *Mannheimia (Pasteurella) haemolytica*, *P. multocida*, *H. somnus* e *M. hyopneumoniae* di bovini, suini e caprini (Clothier et al., 2012). In precedenza è emersa per la prima volta dalle nostre ricerche, l'efficacia terapeutica della tulatromicina nei confronti delle mastiti batteriche della pecora sostenute da germi Gram-positivi (*Staphylococcus epidermidis* coagulasi-negativo, *Staph. aureus* e *Staph. spp.*) (Naccari et al., 2011). Nella presente indagine è stata valutata l'efficacia terapeutica della tulatromicina nei confronti delle infezioni batteriche delle vie respiratorie della pecora.

**MATERIALI E METODI** - Le indagini sono state condotte su 33 pecore appartenenti a diversi allevamenti ubicati nel territorio della regione Calabria affette da patologie respiratorie (broncopolmoniti, bronchiti e sindromi respiratorie). Dallo scolo nasale di ciascun animale è stato effettuato il prelievo per l'esame batteriologico (Naccari et al., 2009). Il grado di positività è stato espresso in modo convenzionale da + a +++ rapportato al logaritmo della carica microbica (Tab. 1). La sensibilità dei ceppi batterici isolati è stata valutata "in vitro" nei confronti di antibiotici di uso veterinario (ampicillina, gentamicina, amikacina, floramfenicolo, ossitetraciclina ed enrofloxacin). L'efficacia terapeutica della tulatromicina, dopo singola somministrazione (2,5 mg/Kg s.c.), è stata valutata sulla base del miglioramento della sintomatologia clinica (Tab. 2) e della carica microbica nei campioni di scolo nasale, prima e dopo il trattamento (Tab. 1). I dati ottenuti sono stati sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) e Student-Newman-Keuls-test ( $p < 0,01$ ).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Dallo scolo nasale delle pecore esaminate sono stati isolati ceppi di *M. haemolytica* (n=14), *P. multocida* (n=8), *M. ovipneumoniae* (n=6) e *Pseudomonas spp.* (n=5) (Tab. 1), resistenti agli antibiotici sopra citati. L'efficacia terapeutica della tulatromicina è stata evidenziata dopo 2 giorni dalla somministrazione, con remissione significativa della sintomatologia generale (scomparsa di febbre e ritorno dell'appetito) e riduzione dei segni clinici respiratori. La totale scomparsa dei sintomi ed il recupero della funzionalità respiratoria sono stati registrati dopo 5 giorni dal trattamento (Tab. 2). Inoltre, nessuna carica batterica è stata evidenziata nei campioni di scolo nasale a 7gg e 15gg dal trattamento farmacologico.

**Tabella 1** - Indagine batteriologica in campioni di scolo nasale di pecore a vari tempi dalla somministrazione di tulatromicina.

Ceppi identificati	T0	T1	T2	T3	T4
<i>M. (Pasteurella) haemolytica</i> (14)	++++	++++	++	+	-
<i>Pasteurella multocida</i> (8)	++++	+++	++	-	-
<i>Mycoplasma ovipneumoniae</i> (6)	++++	+++	+	+	-
<i>Pseudomonas spp.</i> (5)	++++	+++	+	-	-

Concentrazione batterica: ++++ = 10<sup>6</sup>; +++ = 10<sup>5</sup>; ++ = 10<sup>4</sup>; + = 10<sup>3</sup>  
T1=48h; T2=72h; T3=5gg; T4=7gg

**Tabella 2** - Effetti della tulatromicina (2,5 mg/kg s.c.) sullo scoring clinico (valori medi ± D.S.) di 33 pecore con infezioni respiratorie.

Sintomatologia clinica	Prima del trattamento	2 gg	3 gg	5 gg
<b>Broncopolmoniti (14)</b>				
<i>M. haemolytica</i>				
• Dispnea	2,29±0,46	1,50±0,52	0,43±0,21	—
• Tosse	1,92±0,73	1,28±0,46	0,50±0,31	—
• Scolo Nasale	1,64±0,63	0,92±0,61	0,50±0,21	—
• Altri sintomi	2,00±0,55	1,21±0,42	0,42±0,11	—
• Temperatura	40,5±0,49	39,4±0,38	38,5±0,34	—
<b>Bronchiti (8)</b>				
<i>Pasteurella multocida</i>				
• Dipsnea	2,25±0,46	1,12±0,35	0,37±0,11	—
• Tosse	2,12±0,64	1,25±0,46	0,37±0,11	—
• Scolo Nasale	1,87±0,64	0,62±0,41	0,37±0,12	—
• Altri sintomi	1,75±0,46	1,12±0,35	0,37±0,22	—
• Temperatura	40,5±0,53	39,5±0,37	38,5±0,37	—
<b>Sindr. respiratoria</b>				
<i>M. ovipneumoniae</i> (6)				
<i>Pseudomonas spp</i> (5)				
• Dispnea	2,27±0,64	1,45±0,52	0,45±0,22	—
• Tosse	2,18±0,60	1,45±0,52	0,54±0,42	—
• Scolo Nasale	2,09±0,54	1,09±0,70	0,45±0,32	—
• Altri sintomi	2,18±0,60	1,27±0,46	0,45±0,22	—
• Temperatura	40,3±0,60	39,5±0,38	38,4±0,30	—

\*  $p < 0,01$  vs 3gg; \*\*  $p < 0,05$  vs 2gg.

Altri sintomi: asma, sfregamenti vescicolari e soffi. La sintomatologia è stata misurata prima e dopo la terapia mediante uno scoring: 0=assente; 1=leggera; 2=moderata; 3=marcata.

**CONCLUSIONI** - L'efficacia terapeutica attribuita alla tulatromicina, somministrata in unica dose per via s.c., e riconducibile alla sua buona distribuzione a livello polmonare, alla elevata tollerabilità e all'assenza di effetti collaterali (locali e sistemici), documentano la sua validità nei confronti delle infezioni respiratorie sostenute da Gram-negativi della pecora. Inoltre, l'efficacia dimostrata anche in pecore con mastiti batteriche sostenute da Gram-positivi (Naccari et al., 2012) suggerisce il potenziale impiego della tulatromicina nelle infezioni da germi Gram-positivi e Gram-negativi sensibili degli ovini.

■ **Tulathromycin in treatment of sheep respiratory infections.**

**Key words:** Tulathromycin, respiratory infections, sheep, Calabria.

## Bibliografia

- Nowakowski MA., Inskeep P., Risk J.E., Skogerboe TL., Benchaoui HA., Meiner TR., Sherington J., Sunderland SJ. (2004) *Veterinary Therapeutics*; 5 (1): 60-74.
- Clothier KA., Kinyon JM., Griffith RW. (2012), *Veterinary Microbiology*; 156: 178-182.
- Naccari F., Giofrè F., Michenzi M., Naccari C., Arcadipane GE., Bassini A., Sorio A. (2011) *Atti SISVET*, vol. LXV, 153-155.
- Naccari C., Niutta PP., Trombetta D., Pizzimenti F., Cagnardi P., Carli S., Naccari F. (2009) *Veterinary Records*; 165: 19-22.

# Management aziendale, aborti ricorrenti e Toxoplasmosi negli allevamenti ovi-caprini in Sicilia



M. VITALE, S. MIGNACCA, D. TASCA, G. GUARNERI, S. AGNELLO, V. DI MARCO LO PRESTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri - Palermo

**Parole chiave:** toxoplasma, management aziendale, allevamenti siciliani.

**INTRODUZIONE** - *Toxoplasma gondii* è un protozoo in grado di infettare tutti gli animali a sangue caldo, uomo compreso. Il suo ciclo vitale è costituito da una fase asessuata ed una sessuata. La Toxoplasmosi si trasmette ai piccoli ruminanti, come in altri animali erbivori, per ingestione di oocisti sporulate liberate nell'ambiente attraverso le feci di felini infetti che contaminano vegetali o acque. I felini, infatti, rappresentano gli ospiti definitivi del parassita nei quali esso compie la fase sessuata del suo ciclo vitale. Altre vie di trasmissione sono anche la trans-placentare e l'allattamento. I fattori di rischio presenti negli allevamenti associati ad elevate sieroprevalenze sono molteplici, come la circolazione di gatti, il contatto con roditori, la fonte di acqua di abbeverata. Le aziende ovine e caprine siciliane sono caratterizzate spesso da una conduzione aziendale a carattere rurale e familiare sia per le caratteristiche del territorio sia per le scarse risorse economiche. In questo tipo di aziende si riscontrano spesso problemi sanitari ricorrenti come aborti e mastiti con notevoli cali produttivi e perdite economiche. Lo scopo del lavoro è quello di correlare i diversi aspetti della conduzione aziendale alle problematiche sanitarie e sieroprevalenze per *T. gondii*.

**TIPOLOGIA DELLE AZIENDE** - Le aziende che allevano piccoli ruminanti nell'isola sono raggruppate in 3 tipologie:

1. Piccoli greggi stanziali a conduzione familiare, spesso con meno di 200 animali; le razze maggiormente allevate sono diverse in base alla Provincia: Pinzirita nelle aree montane e submontane delle Province di Messina e di Catania, Comisana ma soprattutto Valle del Belice nei comuni delle restanti province.
2. Greggi di medie dimensioni (200-500 animali), che costituiscono buona parte delle aziende esistenti nell'isola. Si tratta di greggi costituite quasi esclusivamente da pecore insieme ad un esiguo numero di capre (dal 10 al 40%).
3. Greggi di grosse dimensioni (500 animali ed oltre), con differenti tipologie di allevamenti in base alla zona territoriale; nelle montagne e colline gli animali, in prevalenza capre, vengono allevati quasi allo stato brado. In altre zone, invece, si hanno principalmente allevamenti di pecore per la produzione di latte, di razza Valle del Belice, Comisana e relativi incroci.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine sierologica è stata condotta con il kit Id. Vet seguendo le indicazioni riportate. L'indagine molecolare mediante nested PCR come descritto precedentemente.

**RISULTATI** - I feti e le placente analizzate risultano positive all'analisi molecolare per *T. gondii* nel 10% dei casi mostrando una scarsa relazione con i livelli di sieroprevalenza riscontrati. Le principali variabili connesse con una maggiore positività sierologica per Toxoplasma sono ascrivibili alla circolazione di gatti quasi sempre molto numerosi (numero di gatti superiore a sei), l'utilizzo di vasche aperte come abbeveratoi, l'altitudine e l'età degli animali.

In aziende simili per altri fattori si è osservato che anche la vicinanza o meno a centri abitati influenza la sieroprevalenza (Tab. 1).

Le aziende localizzate nel raggio di 5-10 km da centri urbani mostrano sieroprevalenze superiori al 50%. Alcune aziende con ripetuti episodi di aborto mostravano sieroprevalenze maggiori al 60% ma al tempo stesso negatività molecolare al *T. gondii*. Gli episodi di aborto ricorrente si evidenziano maggiormente in piccoli allevamenti (< 200 animali) in aziende con condizioni igienico-sanitarie piuttosto scarse,

**Tabella 1** - Livelli di sieroprevalenza per toxoplasma in relazione alla vicinanza di centri urbani e non correlati ad episodi ricorrenti di aborto.

Allevamento	Distanza da centro abitato	Sieroprevalenza media
Ovini	> 15 km	30%
Ovini	< 15 km	65%
Caprini	> 15 km	25%
Caprini	< 15 km	70%

nelle quali gli animali vengono allevati in unico gruppo ed in cui gli animali che hanno abortito o partorito soggetti disvitali restano in stretto contatto con gli altri, determinando una maggiore velocità nella diffusione delle infezioni.

**CONCLUSIONI** - Una conduzione aziendale appropriata è fondamentale per favorire l'incremento dei livelli di biosicurezza, a vantaggio non solo della salute animale, ma anche delle relative produzioni. In Sicilia l'allevamento rurale, tipico di tutto il mediterraneo, è molto diffuso e spesso si segnalano episodi di aborti ricorrenti. Le principali cause di aborto sono essenzialmente riconducibili ad infezioni batteriche come la brucellosi mentre la positività molecolare per *T. gondii*, viene riscontrata solo nel 10% dei casi nonostante le elevate sieroprevalenze riscontrate. La sieroprevalenza media è più bassa negli allevamenti caprini rispetto a quelli ovini e ovi-caprini. Gli allevamenti esclusivamente caprini sono gestiti, spesso, da allevatori a vocazione imprenditoriale, con una sensibilità maggiore nei confronti della corretta gestione dell'allevamento. Le aziende con management aziendali molto simili tra loro e numerosità dei capi comparabile mostrano livelli di sieroprevalenza diversi in relazione alla loro localizzazione. Un allevamento di capre, alle falde del Monte Pellegrino, a stretto contatto con un ambiente altamente urbanizzato come la città di Palermo, ha mostrato sieropositività superiori al 70% rispetto alla media generale del 40% riscontrata.

*Ringraziamenti: si ringrazia per il contributo tecnico la dr. ssa Maria La Giglia. Il Lavoro è finanziato con contributo R/C 2010 a M.V.*

■ Farm management, recurrent abortions and Toxoplasmosis in sheep and goats farms in Sicily

**Key words:** Toxoplasma, farm management, Sicilian flocks.

## Bibliografia

- Dubey, JP 2010. CRC Press; Boca Raton, FL.  
 Vitale M., Currò V., La Giglia M., Vitale F., Goździk K., Caracappa S. (2008). *Wiad. Parazytol.*, 54 (Suppl.) p. 19.  
 Vitale M. Bivona M. Cascio P., Vella A., Vicari D., Curro' V. and Di Marco V. 19th International Congress of Mediterranean Federation of Health and Production of Ruminants May 25-28, 2011, Belgrade, Serbia.

# Cellule somatiche ed isolamento di agenti mastidogeni in ovini di razza Valle del Belice



M.L. SCATASSA, V. MIRAGLIA, I. MANCUSO, M. TOLONE<sup>1</sup>, B. PORTOLANO<sup>1</sup>

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

<sup>1</sup> Dipartimento DEMETRA - Università degli Studi di Palermo

**Parole chiave:** cellule somatiche, IMI, latte ovino.

**INTRODUZIONE** - Il conteggio delle cellule somatiche nel latte ovino si è dimostrato un valido strumento per la determinazione dello stato sanitario della mammella (Gonzalo et al., 2002; Bergonier e Berthelot, 2003; Rosati et al., 2005). Oggetto del presente studio è stato valutare eventuali relazioni fra il contenuto in cellule somatiche (SCC) e le infezioni mammarie (IMI) negli ovini.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata condotta nel periodo 2006-2012 su n.14072 campioni di latte individuale prelevati in 5 allevamenti di pecore di razza Valle del Belice indenni da agalassia contagiosa. In tutte le aziende la mungitura era effettuata manualmente. Il campionamento, a cadenza mensile, è stato condotto prelevando il latte da entrambe le emimammelle durante la mungitura del mattino, dopo pulizia dei capezzoli ed eliminazione dei primi getti. Su tutti i campioni di latte che non presentavano alterazioni macroscopiche riconducibili a mastite (frustoli, coaguli, sangue ecc.) è stato eseguito il conteggio delle cellule somatiche e l'esame batteriologico. Il SCC è stato effettuato mediante citometria di flusso (Fos-somatic FC) ed in base al tenore i campioni sono stati inseriti in 4 classi:  $\leq 300.000$ ; da 301.000 a 500.000; da 501.000 a 1.000.000 e  $\geq 1.001.000$  cellule/ml (Tab. 1). Per l'isolamento colturale sono stati seminati 10  $\mu$ l di latte su piastre di AS (Agar Sangue) incubate per 24-48 h a 37 °C in aerofilia e, se necessario, in microaerofilia. La tipizzazione fenotipica è stata condotta in macro e/o micrometodo (sistema API). Sono state considerate positive le piastre in cui si evidenziava la crescita di una colonia di *S. aureus* mentre, per gli altri patogeni, sono state prese in considerazione solo le piastre con crescita di 5 o più colonie. La crescita di due differenti tipi di colonie (CNS e *Streptococcus* spp) è stata considerata una coltura mista. Rispetto all'esito dell'esame colturale sono stati distinti 10 gruppi: nessun isolamento, isolamento di stafilococchi coagulasi positivi (*S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*), stafilococchi coagulasi negativi (CNS), streptococchi patogeni (*S. agalactiae*, *S. dysgalactiae* e *S. uberis*), altri streptococchi o enterococchi (*S. acidominimus*, *S. canis*, *S. viridans*, *S. mitis*, *S. mitior* ed *E. faecalis*), *Corynebacterium*, *Mannheimia haemolytica*, *Bacillus* spp, altri germi (*Proteus* spp., *E. coli* e *Pseudomonas* spp.) ed associazione di CNS ed altri streptococchi. Per ogni gruppo è stata calcolata la media geometrica del SCC (Tab. 2).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Il 44% dei campioni analizzati (6207/14072) mostrava positività all'esame microbiologico con percentuali crescenti in funzione della classe di SCC d'appartenenza (Tab. 1). Come riscontrato da altri autori (Gonzalo et al., 2002; Contreras et al., 2007) gli stafilococchi sono i germi maggiormente isolati dal latte ovino. Si riportano i microrganismi isolati e le relative prevalenze: CNS 80%, stafilococchi coagulasi positivi 11,76% di cui 677 *S. aureus* (10,9%), 43 *S. intermedius* (0,69%) e 10 *S. hyicus* (0,16%), *Streptococcus* spp. 3,09%, streptococchi patogeni 2,64%, *M. haemolytica* 0,63%, *Corynebacterium* 0,18%, *Pseudomonas* 0,10%, *Bacillus* 0,68%, *E. coli* 0,06% e *Proteus* 0,34%. La tipizzazione fenotipica degli CNS, come già evidenziato da altri autori (Leitner et al., 2003; Marogna et al., 2010), mostra una prevalenza maggiore di *S. epidermidis* e *S. chromogenes* seguiti da *S. capitis*, *S. haemolyticus*, *S. caprae*, *S. xylosus* e *S. warneri*. La media geometrica del SCC mostra differenze statisticamente significative fra i vari gruppi di batteri (Tab. 2). Nei campioni negativi si attesta intorno a 150.000 cellule/ml; gli isolamenti di *Bacillus* spp. associati a un valore medio di

**Tabella 2** - Relazioni fra microrganismi isolati e classi SCCx1000 cells/ml e valori di media geometrica per gruppo di microrganismi.

Esito batteriologico	SCC $\leq 300$	SCC 301-500	SCC 501-1000	SCC $\geq 1001$	SCC Media G.
Nessun isolamento					146.906
Stafilococchi coagulasi positivi	175 (7.8%)	29 (6.5%)	69 (8.34%)	475 (17.5%)	1.307.230
CNS	1900 (85.5%)	373 (84%)	695 (84%)	1998 (73.5%)	544.060
Streptococchi patogeni	31 (1.4%)	19 (4.2%)	25 (3%)	89 (3.27%)	1.140.190
<i>Streptococcus</i> spp	56 (2.5%)	18 (4%)	27 (3.2%)	91 (3.34%)	1.028.560
<i>Corynebacterium</i>	2 (0.1%)		1 (0.1%)	8 (0.3)	1.756.700
<i>M. haemolytica</i>	3 (0.4%)		1 (0.1%)	35 (1.28%)	2.961.080
<i>Bacillus</i>	35 (1.58%)	1 (0.23%)	1 (0.12)	5 (0.18)	112.450
Altri germi	44 (2%)	3 (0.67%)	6 (0.72%)	20 (0.7%)	798.684
CNS + altri streptococchi	69 (0.4%)		3 (0.36%)	20 (0.7%)	754.670
Totale positivi	2220 (100%)	442 (100%)	827 (100%)	2718 (100%)	

112.000 cellule/ml sono verosimilmente riconducibili ad un inquinamento ambientale. Le cellule somatiche presenti nel latte ovino in corso d'infezione da CNS sono in media 500-750.000, mentre la presenza degli altri agenti mastidogeni è associata a valori medi di cellule somatiche maggiori a un milione/ml. L'isolamento di CNS, rispetto agli altri microrganismi, è abbastanza sovrapponibile (84-85%) nei campioni con SCC < 1.000.000/ml; diminuisce (73%) nei campioni con SCC più alto. Di contro lo *S. aureus* presenta una prevalenza decisamente più elevata (17.5%) nei campioni con SCC oltre un milione/ml, a conferma della sua maggiore patogenicità.

**CONCLUSIONI** - Nell'allevamento ovino gli CNS si confermano i principali agenti di mastite subclinica con tendenza alla cronicizzazione (Leitner et al., 2012) pertanto ulteriori approfondimenti sono necessari per indagare il loro ruolo patogenetico. L'utilizzo del SCC rappresenta un valido strumento di supporto diagnostico per la gestione delle mastiti.

## ■ Somatic cells count and bacteriological examination in Valle del Belice breed ewes

**Key words:** somatic cells count, IMI, ewe milk.

## Bibliografia

- Bergonier D. e Berthelot X. (2003), *Livestock Production Science*; 79: 1-16.  
 Contreras A., Sierra D., Sanchez A., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J., Gonzalo C. (2007), *Small Ruminant Research*; 68: 145-153.  
 Gonzalo C., Ariznabarreta A., Carriedo J.A., Primitivo F.S. (2002), *Journal of Dairy Science*; 85: 1460-1467.  
 Leitner G., Chaffer M., Caraso Y., Ezra E., Kababea D., Winkler M., Glickman A., Saran A. (2003), *Small Ruminant Research*; 49: 157-164.  
 Leitner G., Merin U., Krifucks O., Blum S., Rivas A.L., Silanikove N. (2012), *Vet. Immunology and Immunopathology*; 147: 202-210.  
 Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori G. (2010), *Small Rum. Res*; 88: 119-125.  
 Rosati R., Militello G., Boselli C., Giangolini G., Amatiste S., Brajon G., Gazzoni S., Casini M., Scatassa M.L., Bono P., Cannas A., Mugoni G., Simula M., Denti G., Gradassi S., Fagiolo A. (2005), *Scienza e Tecnica Lattiero Casearia*; 56 (3): 161-181.

**Tabella 1** - Campioni suddivisi nelle 4 classi di SCC.

Classi SCC x 1000	n. campioni	Pos. (%)	Neg. (%)
$\leq 300$	8283	2220 (27)	6063 (73)
301 - 500	837	442 (53)	395 (47)
501 - 1000	1191	827 (69)	364 (31)
$\geq 1001$	3761	2718 (72)	3761 (28)
TOTALE	14072	6207 (44,1)	7865 (55,9)

# Utilizzo di un concentrato tanninico per il contenimento dei coccidi nel capretto



M.T. MANFREDI<sup>1</sup>, C. FRAQUELLI<sup>1</sup>, P. PICCOLINO BONIFORTI<sup>2</sup>, R. RIZZI<sup>1</sup>, S. ZANZANI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze veterinarie e Sanità Pubblica; Università degli Studi di Milano

<sup>2</sup> Azienda Agraria "Guidobono Cavalchini", Cantalupo Ligure (AL), Università degli Studi di Milano

**Parole chiave:** protozoi, *Eimeria*, capretto, tannini condensati.

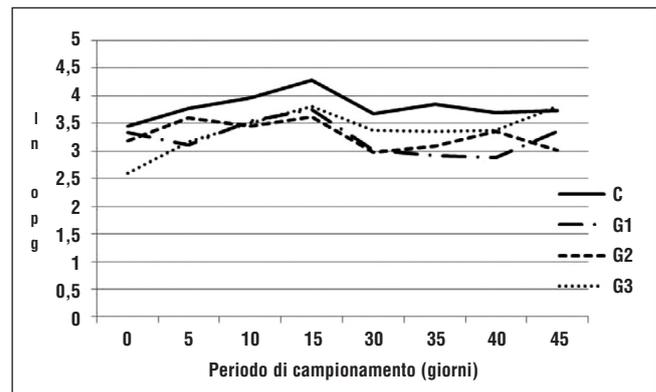
**INTRODUZIONE** - La coccidiosi rappresenta attualmente una tra le più diffuse malattie enteriche dell'allevamento caprino in tutto il mondo ed ha carattere ubiquitario. Le infezioni da *Eimeria*, numerose sono le specie che infettano i caprini, causano gravi forme cliniche nei capretti e non è difficile riscontrare anche episodi di mortalità. Generalmente, il controllo della coccidiosi viene effettuato mediante l'applicazione di chemioterapici; tuttavia il rapido sviluppo in tutto il mondo di forme di farmaco resistenza associato ad eventuali remore da parte dei consumatori nei confronti del consumo di carni provenienti da animali trattati con farmaci hanno spinto a ricercare metodi alternativi per controllare questa parassitosi. Negli ultimi anni, numerosi studi hanno dimostrato l'attività dei tannini condensati (TC) nei confronti delle infestazioni da nematodi tricostrongilidi sia nelle capre (Min et al. 2005, Osoro et al. 2009) sia nelle pecore (Athanasiadou et al. 2000). Per altro, Hur et al. (2005) e Marckoviz et al. (2012) hanno provato che l'assunzione di alcune essenze vegetali era in grado di ridurre in maniera significativa il numero di oocisti in capre e capretti con infezioni naturali di *Eimeria* spp.

Gli scopi del presente studio sono stati quelli di verificare gli effetti di tannini condensati derivanti dal quebracho, regolarmente disponibile in commercio, sia sull'infezione causata da coccidi e sia sulle performances di crescita di capretti.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati inseriti nello studio 39 capretti, maschi, di nove settimane di età e di razza Camosciata delle Alpi; tutti con infezione naturale da *Eimeria*. La prova è stata svolta presso l'azienda agraria Guidobono Cavalchini dell'Università degli Studi di Milano (Cantalupo Ligure, AL) e i capretti sono stati distribuiti in un gruppo controllo (C) e gruppi trattati con tannini (GT) in base al peso e numero di opg. I capretti appartenenti ai GT hanno ricevuto la polvere con l'estratto di Quebracho mescolata al cibo. Nello specifico è stato utilizzato un estratto solubile di Quebracho disponibile in commercio (SILVAFEED BY PROQ) contenente il 70% di tannini condensati. L'alimento somministrato ai capretti conteneva il 5% di tannini condensati per kg di sostanza secca. Lo studio è durato complessivamente 45 giorni: i capretti del G1 hanno ricevuto l'alimento trattato 2 volte al giorno per una settimana (Giorno 0-Giorno 6 e Giorno 30-36), i capretti del G2 una volta al giorno ogni 5 giorni (6 trattamenti) e quelli del G3 per 3 giorni ogni 15 giorni (3 trattamenti della durata di 3 giorni). Campioni fecali individuali sono stati prelevati al T0, T4, T9, T15, T30, T35, T40 e T45. Quindi sono state conteggiate le oocisti rilevate nel materiale fecale mediante la FLOTAC double technique (soluzione di flottazione MgSO<sub>4</sub>, s.g.: 1.280)(Cringoli, 2006).

I dati sono stati sottoposti all'analisi della varianza utilizzando un modello misto per misure ripetute per valutare l'effetto di alcuni fattori sull'opg (tempo, tipo di trattamento, peso corporeo come effetti fissi e capra come effetto random). I valori di opg sono stati trasformati in logaritmo per rispettare gli assunti di normalità della distribuzione.

Per valutare le misure ripetute è stata applicata una struttura della covarianza di tipo autoregressivo. Il peso degli animali è stato raggruppato in 3 classi: meno di 18 kg, da 18 a 21 kg e più di 21 kg. L'interazione gruppo per tempo non è stata considerata perché non significativa. Per questa analisi è stata utilizzata la procedura MIXED del programma SAS (2008).



**Figura 1** - Andamento dell'escrezione di oocisti nei capretti controllo e trattati.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Al T0 sono stati rilevati i seguenti valori medi di opg: 14320 ( $\pm 26115$ ), 9796 ( $\pm 17124$ ), 16764 ( $\pm 46524$ ) e 1352 ( $\pm 2099$ ) rispettivamente per il gruppo C e i gruppi trattati col tannino, G1, G2 e G3. Differenti valori di opg sono stati riscontrati a 10 e 15 giorni tra il gruppo C e i gruppi GT. A partire dal 30° giorno le differenze sono risultate più basse e al 45° giorno non sono state riscontrate più differenze ( $p > 0.05$ ). I capretti del gruppo controllo hanno mostrato valori di opg più elevati rispetto a quelli riscontrati nei gruppi trattati ( $p < 0.05$ ). Nessuna differenza è stata riscontrata tra i valori di opg dei gruppi trattati. I valori di opg si sono ridotti a partire dal 15° giorno con l'aumentare del peso dei capretti; nei capretti appartenenti al G3 la riduzione si apprezza solo dal 35° giorno. L'incremento di peso giornaliero (DWG) è risultato significativamente diverso tra i capretti del gruppo controllo e quelli trattati al T0, T15, T30 e T45 (Mann Whitney test,  $p < 0.05$ ). Il DWG dei capretti del G1 è risultato più elevato dei controlli al T30 e T45; quello dei capretti G2 era diverso dai controlli al T15, T30 e T45. Nessuna differenza è stata riscontrata per i G3. La soluzione di somministrare i TC ogni 5 giorni (G2) ha dimostrato le migliori performances in termini di riduzione di oocisti (77% al T10 e T15) e incremento di peso giornaliero.

## ■ Effects of condensed tannin on coccidian infection in goat kids

**Key words:** protozoa, *Eimeria*, kid, condensed tannins.

## Bibliografia

- Athanasiadou et al. (2000). *Int J Parasitol*, 30: 1025-1033.  
 Cringoli G. (2006). *Parassitologia*, 48, 381-384.  
 Hur S.N., Molan A.L., Cha J.O (2005). *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 18 (9): 1262-1266.  
 Markovics A., Cohen J., Muklada H., Glasser T.A., Dvash L., Ungar E.D., Azaizeh H., Landau S.Y. (2012). *Vet Parasitol* 186:165-169.  
 Min et al. (2005). *Vet Parasitol* 130: 105-113.  
 Osoro et al. (2009). *Rangeland Ecol Manage* 62: 127-135.

# Relazione tra cellule somatiche e caratteri produttivi negli ovini da latte di razza Sarda



S. SECHI, S. SALARIS, S. CASU, A. CARTA

Settore Genetica e Biotecnologie, DIRPA-AGRI Sardegna, 07100 - Sassari, Italia

**Parole chiave:** parametri genetici, test-day records, mastiti.

**INTRODUZIONE** - Negli ovini da latte le cellule somatiche (CCS) vengono utilizzate quali indicatori di benessere animale, igiene e prevalenza di mastiti subcliniche. Si sta inoltre diffondendo la loro inclusione quale parametro per il pagamento a qualità del latte. Recentemente in Sardegna è stata avviata una specifica misura del PSR per il benessere animale nella quale si identifica il CCS come parametro di riferimento. Inoltre, si discute da tempo della possibilità di inserire il CCS quale criterio di selezione contro le mastiti sub-cliniche. In questa situazione è indispensabile valutare la relazione tra CCS e caratteri produttivi. Obiettivi di questo lavoro sono l'analisi della relazione fenotipica e la stima delle correlazioni genetiche tra CCS e caratteri produttivi.

**MATERIALI E METODI** - Dal 2000 al 2011 sono stati registrati 116.777 test day (TD) di 13.998 lattazioni di 5.788 pecore allevate in due aziende. Nel primo allevamento (FH) sono stati effettuati controlli mensili alle due mungiture e le pecore riformate principalmente per difetti della morfologia mammaria. Nel secondo allevamento (FL) sono stati effettuati controlli quindicinali alle due mungiture e le pecore macellate dopo la 4ª lattazione. I tenori giornalieri in grasso (TG), proteina (TP) e CCS sono stati calcolati ponderando per le produzioni delle rispettive mungiture. Il Somatic Cell Score (SCS) è stato calcolato seguendo Ali e Shook (1980). Le lattazioni e i rispettivi TD sono stati inclusi nella classe di stato sanitario (HSC) 1 quando nel corso della lattazione sono stati registrati almeno 2 CCS oltre il valore di 600K ( $K = \times 10^3$  cells/ml) o 1 CCS oltre 1.500K. Le altre lattazioni e TD sono stati considerati prodotti da pecore con mammella "sana" e inclusi in HSC 0. Per ogni tenore è stato calcolato il valore atteso ad ogni TD successivo al primo, come rapporto tra le rispettive quantità al primo TD e la quantità di latte (MY) al TD considerato. L'andamento dei valori attesi è dovuto solo all'effetto di diluizione determinato dal variare delle produzioni di latte. Lo scarto dai valori attesi dei tenori misurati di grasso (DTG), proteina (DTP) e cellule somatiche (DCS) misura dunque le variazioni al netto dell'effetto diluizione. Lo scarto della produzione di latte (DMY) è stato calcolato come differenza tra MY ai TD successivi al primo e MY al primo TD. Le correlazioni tra DCS e le deviazioni relative ai caratteri produttivi sono state calcolate escludendo le lattazioni con CCS nel primo TD superiore ai 600K per evitare distorsioni dovute all'inclusione di pecore con mammella probabilmente "infetta" all'inizio della lattazione. I parametri genetici delle variabili per lattazione (LSCS, LMY, LTG e LTP) sono stati stimati con un modello bi-trait animal model con misure ripetute per ciascun allevamento con gli effetti fissi - Anno Età Stagione di parto - e - Anno Ordine di lattazione Mese del parto - e - Durata di mungitura.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - FH ha mostrato una leggera inferiorità produttiva e valori circa doppi di CCS e LCCS (1.164K e 1.200K rispetto a 616K e 577K in FL). Il 47,4% delle lattazioni è stato incluso in HSC 0 in FH contro il 59,3% in FL. La maggiore percentuale di animali probabilmente "infetti" in FH non sembra sufficiente a spiegare la differenza in CCS e LCCS e suggerisce il coinvolgimento di altri fattori legati al management. Una debole correlazione tra LSCS e LMY è stata ottenuta sia in FH (-0,06) che in FL (-0,02), con valori positivi in HSC 0 (0,08 in FH e 0,10 in FL) e negativi in HSC 1 (-0,18 in FH e -0,20 in FL). In generale, a livello di lattazione una moderata correlazione negativa tra LSCS e LMY risulta solo in pecore "infette". La correlazione tra LSCS e LTG è vicina allo zero sia entro allevamento (0,04 in FH e 0,05 in FL) che per HSC (compresa tra -0,04 e 0,04). Una moderata correlazione è risultata tra LSCS e LTP entro allevamento (0,34 in FH e 0,28 in FL) con valori leggermente inferiori per HSC 0 e 1 (compresa tra 0,12 e 0,22). A livello di TD la correlazione è stata moderata e negativa tra SCS e MY

sia in FH (-0,20) che in FL (-0,18) e più forte in HSC 1 (-0,22 in FH e -0,23 in FL) che in HSC 0 (-0,15 in FH e FL). La correlazione tra SCS e TG è stata sempre positiva sia entro allevamento (0,16 in FH e 0,13 in FL) che per HSC (compresa tra 0,14 e 0,20). La correlazione tra SCS e TP è risultata moderata e positiva in FH (0,38) e in FL (0,29). I valori ottenuti per HSC erano compresi tra 0,24 e 0,36. La relazione a livello TD di SCS con MY e TG è risultata più forte che a livello di lattazione. Questa differenza è probabilmente da attribuire all'impatto dell'effetto diluizione. Viceversa la relazione tra SCS e TP è rimasta simile.

Al primo TD la percentuale di CCS sotto 600K è stata 75% in FH e 87% in FL. Per questi TD la correlazione tra SCS è risultata trascurabile con MY (0,07 in FH e -0,01 in FL) e TG (0,04 in FH e 0,05 in FL) e debole con TP (0,14 in FH e 0,15 in FL). La correlazione tra DCS e DMY è risultata sempre debole ma positiva entro gregge (0,01 in FH e 0,14 in FL) con valori più elevati nelle pecore "sane" (0,15 e 0,27 in HSC 0 in FH e FL rispettivamente). La correlazione tra DCS e DTG è risultata 0,10 in FH e 0,04 in FL. Tuttavia valori moderatamente positivi sono stati rilevati solo per le pecore "infette" (0,18 e 0,16 in HSC 1 in FH e FL). La correlazione tra DCS e DTP è risultata moderatamente positiva sia entro allevamento (0,22 in FH e 0,19 in FL) che per HSC (valori compresi tra 0,07 e 0,22). L'insieme di questi risultati mostra che la relazione negativa tra SCS e MY è dovuta all'effetto diluizione. Infatti, non solo le correlazioni tra le variazioni di cellule e latte sono trascurabili e se esistono sono comunque positive ma quelle tra cellule e tenori in grasso e proteina sono sempre positive potendosi paradossalmente affermare che un aumento del contenuto in cellule non produce alcun effetto depressivo sulle produzioni quantitative ma addirittura determina un incremento della qualità casearia. I valori stimati di ereditabilità sono risultati comparabili a quelli della letteratura nella stessa razza e in altre razze ovine (Casu et al., 2010) ma superiori in FL rispetto a FH a causa della maggiore accuratezza delle misure e alla maggiore coerenza dei dati. La correlazione genetica tra LSCS e LMY è risultata bassa e discordante nei due allevamenti (0,18 in FH e -0,06 in FL). La correlazione genetica tra LSCS e LTG è risultata praticamente nulla (0,05 in FH e -0,003 in FL) mentre più consistente e positiva è risultata quella tra LSCS e LTP (0,35 in FH e 0,19 in FL). Questi risultati confermano l'ipotesi che i valori di correlazione genetica tra LSCS con LMY e LTG siano trascurabili. Sembra invece rilevante la correlazione genetica sfavorevole con LTP in accordo con quanto trovato nella razza Valle del Belice (Riggio et al., 2007) ma decisamente superiore a quanto trovato nella razza Lacaune (Barillet et al., 2007). Inoltre, l'inversione di segno delle correlazioni nei due allevamenti per LSCS suggerisce che la variabilità genetica vari tra allevamenti a seconda dei livelli di CCS e delle tecniche di management come suggerito anche da Riggio et al. (2010).

## ■ Relationship between somatic cell and production traits in Sarda sheep breed

**Key words:** genetic parameters, test-day records, mastitis.

## Bibliografia

- Ali, A. K. A., and G. E. Shook. 1980. *J. Dairy Sci.* 63:487-490.  
 Barillet, F. 2007. *Small Rumin. Res.* 70: 60-75.  
 Casu, S., S. Sechi, S. Salaris, and A. Carta. 2010. *Small Rumin. Res.* 88: 77-83.  
 Riggio, V., Finocchiaro, vanKaam, Portolano, Bovenhuis. 2007. *J. Dairy Sci.* 90:1998-2003.  
 Riggio, V., B. Portolano, H. Bovenhuis, and S. Bishop. 2010. *Gen. Sel. Evol.* 42:30-39.

# Sviluppo di un programma di monitoraggio per febbre Q in allevamenti ovi-caprini



M.L. MANDOLA<sup>1</sup>, D. AMERI<sup>1</sup>, F. RIZZO<sup>1</sup>, M. BIANCHI<sup>2</sup>, L. DECASTELLI<sup>2</sup>, L. CHIAVACCI<sup>3</sup>, N. VITALE<sup>3</sup>, C. LUZZAGO<sup>4</sup>

<sup>1</sup> I.Z.S. P.L.V., S.C. Virologia, S.S. Lab. Spec. Diagnostica molecolare virologica e ovocoltura

<sup>2</sup> I.Z.S. P.L.V., S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, S.S. Lab. Controllo Alimenti

<sup>3</sup> I.Z.S. P.L.V., S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico, S.S. Osservatorio Epidemiologico

<sup>4</sup> Università degli Studi di Milano, Dip. di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica

**Parole chiave:** febbre Q, *Coxiella burnetii*, sieroprevalenza, ovi-caprini.

**INTRODUZIONE** - La febbre Q è una zoonosi causata da *Coxiella burnetii*, batterio che è in grado di infettare numerose specie animali (mammiferi, uccelli, artropodi). La fonte d'infezione nell'uomo è spesso sconosciuta, sebbene gli ovi-caprini siano più di frequente associati a focolai umani di febbre Q rispetto ad altre specie animali. L'infezione, di solito asintomatica, nei ruminanti può provocare ripercussioni a livello riproduttivo. Le infezioni nell'uomo dipendono per lo più dall'inalazione di polvere e aerosol contaminati da batteri presenti a livello di involgii fetali, secreti vaginali o nelle feci di animali infetti<sup>1</sup>. Nell'uomo circa il 40% delle infezioni evolve in forma simil-influenzale, in epatite o polmonite; il 2-5% dei casi cronicizza con forme di endocardite<sup>2</sup>. Nei piccoli ruminanti, le indagini diagnostiche vengono condotte in caso di evidente rischio per l'uomo ovvero in presenza di problemi riproduttivi in un'elevata percentuale di animali tali da comportare gravi perdite economiche. La frammentaria e difficoltosa acquisizione di dati nei greggi ovi-caprini, nonostante il loro riconosciuto coinvolgimento nella trasmissione all'uomo, ha reso necessaria la predisposizione di un programma di monitoraggio per la valutazione della sieroprevalenza per *C. burnetii* negli allevamenti ovi-caprini del territorio piemontese e la messa a punto di protocolli condivisi di approfondimento diagnostico. A tal fine, è stata prevista una seconda fase di studio volta alla ricerca diretta dell'agente eziologico con l'intento di chiarire, la dinamica di comparsa/mantenimento del patogeno in allevamento per mezzo di indagini biomolecolari su pools di matrici animali e tramite l'analisi su base statistica dei potenziali fattori di rischio. Attraverso, inoltre, l'MLVA (*Multi-Locus Variable number of tandem repeats Analysis*), si intendono caratterizzare in via genetica i ceppi circolanti.

**MATERIALI E METODI** - Per stimare la sieroprevalenza di *C. burnetii* negli allevamenti ovi-caprini della regione Piemonte, è stato predisposto uno studio su un campione casuale di allevamenti. Il disegno di campionamento è a doppio stadio: a livello regionale e a livello di allevamento. A livello regionale la numerosità campionaria è stata fissata ipotizzando una prevalenza attesa del 35%<sup>3</sup>, un errore del 4,5% e un livello di confidenza del 95%. Sono stati estratti 411 allevamenti con campionamento casuale semplice stratificato per area geografica dalla lista di allevamenti ovi-caprini registrati presso la banca dati regionale. Ai fini dello studio il Piemonte è stato diviso in 4 aree geografiche: provincia di TO (107 allevamenti), provincia di CN (101 allevamenti), VC-VCO-BI-NO (107 allevamenti), AL e AT (96 allevamenti). Il campionamento è stato eseguito utilizzando la procedura *proc surveysselect* del software SAS v9.2. A livello di allevamento la numerosità campionaria è stata fissata in modo da definire una prevalenza intra-allevamento del 10%<sup>3</sup>, con un livello di confidenza del 95%, testando tutti i capi presenti fino a 30. Per allevamenti di dimensioni medio-grandi, è stato selezionato un campione di 30 capi. Una scheda anamnestica, con compilazione affidata ai medici veterinari ASL in fase di prelievo, è stata predisposta ai fini della raccolta armonizzata di dati epidemiologici fondamentali di tipo gestionale e sanitario. Un data-base è stato allestito per la raccolta delle informazioni e i successivi confronti di prevalenza-incidenza a breve e lungo periodo, e per l'elaborazione finale dei dati su base statistica. Per lo screening dei sieri è stato scelto il kit ELISA indiretta LSIvet Ruminant Q Fever-Serum/Milk (LSI, Lissieu France), che utilizza un antigene adsorbito in fase I e II (ceppo ovino Cb01) e classifica i positivi in 4 classi. Vengono, inoltre, fornite dal produttore le performance del

sistema, tra le quali la sensibilità, che appare più elevata rispetto a quella dei kit allestiti con antigene isolato da zecca (ceppo Nine Mile): l'uso di sistemi ELISA con antigene isolato da ruminanti viene infatti raccomandato a livello internazionale<sup>4</sup>.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I campionamenti sierologici, iniziati a gennaio 2012, hanno coinvolto ad oggi 258 allevamenti (3818 sieri totali). Dai risultati preliminari emerge un'alta percentuale di allevamenti sieropositivi: in 96 (37%) il test ELISA ha evidenziato la presenza di anticorpi anti-*C. burnetii* in almeno 1 dei capi analizzati. Il numero totale di capi sieropositivi è di 404 su 3818 capi analizzati (11%), dei quali 224 capre su 2135 totali analizzate (10%) e 180 pecore su 1683 totali analizzate (11%). Con il completamento del piano di campionamento, previsto in autunno, verranno condotte elaborazioni statistiche descrittive sui dati di laboratorio e su quelli epidemiologici. L'analisi dei fattori di rischio per *Coxiella* negli allevamenti ovi-caprini sarà eseguita attraverso un modello lineare generalizzato. In tal modo verrà valutata la situazione epidemiologica ovi-caprina su base regionale, evidenziando priorità di controllo a livello di tipologia gestionale e/o localizzazione geografica, da monitorare nella fase mirata alla ricerca diretta di *C. burnetii*.

**CONCLUSIONI** - In base a quanto evidenziato dall'EFSA<sup>5</sup>, a livello nazionale e internazionale il livello e la qualità delle informazioni disponibili sulla febbre Q risentono fortemente della carenza di standardizzazione di tecniche di laboratorio e protocolli diagnostici, con conseguente difficoltà di stima accurata della prevalenza di infezione, come anche segnalato in una recente *review* critica<sup>3</sup>; tale studio permetterà, attraverso l'ottimizzazione dei metodi di laboratorio, della metodologia di campionamento e della raccolta armonizzata dei dati di allevamento, la definizione della situazione epidemiologica ovi-caprina su base regionale. Lo schema armonizzato di monitoraggio adottato nello studio sarà utile per il confronto di dati su base nazionale e internazionale, come raccomandato dall'EFSA in un recente *scientific report*<sup>4</sup>.

*Ricerca condotta nell'ambito di un progetto finanziato dal Ministero della Salute (IZS PLV 11/10 RC).*

*Si ringrazia il Servizio Veterinario Regione Piemonte per il coordinamento del programma su base regionale.*

*Si ringraziano i medici veterinari AASSLL piemontesi per la collaborazione prestata.*

## ■ Monitoring program for Q-fever in small ruminant flocks

**Key words:** Q-fever, *Coxiella burnetii*, sieroprevalence, small ruminant.

## Bibliografia

1. <http://www.efsa.europa.eu/it/topics/topic/qfever.htm>.
2. Maurin M, Raoult D. (1999), Clin Microbiol Rev; 12(4):518-553.
3. Guatteo R, Seegers H, Taurel AF, Joly A, Beaudeau F.(2011), Vet Microbiol; 149(1-2):1-16.
4. Sidi-Boumedine K, Rousset E, Henning K, Ziller M, Niemczuck K, Roest HJ, Thierry R. Question No EFSA-Q-2009-00511. Accepted for publication on 5 May 2010.
5. EFSA Panel on Animal Health and Welfare (AHAW)(2010), EFSA Journal; 8(5):1595.

# Lentivirus dei piccoli ruminanti: una difficile palestra per la diagnostica di laboratorio



L. BERTOLOTTI<sup>1</sup>, M. GIAMMARIOLI<sup>2</sup>, F. FELIZIANI<sup>2</sup>, S. ROSATI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia

**Parole chiave:** lentivirus, genotipi, eterogeneità antigenica, sierotipizzazione.

**INTRODUZIONE** - In Italia esistono almeno 3 genotipi di lentivirus dei piccoli ruminanti: il genotipo A (Maedi Visna Virus MVV-like), il genotipo B (Caprine Arthritis Encephalitis Virus CAEV-like) ed il genotipo E, di recente classificazione e caratterizzato per la prima volta in capre di razza sarda. È noto da tempo che i genotipi A e B sono in grado di superare la barriera di specie. I 3 genotipi presentano inoltre caratteristiche antigeniche differenti tali che l'utilizzo di un antigene eterologo non si presta in modo ottimale alla diagnosi sierologica a fini eradicativi. A tale scopo sono stati proposti nuovi metodi diagnostici combinando le frazioni immunodominanti di differenti genotipi al fine di allargare lo spettro di reattività. Inoltre, la caratterizzazione di epitopi immunodominanti genotipo specifici ha consentito lo sviluppo di un test di sierotipizzazione da impiegare in via preliminare sulla popolazione, rendendo più agevole il successivo uso di un test ad antigene omologo. Nella presente nota vengono illustrati alcuni risultati ottenuti in indagini di campo, utilizzando un test di screening con triplo antigene (A, B ed E) ed un test di genotipizzazione sierologica per l'identificazione del genotipo circolante.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati utilizzati campioni di siero, plasma e latte massale, raccolti da allevamenti ovin, caprini e misti in differenti realtà zootecniche a livello nazionale ed internazionale (vedi tabella). In alcuni casi, lo stato sanitario verso le infezioni da SRLV era stato accertato preliminarmente attraverso analisi genetiche, sequenziando un tratto di 800bp del gene *gag* da campioni di buffy coat o di latte di massa. I campioni per le analisi sierologiche sono stati sottoposti a test di screening, utilizzando piastre ELISA sensibilizzate con antigeni ricombinanti in pool corrispondenti ai 3 genotipi identificati in Italia (A, B ed E). In un secondo step, una selezione di campioni positivi (5-10 sieri per allevamento o un'aliquota di latte massale) sono stati sottoposti al test di genotipizzazione, in cui ogni campione viene saggiato in triplice fase verso le varianti genotipo specifiche dell'epitopo immunodominante dell'antigene capsidico. L'interpretazione del test si basa sulla maggiore reattività del campione verso l'antigene omologo, di norma superiore del 100% rispetto agli antigeni eterologhi. Sono tuttavia possibili situazioni indeterminate, in cui spesso è possibile accertare la co-infezione di due differenti genotipi.

**RISULTATI** - Dagli esiti degli esami sierologici, si evince come alcuni genotipi siano associati a razze ovine o caprine, indipendentemente dalla specie ospite considerata. Nella tabella riassuntiva sono infatti evidenziate le associazioni fra i genotipi prevalenti e le razze prese in esame, dalla quale si evince che i genotipi A e B sono egualmente distribuiti nelle due specie considerate. La presenza del sottotipo B1, evidenziato in alcuni casi, conferma l'alto indice di "inquinamento" derivante dall'importazione di capre francesi infette con il virus CAEV classico, più aggressivo, e trasmissibile efficacemente per via orizzontale. In contesti in cui sia stata possibile una certa segregazione della popolazione, è ancora possibile identificare i genotipi autoctoni. Sono un esempio le pecore e le capre di razza sarda, serbatoio principale di B3 ed E2 o la capra valdostana, serbatoio di un genotipo A non ancora classificato geneticamente. I risultati ottenuti sui campioni Turchi si limitano alla sierologia, ed hanno chiaramente evidenziato la circolazione dei tre genotipi. I primers ad oggi disponibili non consentono di amplificare sequenze virali da questi campioni se non per il genotipo A. I risultati preliminari suggeriscono che si tratti di ceppi virali divergenti da quelli conosciuti, evoluti in modo diverso seppur mantenendo una certa reattività sierologica verso antigeni del genotipo E.

**DISCUSSIONE** - Questa indagine evidenzia come la popolazione ovina e caprina italiana sia una difficile palestra per la diagnosi delle lentivirus. La presenza di almeno 3 genotipi circolanti e differenti sottotipi, con-

Regione Stato	Razza	Specie	Sierotipo	Genotipo
Sardegna	Sarda	Ovina	B	B3
Sardegna	Sarda	Caprina	E	E2
Sicilia	Varie	Caprina	B	B1
Bolzano	Camosciata	Caprina	B/A	B1/ A4
Lombardia	Camosciata	Caprina	B	B1
Umbria	Varie	Caprina	B/A	B1/B3/A11
Piemonte	Roccamare	Caprina	A-E	A8-A9-E1
Piemonte	Langhe	Ovina	A	A8
V. D'Aosta	Valdostana	Caprina	A	A?
Francia	Corse	Caprina	B	B1
Francia	Rove	Caprina	B	B1-B2
Francia	Pyrénéenne	Caprina	B	B1
Spagna	Florida	Caprina	A-B	A2-A3-B1
Spagna	Malagueña	Caprina	A	A2-A3
Turchia	Antalya	Caprina	A-B	Nd
Turchia	Afyon	Caprina	A-E	Nd
Turchia	Hatay	Caprina	E	Nd

ferma come l'Italia abbia rappresentato in passato il crocevia di molte civiltà, nella domesticazione dei piccoli ruminanti, fino ai giorni nostri. L'approccio diagnostico quindi non può prescindere dall'analisi preliminare dei virus presenti nelle varie popolazioni, prima di avviare piani di controllo e risanamento. La strategia proposta ha il vantaggio di essere rapida, economica e di facile interpretazione, applicabile anche su campioni in pool come il latte di massa. L'identificazione del genotipo circolante ha indubbi vantaggi in merito alla sensibilità del test diagnostico che verrà successivamente adoperato con finalità eradicative. È noto infatti che l'utilizzo di un test con antigene omologo è in grado di svelare più precocemente gli animali infetti rispetto ad un antigene eterologo. Non va infine sottovalutata la necessità da parte degli enti deputati alla ricerca, di una costante verifica delle caratteristiche genetiche dei ceppi di campo, attraverso isolamenti e caratterizzazione genetiche ed antigeniche di stipiti virali, per fornire alla diagnostica sierologica gli strumenti adeguati per un efficace controllo delle lentivirus dei piccoli ruminanti.

## Small ruminant Lentivirus: a hard challenge for laboratory diagnostics

**Key words:** lentivirus, genotypes, antigenic heterogeneity, serotyping.

## Bibliografia

- Grego E., Profiti M., Giammarioli M., Giannino L., Rutili D., Woodall C., Rosati S. (2002). Clinical And Diagnostic Laboratory Immunology. Vol. 9, Pp. 828-832.
- Lacerenza D, Giammarioli M, Grego E, Marini C, Profiti M, Rutili D, Rosati S. (2006). Veterinary Immunology And Immunopathology, Vol. 112; P. 264-271.
- Grego E, Bertolotti L, Quasso A, Profiti M, Lacerenza D, Muz D, Rosati S. (2007). Journal Of General Virology, Vol. 88; P. 3423-3427.
- Reina R., Bertolotti L., Dei Giudici S., Puggioni G., Ponti N., Profiti M., Patta C., Rosati S. (2010). Veterinary Microbiology, Vol. 144; P. 24-31.
- Giammarioli M, Bazzocchi M, Puggioni G, Brajon G, Dei Giudici S, Taccori F, Feliziani F, De Mia Gm. (2011) Virus Genes 43:380-4.

# Caratterizzazione delle glicoproteine E e I di Caprine herpesvirus 1 (CpHV1)



L. BERTOLOTTI<sup>1</sup>, A. ROSAMILIA<sup>2</sup>, M. PROFITI<sup>1</sup>, E. BROCCHI<sup>3</sup>, L. MASOERO<sup>2</sup>, V. FRANCESCHI<sup>4</sup>, M. TEMPESTA<sup>5</sup>, G. DONOFRIO<sup>4</sup>, S. ROSATI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Epidemiologia ed Ecologia, Università di Torino

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, sezione di Torino

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia, sezione di Brescia

<sup>4</sup> Dipartimento di Salute Animale, Università di Parma

<sup>5</sup> Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Università di Bari

**Parole chiave:** Caprine Herpes Virus 1, Glicoproteina E, Elisa.

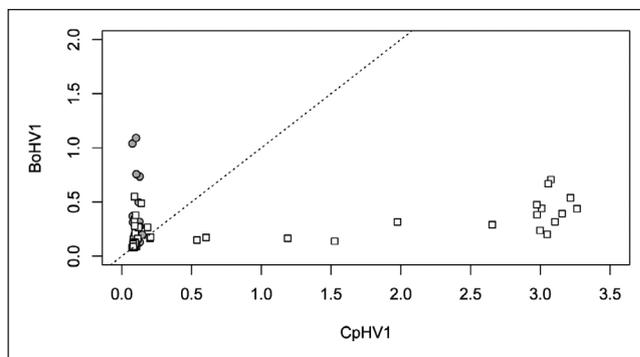
**INTRODUZIONE** - Caprine herpesvirus 1 (CpHV1) è un membro della sottofamiglia alphaherpesvirinae correlato al prototipo Bovine Herpesvirus 1 (BoHV1). Causa una patologia sistemica nei soggetti giovani, caratterizzata da elevata morbilità e mortalità, mentre, nei soggetti adulti, l'infezione porta a vulvovaginiti e balanopostite (Engels, M., Thiry, E., 2000). Sebbene la cross reattività fra i due virus coinvolga le principali glicoproteine strutturali, l'uso di ELISA competitiva per la ricerca di anticorpi diretti verso le glicoproteine B e E di BoHV1 è stata proposta per la diagnosi dell'infezione da CpHV1, risultando prevalentemente un pattern di reattività gB+/gE- e lasciando supporre che la gE di CpHV1 possa rappresentare un utile target per lo sviluppo di un test specifico per CpHV1.

**MATERIALI E METODI** - Sono stati utilizzati due ceppi virali di campo: il BoHV1 Caselette, isolato in Piemonte, e il CpHV1 BA.1, isolato in Puglia (Buonavoglia et al., 1996). Entrambi i virus sono stati coltivati su linee cellulari Madin-Darby bovine kidney (MDBK), da cui è stato estratto il DNA virale. Poiché il gene codificante per CpHV1 gE è stato solo parzialmente caratterizzato, in questo studio il frammento della sequenza Us di CpHV1 comprendente la regione 3' terminale della glicoproteina I e 5' terminale della glicoproteina E è stato amplificato e sequenziato. I frammenti corrispondenti al dominio esterno di entrambe le glicoproteine sono stati subclonati nel vettore pSECTag2/Hygro ed espressi in forma secreta in cellule HEK293T (Donofrio G. et al, 2006). Le proteine così espresse sono state utilizzate per lo sviluppo di un test ELISA indiretto. Un pannello di anticorpi monoclonali reattivi verso BoHV1 gE e gI è stato utilizzato per valutare la possibile cross-reattività delle glicoproteine di CpHV1, mediante tecniche di immunocitochimica. Un pannello di 55 sieri bovini e di 163 sieri caprini è stato testato in ELISA. Il primo gruppo comprendeva 23 sieri di bovini infetti da BoHV1, 16 sieri di bovini vaccinati e 16 sieri di bovini negativi sia in ELISA competitivo sia in sieroneutralizzazione (SN). Di contro i campioni caprini includevano 82 sieri positivi in SN verso il virus omologo, con titoli variabili tra 1:2 e 1:128, 47 sieri negativi in SN e, infine, 34 sieri provenienti da un allevamento considerato indenne (Deregt et al., 2005; Tempesta et al., 2000). Le performances del test ELISA sono state valutate in termini di sensibilità e specificità e la concordanza tra ELISA e SN è stato calcolato stimando i valori di Kappa di Cohen.

**RISULTATI** - L'amplificazione e il sequenziamento dei geni codificanti per gE e gI di CpHV1 hanno rivelato una similarità aminoacidica inferiore del 78%. La reattività degli anticorpi monoclonali ha evidenziato l'assenza di cross-reattività con le glicoproteine di CpHV1. I risultati ottenuti dall'utilizzo del test ELISA indicano chiaramente che la porzione superficiale della gE di CpHV1 rappresenta un marker di infezione sensibile e specifico, in paragone con la SN ed una limitata, se non assente, cross-reattività con BoHV1, mentre l'uso della gI o la combinazione gE/gI di CpHV1 non migliora in modo significativo la sensibilità del test (Fig. 1). Le performances del test CpHV1 ELISA mostrano una sensibilità del 97.6% (91.5% - 99.7%) e in una specificità del 98.8% (93.3% - 99.9%); la concordanza tra l'ELISA e SN è pari a 0.96 (0.92 - 1.00), mentre la correlazione tra il titolo SN e l'assorbanza in ELISA è pari a 0.88 ( $p < 0.001$ ).

**DISCUSSIONE** - La diagnostica degli herpesvirus nei ruminanti può risultare particolarmente complessa, soprattutto in seguito all'uso massivo della vaccinazione nei bovini, che ha portato ad un quadro interpretativo più complesso (Mars et al., 2000). L'utilizzo di un ELISA comparativo che utilizzi le gE dei due virus può essere proposto nelle situazioni in cui si sospetta un superamento della barriera di specie da parte di entrambi i virus dall'ospite naturale ad altre specie di ruminanti.

	2A5	5H5	1H10	1D11	5F5	4D7
BoHV1 field strain	+	+	+	+	+	+
BoHV1 ΔgE strain	-	+	-	-	-	-
CpHV1 BA.1	-	-	-	-	-	-
Mock MDBK	-	-	-	-	-	-
pSEC/Bo-gI	-	+	-	-	-	-
pSEC/Bo-gE	+	-	-	-	+	+
pSEC/Bo-gE+gI	+	+	±	±	+	+
pSEC/Cp-gI	-	-	-	-	-	-
pSEC/Cp-gE	-	-	-	-	-	-
pSEC/Cp-gE+gI	-	-	-	-	-	-
pSEC empty vector	-	-	-	-	-	-



**Figura 1** - Reattività di sieri di bovini BoHV1 positivi (cerchi) e di capre CpHV1 positive (quadrati) verso antigeni gE-BoHV1 (asse y) e gE-CpHV1 (asse x).

## Characterization of Caprine herpesvirus 1 (CpHV1) glycoproteins E and I

**Key words:** Caprine Herpes Virus 1, Glycoprotein E, Elisa.

## Bibliografia

- Buonavoglia, C., Tempesta, M., Cavalli, A., Voigt, V., Buonavoglia, D., Conser-va, A., Corrente, M., (1996). Reactivation of caprine herpesvirus 1 in latently infected goats. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 19, 275-281.
- Deregt, D., Tessaro, S.V., Gilbert, S.A., (2005). Serological evidence of latency in cattle experimentally infected with elk herpesvirus. *Vet Rec* 156, 610-611.
- Donofrio, G., Bottarelli, E., Sandro, C., Flammmini, C.F., (2006). Expression of bovine viral diarrhoea virus glycoprotein E2 as a soluble secreted form in a Mammalian cell line. *Clin Vaccine Immunol* 13, 698-701.
- Engels, M., Thiry, E., (2000). L'infection de la chèvre par l'herpesvirus caprin de type 1. *Point Vétérinaire* 204, 37-45.
- Mars, M.H., Rijsewijk, F.A., Maris-Veldhuis, M.A., Hage, J.J., van Oirschot, J.T., (2000). Presence of bovine herpesvirus 1 gB-seropositive but gE-seronegative Dutch cattle with no apparent virus exposure. *Vet Rec* 147, 328-331.
- Tempesta, M., Pratelli, A., Normanno, G., Camero, M., Buonavoglia, D., Greco, G., Buonavoglia, C., (2000). Experimental intravaginal infection of goats with caprine herpesvirus 1. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* 47, 197-201.

# Il latte di pecora: un mezzo di protezione per i batteri lattici probiotici?



M.A. MURGIA, F. FANCELLO, P. DEIANA, N.P. MANGIA

Istituto di Microbiologia Generale ed Applicata, Dipartimento di Agraria, Università di Sassari

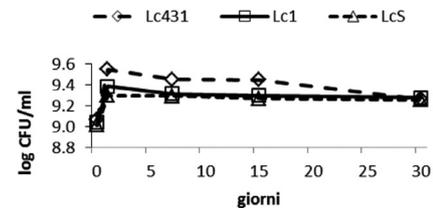
**Parole chiave:** latte di pecora, batteri lattici, probiotici.

**INTRODUZIONE** - In Sardegna si producono circa 283.200 t di latte ovino<sup>1</sup> che vengono quasi interamente trasformate in formaggi a lunga e media stagionatura. Nonostante la Sardegna presenti tra i prodotti tradizionali produzioni casearie appartenenti alla categoria dei formaggi freschi (Fruhe<sup>2</sup>) e dei lattici fermentati (Gioddu<sup>3</sup>), queste sono scarsamente prodotte. Il latte ovino, opportunamente scremato, rappresenta una materia prima eccellente per la produzione di formaggi freschi anche arricchiti di batteri lattici probiotici<sup>4</sup>. Con questo lavoro si è voluto indagare la proprietà del latte ovino, in confronto con il latte vaccino, in riferimento alla capacità di sopravvivenza dei batteri lattici probiotici impiegati per la produzione di lattici fermentati. A tale scopo sono stati impiegati batteri probiotici appartenenti alla specie *Lactobacillus casei* e precisamente i ceppi Lc431, Lc1 e LcS.

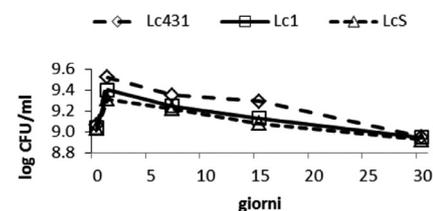
**MATERIALI E METODI** - Tre ceppi di batteri lattici della specie *Lactobacillus casei* sono stati impiegati per la produzione di lattici fermentati impiegando latte di vacca e latte di pecora. La composizione delle due tipologie di latte viene riportata nella Tabella 1. Dopo la standardizzazione del contenuto di grasso, il latte è stato trattato termicamente (72°C per 5 minuti) e quindi inoculato con i tre ceppi di *Lactobacillus casei*. L'inoculo è stato eseguito con il pellet, risospeso in soluzione di Ringer, di una coltura overnight in modo da garantire un contenuto iniziale di cellule di 10<sup>9</sup> ufc/ml di latte. Il latte è stato, quindi, posto in contenitori di vetro e incubato alla temperatura di 30°C per 8 ore. Il latte fermentato così ottenuto è stato conservato alla temperatura di 4°C per 30 giorni. Il monitoraggio dei batteri lattici è stato eseguito al tempo 0 (subito dopo l'inoculo), alle 8 ore (fine fermentazione) e dopo 7, 15 e 30 giorni di conservazione. Le prove sono state eseguite in triplo. Le conte microbiche sono state eseguite secondo la metodologia FIL-IDF<sup>5</sup>.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati, riportati nelle figure 1 e 2 mostrano l'evoluzione dei ceppi di *Lactobacillus casei* nei lattici di pecora e vacca. Durante la fase di incubazione i batteri lattici si sviluppano con la stessa intensità sia nel latte di pecora che in quello di vacca con differenze significative (P<0.05) solo per il ceppo Lc431. È importante notare che nel latte di pecora il numero dei lattobacilli rimane pressoché costante nel tempo (10<sup>9</sup>); nel latte di vacca, invece, si ha una diminuzione progressiva fino al trentesimo giorno (10<sup>8</sup>). Questo comportamento non è, in generale, ceppo dipendente. Nella figura 3 vengono riportati i risultati relativi al consumo del lattosio e alla evoluzione del pH. Nel latte di pecora il lattosio, dal valore iniziale di 4.80 passa a 1.52 a 7 giorni per scomparire a 30 giorni di conservazione; nel latte di vacca i valori corrispondenti risultano di 4.10, 0.38 e 0.05. In generale, questi risultati dimostrano che le caratteristiche del latte influenzano la sopravvivenza dei batteri lattici probiotici.

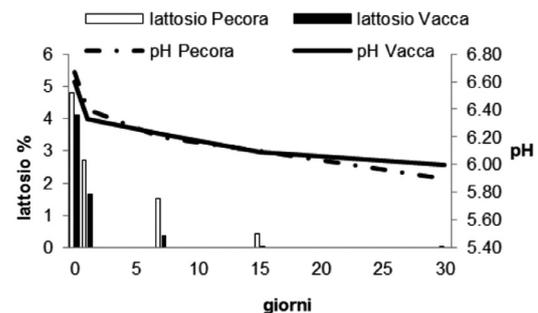
**CONCLUSIONI** - Le caratteristiche di composizione del latte ovino, opportunamente scremato, lo rendono un buon substrato per la produzione di lattici fermentati in quanto tendenzialmente garantisce una maggio-



**Figura 1** - Evoluzione nel tempo dei ceppi Lc431, Lc1 e LcS in latte di pecora.



**Figura 2** - Evoluzione nel tempo dei ceppi Lc431, Lc1 e LcS in latte di vacca.



**Figura 3** - Evoluzione nel tempo del pH e del lattosio in latte di pecora e vacca.

re sopravvivenza dei microrganismi probiotici. Questi primi risultati sono di auspicio per un maggiore impiego del latte di pecora nella preparazione di lattici fermentati.

## ■ Sheep Milk: a protective medium for probiotic LAB?

**Key words:** Sheep Milk, Lactic Acid Bacteria, Probiotics.

**Tabella 1** - Composizione del latte.

	Latte di pecora	Latte di vacca
Acqua %	81,30	87,01
Proteine %	6,02	3,30
Grassi* %	1,50	1,50
Caseina %	4,50	3,00
Lattosio %	4,80	4,10
pH	6,67	6,60

\* Valore standardizzato

## Bibliografia

1. La filiera ovicaprina in Sardegna aspetti strutturali e dati congiunturali. Gennaio 2012. <http://www.sardegnaagricoltura.it/index.php?xsl=446&s=14&v=9&c=3595&na=1&n=10&tt=1&o=1>.
2. Murgia M.A., Mangia N.P., Fancello F., Deiana P. (2009). Microbiological characterization of Fruhe cheese. Special Issue, Annals of Microbiology, 59, 69-69.
3. Deiana P., Catzeddu P., Caredda M., Fois M.L. (1991). Impiego di estratti enzimatici di lieviti aromatizzanti nella produzione di Gioddu. Rivista Soc. Ital. Scienza dell'Alimentazione, 20, 417-426.
4. Murgia M.A., Mangia N.P., Garau G., Fancello F., Deiana P. (2011). Sardinian Fruhe: A Traditional Fresh Cheese As Alternative Carrier Of Probiotic Bacteria. SUMMILK IDF WDS., Parma 15-19 Ottobre.
5. Milk and milk products: Enumeration of microorganism (colony count technique at 30°C). FIL-IDF 100B:91.

# Estratto polifenolico nella dieta e stato ossidativo nelle pecore in transizione



S. DE VINCENZI<sup>2</sup>, L. MOSCATI<sup>1</sup>, S. RUGGERI<sup>2</sup>, S. MATTIOLI<sup>2</sup>, M. PELA<sup>1</sup>,  
A. ANTOLINI<sup>1</sup>, E. CESTOLA<sup>2</sup>, M. PAUSELLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Applicata - sezione di Scienze Zootecniche - Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** pecore da latte, immunità innata, stato ossidativo.

**INTRODUZIONE** - L'impiego di estratti polifenolici vegetali è stato testato da vari autori (Gladine et al. 2007) al fine di valutarne la capacità antiossidante. Si è rilevato come gli estratti ricavati da rosmarino, vinaccioli, limone e calendula riducano la suscettibilità della parte lipidica del plasma alla perossidazione. Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare l'effetto dell'impiego di un concentrato polifenolico da acque di vegetazione (CPC da A.V.) come integratore alimentare in diete arricchite con fonti di acidi grassi n-3, su alcuni parametri indicatori dello stress ossidativo e dell'immunità innata nella pecora da latte nella fase di transizione.

**MATERIALI E METODI** - Per la prova sono state impiegate 18 pecore pluripare di razza Comisana. Gli animali, dopo essere stati sottoposti a sincronizzazione degli estri, inseminazione artificiale per via laparoscopica e successiva diagnosi di gravidanza mediante ecografia, sono stati suddivisi in tre gruppi omogenei, posti in box singoli, ed alimentati con fieno di graminacee *ad libitum* e, da 30 a 15 giorni prima della data presunta del parto e fino al parto rispettivamente con 500 g capo/d e 750 g capo/d, di uno dei tre concentrati sperimentali: LP, caratterizzato da lino laminato (20%) e da CPC da A.V. (1,5%); L, caratterizzato da lino laminato (20%); C privo di fonti lipidiche, contenenti rispettivamente 1,88, 1,91 e 1,88 Mcal di ENL/kg di S.S. e il 19,96, 19,69 e 20,01% di PG/kg di S.S. A partire da 21 d prima della data del parto previsto, ogni due giorni, e successivamente il giorno del parto, a 1d, 3d, 7d e 21d dopo lo stesso, si è provveduto a prelevare campioni di sangue dalla giugulare mediante l'impiego di vacutainer. I campioni sono stati centrifugati e il siero raccolto è stato conservato a -80 °C fino al momento dell'analisi. Le determinazioni effettuate sono state le seguenti:

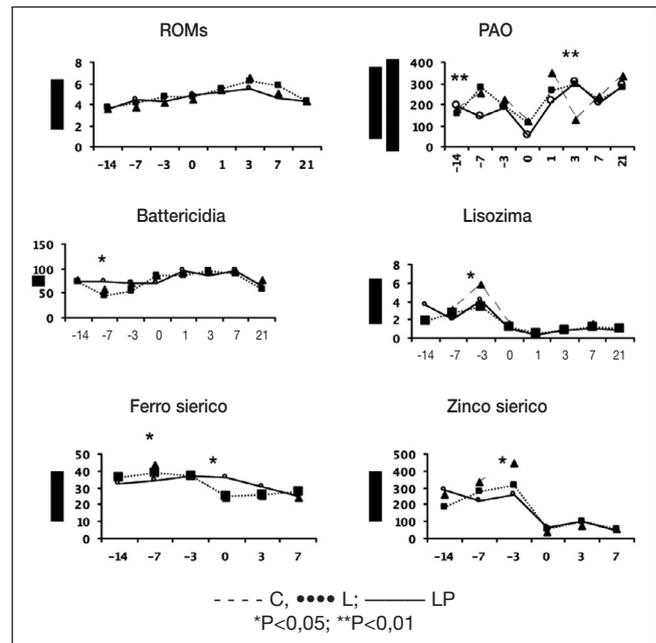
- Parametri dello stato ossidativo: metaboliti reattivi all'ossigeno (ROM's) e potere antiossidante del siero (PAO) mediante kit commerciali (Diacron, Italia).
- Parametri dell'immunità innata: battericidia il cui test è stato fatto secondo la metodica di (Dorm et al. 1980) e lisozima serico la cui titolazione è stata eseguita secondo la metodica di Osserman. (1966)
- Zinco e Ferro mediante analizzatore di chimica clinica Konelab 200 e reagenti dedicati.

I dati raccolti sono stati elaborati statisticamente secondo un modello monofattoriale per ogni prelievo.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - La distribuzione dei parti gemelari, uno per gruppo sperimentale, ha confermato quanto osservato dall'ecografia al momento della formazione dei gruppi alimentari e nello stesso tempo ha permesso di annullare l'effetto tipo di parto. I ROMs, pur presentando un andamento simile nei tre gruppi sperimentali, sono in corrispondenza del picco massimo (3d dopo il parto), inferiori ( $P<0,05$ ) negli animali del gruppo LP rispetto ai gruppi L e C (Fig. 1). Il potere antiossidante del siero (PAO), è più basso negli animali del gruppo LP 7d prima del parto ( $P<0,01$ ) per poi avere un andamento simile nei tre gruppi sperimentali per ridursi 3d dopo il parto unicamente negli animali del gruppo controllo quando si rileva il picco massimo di ROMs ( $P<0,01$ ) (Fig. 1).

L'andamento dell'attività battericidica del siero, simile a quello osservato da Acuti et al. (2010) in pecore di razza Sarda, negli animali dei gruppi C e L ha un crollo 7d prima del parto ( $P<0,05$ ), per crescere nel periparto e ridursi ancora dopo 21 d dallo stesso, mentre nelle pecore del gruppo LP sembra avere un andamento più lineare (Fig. 1).

L'innalzamento del lisozima, indice di processi infiammatori, tre giorni prima del parto è superiore ( $P<0,05$ ) nel gruppo C rispetto ai gruppi L e LP (Fig. 1). Il livello di Fe sierico presenta un andamento molto simile a quello dello Zn (Fig. 1) negli animali dei gruppi L e C, mentre non si assiste al suo crollo in corrispondenza del parto negli animali del gruppo LP ( $P<0,05$ ). Lo Zn sierico risulta superiore ( $P<0,05$ ) 3 d prima del parto nel gruppo C: la sua diminuzione al momento del parto, così



**Figura 1** - Effetto del trattamento alimentare sui parametri considerati.

come osservato da Badiei et al (2011) nelle bovine da latte, è legata alla formazione del colostro (Goff e Stabel, 1990) in associazione a una risposta della fase acuta dovuta alla reazione infiammatoria a livello uterino. Sebbene l'evoluzione della concentrazione sierica di tali micronutrienti non sia ben conosciuta, si ritiene che le loro variazioni siano legate all'aumento della concentrazione delle proteine della fase acuta, chelanti di ioni metallici e alterazioni del metabolismo immunitario (Zebeli et al., 2011).

**CONCLUSIONI** - Tali risultati, rilevano come l'apporto di PUFA e di estratti polifenolici sembrano modulare alcuni dei parametri infiammatori e dello stress ossidativo nel periodo del periparto rendendo meno acuta la risposta infiammatoria fisiologica in questo periodo.

*Ringraziamenti:* ricerca condotta nell'ambito del Progetto PRIN MIUR Anno 2007 - prot. 20079TF7ZB Coord. Naz. Prof. Massimo Morgante.

## ■ Polyphenolic extract in the diet and oxidative status in transition dairy ewes

**Key words:** dairy ewes, native immunity, oxidative status,.

## Bibliografia

- Acuti G., Pela M., Antolini A., Cagiola M., Tralbalza-Marinucci M., Mughetti L., Moscati L. (2010) LAR suppl. n.5 pag.52.  
Badiei K., Orangi H., Mostaghni K., Pourjafar M., Roushan A. (2011) Comp Clin Pathol (2011) 20:427-431.  
Dorm W. et al. (1980). Arch. Exper. Vet. Med. 34,635-650.  
Gladine C., E. Rock, C. Morand, D. Bauchart, D. Durand. 2007. British Journal of Nutrition (2007), 98, 691-701.  
Goff JP, Stabel JR (1990) J Dairy Sci 73:3195-3199.  
Osserman E.F (1966). J. Exp. Med. 124, 921- 952.  
Zebeli Q., S. Sivaraman, S. M. Dunn, B. N. Ametaj. 2011. J. Dairy Sci. 94: 4968-4983.

# Studio retrospettivo sulla neuropatologia degli ovi-caprini dal 1995 al 2012



M.T. CAPUCCHIO<sup>1</sup>, G.R. LORIA<sup>2</sup>, P.R.D. ROCHA<sup>1</sup>, E. BIASIBETTI<sup>1</sup>,  
S.A. MIGNACCA<sup>2</sup>, G. GUARNERI<sup>2</sup>, M. RUSSO<sup>2</sup>, F. GUARDA<sup>1</sup>,  
V. DI MARCO LO PRESTI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** encefalo, ovini, caprini, istopatologia.

**INTRODUZIONE** - Le malattie di tipo neurologico negli allevamenti dei piccoli ruminanti sono difficilmente segnalate sia per la difficoltà diagnostica, sia per la scarsa collaborazione degli allevatori poco sensibili nei confronti dell'importanza economica e sanitaria di tali patologie. A completamento di lavori svolti precedentemente (Di Marco et al., 1998; Guarda et al., 1999; Capucchio et al., 2002; Di Marco et al., 2003a,b; Capucchio et al., 2005) gli autori prendono in considerazione le patologie nervose osservate negli ultimi tredici anni negli ovini e nei caprini deceduti spontaneamente o macellati d'urgenza per gravi sintomi neurologici nelle regioni Piemonte e Sicilia.

**MATERIALI E METODI** - Da gennaio 1995 a giugno 2012 n. 254 ovi-caprini sono stati sottoposti ad esame anatomo-istopatologico presso il laboratorio di neuropatologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie di Torino. Gli animali erano prevalentemente adulti di età compresa tra 2 e 11 anni con sintomatologia neurologica. Solo una minima parte (n. 24, 9.4%) era rappresentata da feti abortiti o soggetti morti nei primi mesi di vita. Il sistema nervoso centrale (SNC) degli animali, raccolto immediatamente dopo la morte o la macellazione, è stato fissato in formalina tamponata al 10%. Una parte della neocorteccia e del tronco encefalico caudale è stata congelata in modo da poter eseguire eventuali esami microbiologici e biochimici. Dopo inclusione in paraffina dei tessuti, sono stati allestiti preparati istologici di 5 µ di spessore poi colorati con ematossilina-eosina. Colorazioni istochimiche sono state eseguite in caso di necessità. Le indagini immunostochimiche sono state effettuate utilizzando anticorpi specifici sugli encefali con lesioni istologiche riferibili a scrapie, listeriosi e con flogosi mononucleate a sede periependimale con sospetto eziologico di encefalite da lentivirus. Indagini microbiologiche e micologiche sono state eseguite dal tessuto nervoso di animali con lesioni caratteristiche per il relativo agente eziologico per la conferma.

**RISULTATI** - Le patologie osservate sono state le seguenti: infezioni da Pestivirus - Border disease (n=10); flogosi non purulente (n=40) di cui 4 provocate da Lentivirus; flogosi purulente o batteriche (n=30) di cui 7 casi di Listeriosi e 4 ascessi encefalici; micosi (n=2); cenurosi (n=40); Scrapie (n=36); encefalopatie (n=18) di cui 9 malacie focali o multifocali, 4 encefalopatie tossico-metaboliche, 2 necrosi cerebro-corticali e 3 emorragie. Sono inoltre stati osservati un caso di idrocefalo congenito in un ovino e una neoplasia cerebellare. N. 14 encefali mostravano lesioni focali o non significative quali focali granulomi encefalici e depositi di melanina. N. 62 cervelli non mostravano lesioni istologiche.

**DISCUSSIONE** - L'insieme delle patologie osservate mostra come anche i piccoli ruminanti presentino patologie nervose con incidenza non trascurabile. Il 24% degli encefali non ha mostrato lesioni. Questo dato è imputabile al fatto che certe sindromi in particolare nei ruminanti (es: chetosi, tossicosi sistemiche, carenze di minerali) possono indurre sintomi neurologici senza in realtà causare lesioni encefaliche microscopiche. Le diagnosi più frequenti sono state: flogosi non purulente, cenurosi e scrapie. Particolare attenzione va posta sulla possibilità che molte patologie nervose degli animali adulti, sulla base dei soli rilievi clinici, siano confuse con la scrapie. Circa le encefaliti linfocitarie è interessante notare come i Lentivirus ovi-caprini siano piuttosto diffusi negli allevamenti anche se spesso non si localizzano a livello cerebrale o meglio in tale distretto non sempre è riscontrabile l'antigene virale. Va comunque tenuto presente che i focolai di perivasculite non purulenta osservati lasciano presumere la presenza di infezioni latenti di verosimile natura virale, ormai pregresse, ma dall'esame istopatologico non è stato sempre possibile definire l'eziologia delle lesioni. Anche le indagini

immunoistochimiche talvolta non danno esiti positivi poiché spesso gli antigeni virali non sono più presenti nel tessuto. Gli stessi virus sono poi molto difficili da identificare anche in coltura. Tra le altre forme neurologiche osservate non va dimenticata la cenurosi, presente in modo significativo negli allevamenti ovini in particolare del Sud Italia (molto più rara nei caprini). Tale infestazione mostra, soprattutto nelle forme cerebellari, notevole difficoltà nella diagnosi differenziale con la scrapie. I casi di cenurosi sono per lo più limitati ad alcune aree geografiche ove probabilmente gli allevatori, non conoscendo il ruolo primario del cane come vettore di diffusione della parassitosi, continuano ad utilizzare gli scarti dei visceri degli ovi-caprini macellati in azienda per la sua alimentazione. Una maggiore informazione al fine di una corretta profilassi potrebbe certamente limitare i danni provocati da questa patologia. Per quanto riguarda le flogosi batteriche la listeriosi è risultata la più frequente. Le lesioni osservate coinvolgevano più aree cerebrali raggiungendo anche il tronco encefalico rostrale (talamo). I manicotti perivascolari presentavano un numero di strati cellulari inferiore rispetto a quelli osservati nei bovini, mentre le aree malaciche (microascessi) erano più estese permettendo di ipotizzare che i piccoli ruminanti siano meno resistenti all'infezione rispetto al bovino. Complessivamente una maggiore conoscenza della neuropatologia ovi-caprina è estremamente importante per lo svolgimento di un valido esame clinico neurologico. La sorveglianza clinica innanzitutto ed anatomo-istopatologica rappresentano quindi le due tappe importanti al fine di attuare una corretta profilassi.

**CONCLUSIONI** - L'insieme delle patologie nervose osservate rende necessaria l'attivazione di una maggiore sorveglianza clinica ed anatomo-istopatologica anche per quelle specie animali, quali gli ovi-caprini, che normalmente vengono trascurate poiché considerate di limitata resa produttiva.

## Retrospective study on the neuropathology of sheep and goats from 1995 to 2012

**Key words:** brain, sheep, goats, histopathology.

## Bibliografia

- Guarda F., Capucchio M.T., Di Marco V., Bianco P. (1999), Neurological lesions in sheep and goats. VII Congress of the Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Santarem (Portugal) April 22-24, p.18.
- Capucchio M.T., Di Marco V., Vazzana I., Mangiapane R., Catalano D., Guarda F. (2002), Neuropatologia dei piccoli ruminanti: diagnosi differenziale con la scrapie. VI Convegno degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali sulle encefalopatie Spongiformi Animali Alassio 10-11- ottobre 2002.
- Di Marco V., De Luca T., Munafò P., Coppolino S., Capucchio M.T., Catalano D., Guarda F. (2003), a. Septicemic listeriosis in Sicily. Atti FeMeSPRum 22-25 maggio 2003; p. 113.
- Di Marco V., Vazzana I., Nicita M., Napoli C., Capucchio M.T., Catalano D., Guarda F. (2003), b. Visna virus infection in a sheep in Sicily: clinical and pathological investigations. Atti FeMeSPRum 22-25 maggio 2003; p. 114.
- Capucchio M.T., Catalano D., Di Marco V., Ottonelli C., Valenza F., Guarda F. (2005), Small Ruminants neuropathology: a retrospective study on neurological disorders 1995-2004 41° Meeting AINP, Saluzzo (CN) 26-28 maggio 2005; p. 136.
- Di Marco V., Riili S., Zanghi P., Capucchio M.T., Giraldo A., Guarda F. (1998), Large Animals Review, 4 (3): 79-86.

# Eziologia degli aborti negli allevamenti ovini e caprini in Sicilia: considerazioni pratiche in allevamento e diagnostica di laboratorio



M. VITALE<sup>1</sup>, M. RUSSO<sup>1</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>1</sup>, V. ARONICA<sup>1</sup>, S. MILONE<sup>3</sup>, S. REALE<sup>1</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>2</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>3</sup> Medico Veterinario Specialista Ambulatoriale, ASP 5 - Messina

**Parole chiave:** eziologia, aborto, ovini, caprini.

**INTRODUZIONE** - Gli aborti ricorrenti in allevamenti ovini e caprini siciliani sono causa di ingenti perdite economiche e rappresentano una problematica in Sanità Pubblica Veterinaria per i risvolti zoonosici imputabili soprattutto alla brucellosi. Si ritiene che circa il 90% degli aborti siano dovuti a cause infettive e i meccanismi con i quali si instaurano dipendono dal tipo di organismo infettante, dall'organo interessato e dallo stadio della gravidanza in cui esso avviene. Molte delle malattie sistemiche che colpiscono la madre possono causare aborto anche quando gli organi riproduttivi non sono direttamente interessati. I risultati delle indagini di laboratorio riportate in letteratura, indicano che solo nel 30% dei casi si riesce ad identificare l'agente eziologico. L'applicazione sistematica di una tecnica veloce, semplice ed economica, quale un esame clinico-patologico del feto e degli involgii, è fondamentale per formulare un'ipotesi diagnostica nelle prime fasi di comparsa dell'evento abortigeno. Questo permette di effettuare un corretto campionamento e mirate indagini di laboratorio.

**MATERIALI E METODI** - Un totale di 123 feti (83 ovini e 40 caprini) e 84 placenti sono stati analizzati nel biennio 2011-12. Il materiale utilizzato proveniva da allevamenti ovini e caprini in cui si erano verificati casi di aborto, dislocati in diverse aree del territorio della Sicilia. Gli allevamenti erano costituiti da unità produttive ad indirizzo zootecnico-specializzato e gli animali erano tenuti in allevamenti stabulati con paddocks e tettoie, con pascolo in regime di semilibertà. Su ogni feto e placenta è stato eseguito un metodico e meticoloso esame anatomo-patologico. Le tecniche diagnostiche utilizzate sono state: l'esame microscopico di strisci di materiale placentare o di impronte di organi di feti abortiti, colorati con Ziehl-Nielsen modificata (colorazione di Stamp), l'esame istologico colorato con Ematossilina-Eosina; l'immunoistochimica su tessuti fissati in formalina. Per le indagini sierologiche sono state utilizzate l'ELISA e l'IFI per Chlamydia, Leptospira e Neospora. Per il *Toxoplasma gondii* sono state utilizzate le metodiche in uso presso il Centro di Referenza Nazionale della Toxoplasmosi (CE.TOX) Palermo.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Tutti i feti e le placenti sono risultati negativi alla Listeriosi, Leptosirosi e Salmonellosi. Dalla tabella si evince che nel 48.8% non è stato possibile identificare la causa eziologica dell'evento abortigeno. Risulta evidente che le cause di aborto infettive di origine batterica sono quelle maggiormente rappresentate nella specie ovina e caprina nella regione Sicilia. La Brucellosi e la Campilobacteriosi, infatti, con il 19% dei casi rappresentano le cause principali di aborto, seguite con il 12.7% e l'11.1% dal *Toxoplasma gondii* e dalla *Chlamydia abortus*. Ancora, tra le cause batteriche, sono presenti la *Coxiella burnetii* (3.2%), e il *Mycoplasma spp.* (1.6%). Infine, tra le cause virali sono stati individuati il virus della Border disease (3.2%) e il virus della Blue tongue (1.6%). Gli aborti causati da agenti infettivi ed infestivi negli allevamenti ovini e caprini sono stati 45 (71.4%) contro i 18 (28.5%) imputabili a cause diverse. Degna di rilievo è l'elevata percentuale di nascite (12,7%) di agnelli affetti da malformazioni congenite e di due casi di ipertiroidismo secondario da carenza di iodio e da alimentazione con Brassicacee in due allevamenti di capre.

**CONCLUSIONI** - L'iter diagnostico seguito nell'indagine ha visto in primis l'approfondimento clinico in allevamento, seguito dall'esame autoptico che ci ha permesso di formulare un'ipotesi diagnostica che in molti casi è stata avvalorata dagli esami di laboratorio. La carenza di dati bibliografici sugli aborti in Italia non permette di effettuare una dissertazione tra le diverse realtà regionali, ad eccezione della regione Sardegna, dove la principale causa abortigena è il *Toxoplasma gondii* seguita dalla *Salmonella abortus ovis*. Quest'ultima nel corso del nostro studio non è mai stata isolata negli allevamenti ovini e caprini. Quanto so-

**Tabella 1** - Cause di aborto negli ovini e nei caprini.

Cause	Analizzati			
	Num.	Ov.	Ca.	%
Non identificate	60	41	19	48.8
Identificate	63	42	21	51.2
<b>Agenti batterici</b>				
Chl. abortus	7	5	2	11.1
Coxiella burnetii	2	2		3.2
Campylobacter spp.	12	6	6	19
Mycoplasma spp.	1		1	1.6
Brucella spp.	12	7	5	19
<b>Agenti virali</b>				
Blue tongue	1	1		1.6
Border disease	2	2		3.2
<b>Agenti protozoari</b>				
Tox. gondii	8	5	3	12.7
<b>Miscellanea</b>				
Iperplasia tiroidea	2		2	3.2
Anasarca	1	1		1.6
Enfisema fetale	1	1		1.6
Macerazione fetale	2	2		3.2
Malformazioni ed alterazioni congenite	8	6	2	12.7
Idroallantoide	1	1		1.6
Torsione cordone ombelicale	1	1		1.6
Diarrea fetale	2	2		3.2

pra dimostra in maniera tangibile come le patologie siano legate al territorio. La tipologia di allevamento ed il clima, che consente di tenere gli animali per gran parte dell'anno al pascolo, non aiuta ad identificare tempestivamente gli animali appena abortiti e più facilmente si assiste alla perdita dei feti e delle placenti che vengono divorati dai cani o da animali selvatici (volpi, corvidi, etc.).

## ■ Etiologic agents of sheep and goats abortions in Sicily: practical considerations in farm and diagnostic laboratory

**Key words:** eziologia, aborto, ovini, caprini.

## Bibliografia

- Del Piero F. (2003), Large Anim. Rev.; 9: 11-27.  
 Kirkbride C.A. (1993), J. Vet. Diagn. Invest.; 5: 398-402.  
 Masala G., Porcu R., Daga C., Denti S., Canu G., Patta C., Tola S. (2007), J. Vet. Diagn. Invest.; 196-98.  
 Oporto B., Barandika J.F., Hurtado A., Aduriz G., Moreno B., Garcia-Perez A.L. (2006), Ann. N. Y. Acad. Sci.; 1078: 498-501.  
 Tainturier D. (2003), Summa; 20: 21-26.  
 Kirkbride, C. A. (1992), J. Vet. Diagn. Invest.; 4: 175-180.  
 Oporto B., Barandika J.F., Hurtado A., Aduriz G., Moreno B., Garcia-Perez A.L. (2006), Ann. N. Y. Acad. Sci.; 1078: 498-501.

# Approccio alla gestione di un focolaio di paratubercolosi ovi-caprina



G. LUCIFORA<sup>1</sup>, V. RITACCO<sup>2</sup>, A. PALUCCI<sup>2</sup>, A. DI SARNO<sup>1</sup>, D. TASCA<sup>3</sup>, G. ASCIONE<sup>1</sup>, G. GIANNOTTA<sup>4</sup>, G. MANCUSO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

<sup>2</sup> Veterinario ARA, Cosenza (CS)

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>4</sup> Servizio Anatomia Patologica Az. Osped. dell'Annunziata Cosenza (CS)

**Parole chiave:** paratubercolosi, ovino, caprino, controllo.

**INTRODUZIONE** - La paratubercolosi è un'infezione cronica dei ruminanti e di altri animali, sostenuta da *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* (MAP). A causa del lungo periodo di incubazione, l'infezione decorre generalmente in forma subclinica. Pertanto le conseguenze sulla salute e produttività degli animali sono spesso mascherate, al punto da ritenere ingiustificati investimenti importanti in programmi di controllo sia pubblici che volontari. La prevenzione si concretizza in misure di biosicurezza esterna per ridurre l'introduzione dell'agente infettivo e di biocontenimento per ridurre la probabilità della propagazione dell'infezione già presente. I programmi di controllo diretto si articolano generalmente all'interno di una strategia che comporta il risanamento in termini aziendali, attraverso la ripetizione di esami indiretti sino a che non siano stati eliminati tutti i capi positivi. In Italia mancano certificazioni d'indennità cogenti e, a differenza di Spagna, Norvegia, Olanda e Australia, non è ancora disponibile un vaccino approvato e registrato.

**MATERIALI E METODI** - Scopo del presente studio è descrivere una modalità di approccio alla diagnosi di certezza e all'adozione di misure di contenimento calibrate sulla diffusione dell'infezione e sulle capacità economico-gestionali dell'imprenditore agricolo in un sospetto focolaio. L'azienda, situata sull'altopiano della Sila cosentina, è composta da circa 700 ovis, meticcio di razza Sarda e Comisana e da circa 200 caprini, meticcio di Maltese, Camosciata e rustica Calabrese. È presente un nucleo di 20 bovine pezzate rosse, linea latte-carne, allevate in regime semibrado, con ricovero dedicato. La rimonta è interna. Nel ricovero, costituito da un capannone, è applicato il sistema di lettiera permanente con rinnovo completo e pulizia della stalla due volte l'anno (autunno e primavera). L'alimentazione è garantita essenzialmente da pascolo polifita naturale e, solo per gli animali in lattazione, da una modesta integrazione di cereali. L'allevamento ovi-caprino è orientato alla produzione di latte (in media 1 litro ca. capo/die) e di carne. Per ottenere una continuità produttiva annuale gli animali sono suddivisi in tre gruppi di lattazione. L'azienda è dotata di caseificio e macelleria aziendali. L'allevatore riferisce che nel corso dell'ultimo decennio ha osservato sporadici casi di soggetti con dimagrimento progressivo, in assenza di altri sintomi, che non rispondevano ad alcuna terapia e che nel giro di un anno andavano incontro a cachessia e morte, nonostante l'appetito conservato. I capi malati erano giovani (1,5-2 anni) e più spesso di specie caprina. Le perdite annue sono state in media di due-tre capi con un picco di oltre dieci. Esami sierologici in ELISA su due di questi avevano evidenziato positività per MAP. All'inizio di questo studio non erano presenti capi con sintomatologia riferibile a paratubercolosi. Al fine di confermare la diagnosi di sospetto nell'allevamento ovi-caprino e per stabilire la prevalenza dell'infezione è stato estrapolato un campione di soggetti, stratificato per specie. Per calcolare la numerosità campionaria si è ipotizzata una prevalenza attesa del 10% e si è utilizzato il software "Campionamenti 1.0" di libero utilizzo. Pertanto 28 ovis e 25 caprini, dopo estrazione random, sono stati prelevati ed i loro sieri sono stati esaminati con metodo ELISA (Kit commerciale Istitute Pourquier). Un caprino, risultato positivo alla prova sierologica, è stato sottoposto a indagini dirette. Il soggetto, di circa 7 anni d'età, meticcio di camosciata, gravido di circa tre mesi e in asciutta, si presentava in ottimo stato di salute. Su di esso sono stati eseguiti: esame necroscopico, batteriologico, istologico, biomolecolare. L'esame colturale non è stato preso in considerazione per i lunghi tempi di esecuzione (almeno 7 settimane). Campioni istologici di mucosa del digiuno e della valvola ileocecale e sezioni di linfonodi meseraici ed ileo-

**Tabella 1**

Specie	Capi Allevati	Capi Testati Elisa	Capi Siero +	Prevalenza apparente (%)	Prevalenza Reale (%)
Ov.	700	28	3	10,7	21
Cap.	190	25	4	16	22

cecali sono stati colorati con metodo Ziehl-Neelsen ed Ematossilina-Eosina. Un tratto del digiuno-ileo e i linfonodi meseraici ed ileocecali sono stati processati mediante PCR convenzionale con kit ADIAVET.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - L'indagine sierologica ha evidenziato positività per 4 caprini e 3 ovis; Applicando i dati della letteratura sui risultati sierologici abbiamo stimato la prevalenza reale (Tab. 1). A circa 9 mesi di distanza è stata eseguita una ulteriore indagine sierologica sul 70% dell'effettivo i cui esiti hanno confermato la stima. Del capo esaminato solo un tratto dell'ileo presentava segni di enterite catarrale. I preparati istologici colorati con in Ziehl-Nielsen sono risultati positivi per batteri alcalo-acido resistenti. Sezioni istologiche rilevavano enterite superficiale con interessamento della sola lamina propria e linfadenite cronica a cellule epitelioidi. La PCR confermava la presenza di MAP nella mucosa dell'intestino e nei linfonodi. Si ritiene che l'esito delle indagini diagnostiche indirette e dirette eseguite sul soggetto sacrificato siano sufficienti a confermare il sospetto diagnostico di presenza di paratubercolosi.

**CONCLUSIONI** - Nel caso specifico, l'individuazione dei capi sieropositivi e la stima della diffusione dell'infezione vincolano la decisione sul tipo di piano di controllo da adottare. Infatti, l'eliminazione dei capi positivi ha un alto costo che rende svantaggioso l'intervento. Mancando un intervento pubblico di sostegno, è consigliabile un piano di controllo pluriennale che preveda l'integrazione di modifiche gestionali. La gestione della lettiera, l'utilizzo di idonea disinfezione ambientale, l'oculata gestione degli ingressi e delle rimonte è un approccio meno dispendioso anche se di più lungo periodo.

## ■ Approach to the management of an outbreak of paratuberculosis in sheep and goat

**Key words:** paratuberculosis, sheep, goat, monitoring.

## Bibliografia

- Siguroardottir O.G., Valheim M., McL. Press C. (2004), *Advanced Drug Delivery Reviews*; 56: 819-834.
- Francisco J., Reviriego J., Moreno M.A., Dominguez L. (2000), *Preventive Veterinary Medicine*; 43: 43-51.
- Dorshorst N.C., Collins M.T. and Lombard J.E. (2006), *Preventive Veterinary Medicine*; 75 (1-2): 92-122.
- Bezoz J., de Juan L., Romero B., Alvarez J., Mazzucchelli F., Mateos A., Dominguez L., Aranaz A. (2010), *Vet. Immunol. Immunopathol.*; 133(2-4): 269-275.
- Nielsen S.S., Toft N. (2008), *Veterinary Microbiology*; 129: 217-235.
- Martin W., Meek A.H., Willeberg P. (1987), *Veterinary epidemiology: principles and methods*, vol.1, 50-52, 35-38 e 275-279 Iowa State University press/AMES.
- Thrusfield M., (1995) *Veterinary Epidemiology*, 2nd edition, vol.1, pp. 183 ed. Blackwell Science.

# Stato metabolico di pecore da latte allevate in due diverse condizioni ambientali



I. VAZZANA<sup>1</sup>, V. BARZON<sup>2</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>1</sup>, S. DARA<sup>1</sup>, M. GIANESELLA<sup>3</sup>, M. MORGANTE<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia. Via G. Marinuzzi 3, 90100, Palermo (PA), Italy

<sup>2</sup> Medico veterinario Libero Professionista

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova  
Viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD), Italy

**Parole chiave:** pecora da latte, stato metabolico.

**INTRODUZIONE** - Il monitoraggio ed il controllo dello stato di salute, del benessere e dell'efficienza produttiva e riproduttiva dei ruminanti allevati per la produzione di latte rappresenta ormai uno degli aspetti più importanti ma nel contempo più difficili da attuare negli allevamenti intensivi e semiestensivi presenti in Italia. Scopo della presente prova è stato quello di valutare lo stato metabolico di pecore da latte allevate in due diverse condizioni ambientali.

**MATERIALI E METODI** - Per la prova in oggetto sono state prese in considerazione 16 aziende di pecore da latte di razza Sarda per un totale di 180 animali in lattazione. In particolare 10 aziende (per un totale di 100 animali) localizzate all'interno della Regione Lazio (gruppo A) ed allevati in forma intensiva e 6 aziende (per un totale di 80 animali) localizzate nella Regione Sicilia (gruppo B) ed allevati in forma semiestensiva. Le due tipologie aziendali si differenziavano soprattutto per i programmi alimentari adottati. Nelle prime l'alimentazione si basava soprattutto sull'utilizzo di concentrati e foraggi conservati mentre nelle seconde era caratterizzata soprattutto dall'utilizzo del pascolo. In tutti gli animali è stato effettuato un prelievo di sangue venoso nella medesima stagione (primavera) e nel medesimo periodo di lattazione (tra i 30 ed i 50 giorni post-partum). Sono stati determinati i livelli ematici del profilo biochimico (GGT, ALT, AST, glucosio, insulina, NEFA,  $\beta$ -Idrossibutirrato, urea, creatinina, colesterolo, trigliceridi, Ca, P, Mg, Na, Cl e K), dell'elettroforesi delle proteine (proteine totali, albumine, globuline con le relative frazioni) e dell'assetto ormonale (T3, T4 e TSH). I dati ottenuti sono stati quindi sottoposti ad analisi della varianza (ANOVA) mediante software SIGMA STAT 3.5, al fine di valutare l'effetto del gruppo (Aziende della Regione Lazio vs Aziende della Regione Sicilia) sui parametri ematobiochimici determinati.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Per la maggior parte dei parametri presi in considerazione si sono evidenziate differenze statisticamente significative ( $P < 0.05$ ) tra i 2 gruppi di aziende. In particolare le principali differenze (con  $P < 0.05$ ) sono state riscontrate per i valori ematici del Ca ( $8.29 \pm 1.24$  e  $9.57 \pm 0.88$  mg/dl nel gruppo A e nel gruppo B, rispettivamente), della glicemia ( $57.87 \pm 10.77$  e  $46.33 \pm 10.43$  mg/dl nel gruppo A e nel gruppo B, rispettivamente). Tali differenze sono probabilmente legate al fatto che nel gruppo A gli animali essendo allevati in maniera intensiva presentano una maggior ingestione a sua volta accompagnata ad una maggior produzione, ecco allora che probabilmente questi animali presentano un livello ematico di Ca e di glucosio più basso nel post-partum quando le richieste energetiche indirizzate alla produzione di latte sono elevate. Andando poi ad osservare i risultati relativi all'et-

troforesi delle proteine si può evidenziare come il livello ematico delle  $\alpha$ -2 globuline risulti significativamente ( $P < 0.05$ ) più alto negli animali del gruppo A ( $0.80 \pm 0.20$  g/dl) rispetto al gruppo B ( $0.74 \pm 0.13$ ). È presumibile che l'elevato sforzo produttivo cui le pecore sono sottoposte nel gruppo A si ripercuota a livello epatico, causando l'attivazione di circuiti di regolazione di fenomeni flogistici endogeni e determinando in particolare un aumento della sintesi delle  $\alpha$ -globuline e una diminuzione delle albumine. Per quanto concerne gli ormoni tiroidei è stata riscontrata una differenza statisticamente significativa ( $P < 0.05$ ) tra i 2 gruppi di aziende, in particolare per quanto concerne l'ormone T3, il quale è risultato più alto nel gruppo A ( $135.43 \pm 48.46$  ng/dl) rispetto al gruppo B ( $74.57 \pm 38.44$ ). Probabilmente tale differenza è legata ad una diversa situazione manageriale, in effetti è dimostrato come negli animali in produzione zootecnica la produzione di ormoni tiroidei sia influenzata dalla presenza di eventi stressogeni (Rasooli et al., 2004). Inoltre, tale minor livello di T3 nel gruppo B potrebbe essere influenzato dalla temperatura ambientale, la quale si è visto essere inversamente correlata con la produzione di tali ormoni tiroidei (McGuire et al., 1991).

**CONCLUSIONI** - In conclusione i risultati di tale prova indicano una rilevante e significativa differenza tra i due gruppi di aziende per quanto concerne la maggior parte di parametri presi in considerazione. Tali differenze sono sicuramente da ricondurre ad una diversa localizzazione territoriale e soprattutto ad una diversa gestione aziendale, in quanto si tratta di allevamenti intensivi in un caso e di allevamenti semiestensivi nel secondo gruppo.

## Metabolic assessment of dairy sheep raised in two difference field conditions

**Key words:** dairy sheep, metabolic assessment.

## Bibliografia

- McGuire M.A., Beede D.K., Collier R.J., Buonomo F.C., De Lorenzo M.A., Wilcox C.J., Huntington G.B., Reynolds C.K. (1991). Effects of acute thermal stress and amount of feed intake on concentrations of somatotropin, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-II, and thyroid hormones in plasma of lactating Holstein cows. *J. Anim. Sci.*, 69:2050-2056.
- Rasooli A., Nouri M., Khadjeh G.H., Rasekh A. (2004). The influences of seasonal variations on thyroid activity and some biochemical parameters of cattle. *Iranian J. Vet. Research*, 5: 1383:1392.

# La lana verso un nuovo futuro: parte in Puglia il progetto “Partnersheep”



N. DIBENEDETTO<sup>1</sup>, F. MODESTI<sup>2</sup>, C. MATTIA<sup>2</sup>, P. DIRENZO<sup>1</sup>, A. DIBENEDETTO<sup>1</sup>, E. PIERAGOSTINI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Consorzio Murgia Viva

<sup>2</sup> Parco Nazionale dell'Alta Murgia

<sup>3</sup> Agronomo Libero Professionista, Università di Bari

**Parole chiave:** recupero della lana di pecora, salvaguardia del paesaggio, filiera produttiva sostenibile.

**INTRODUZIONE** - La lana europea è stata il primo prodotto agricolo a subire le logiche del mercato globale perché sostituita alla fine degli anni '50 dalla lana australiana e neozelandese; è così a poco a poco scomparsa tutta una filiera culturale ed economica che ha trasformato la lana locale in residuo di difficile smaltimento e ad alto impatto ambientale. Nell'ultimo decennio, sull'onda del recente fenomeno dell'etica dei consumi che, oltre a criteri responsabilità sociale nelle attività di produzione, ha introdotto una maggiore sensibilità rispetto all'impatto ambientale delle attività dell'uomo, si è registrata un'inversione di tendenza e sono state avviate anche in Italia una serie di iniziative tese al recupero della lana da rifiuto al suo storico stato di prodotto nobile. A gennaio 2004 nasce in Piemonte il Laboratorio “La Tineola” piccolo progetto di lavorazione della lana di pecora, progetto a carattere prevalentemente culturale per la tutela e la valorizzazione del territorio alpino. Negli anni successivi sono state registrate attività di recupero delle lane locali anche in Campania e, nello specifico, nel territorio dell'Alto Tammaro in provincia di Benevento. Molto interessante il progetto di cooperazione transfrontaliera “MedLaine”, acronimo che sta per “Lana del Mediterraneo”, il quale aveva come obiettivo la valorizzazione della lana di pecore allevate in Maremma, Sardegna e Corsica. In Sardegna, a seguito di anni di attività di ricerca e di confronto con il territorio sul tema del recupero e della valorizzazione delle lane svolti dal CNR-Ibimet di Sassari ed attraverso la rete coordinata dalla Coldiretti Sardegna, l'anno scorso tremila quintali di lana di pecora sono stati venduti a un prezzo record di 1,22 € al chilo. Pur considerando che la Sardegna ha una concentrazione di capi ovis ed una conseguente disponibilità di prodotto non riscontrabile in nessun'altra regione italiana, l'iniziativa della Coldiretti Sardegna, che ha portato ad una maggiore remunerazione degli allevatori, è certamente una notizia incoraggiante ed interessante anche in una prospettiva più ampia a livello nazionale (Sito DNA). Il problema è quello del raccordo delle iniziative frammentate, soprattutto in considerazione del fatto che esiste un unico Centro di Raccolta di Lane Sucide autorizzato, quale risultato di un progetto studiato in collaborazione con la Camera di Commercio di Biella e altri Enti distribuiti sul territorio Italiano. Detto centro, gestito dal Consorzio Biella The Wool Company, offre servizi di consulenza per la creazione di altri Centri di Raccolta sul Territorio Nazionale ed è stato coinvolto nel 2010 nelle operazioni di lavaggio e filatura della lana raccolta a seguito di un'altra iniziativa dal titolo “Le vie della Lana: sperimentazione di una micro-filiera per il recupero della lana di pecora dell'Alto Tammaro e della Campania” condotta dal CNR-Ibimet grazie all'appoggio della Coldiretti Campania e al supporto finanziario della Camera di Commercio di Benevento. Sulla stessa scia si muove il progetto *Pecunia* avviato nel 2010 in Abruzzo sotto l'egida del Parco Nazionale del Gran Sasso (Sito web Parco Gran Sasso).

In analogia con progetto *Pecunia* parte in Puglia il progetto “Partnersheep” illustrato nel presente articolo nel quale vengono riportati anche i primi risultati (Sito web Parco Alta Murgia).

**DESCRIZIONE SINTETICA DEL PROGETTO E PRIMI RISULTATI** - Il progetto *Partnersheep* prende le mosse da un'iniziativa portata avanti nel 2011 dal Consorzio Murgia Viva i cui consorziati - 8 ovicoltori, tutti fortemente impegnati nel tentativo di rivitalizzare la missione pastorale del territorio della Murgia - hanno aggregato, in occasione della tosa dello scorso anno, 45 allevatori raccogliendo 18 tonnellate di lana conferite tutte allo stesso commerciante. Sulla scorta di questa positiva esperienza il Parco Nazionale dell'Alta Murgia ha accolto

con entusiasmo l'idea di farsi promotore di un progetto organico della durata di un quinquennio di cui tre con un sostegno economico da parte dell'Ente Parco. Il progetto ha come obiettivi specifici da un lato, la commercializzazione della lana con conseguenti ricavi derivanti dalla vendita di beni e servizi connessi alla sua produzione, dall'altro l'implementazione delle attività tipiche di un'azienda zootecnica. Così, prima di ogni stagione di tosa per la durata di un triennio vanno ripartite le azioni come segue:

⇒ **Fase 1: Corso di formazione per cernitori.**

Onde migliorare la qualità del prodotto lana, l'Ente Parco, in collaborazione con il Consorzio Murgia Viva, promuove l'organizzazione di un corso indirizzato prevalentemente agli allevatori e teso alla diffusione della cultura della raccolta e della cernita. La formazione in parola ha anche l'obiettivo di sensibilizzare gli ovicoltori della Murgia circa la necessità di operare insieme e presentarsi sul mercato come un unico interlocutore del territorio murgiano.

⇒ **Fase 2: Raccolta della lana.**

L'obiettivo era raccogliere una quantità di lana di 16000/18000 Kg o anche maggiore (pari a 2 tir con rimorchio) raccolta in balloni distinti per singolo allevatore. La raccolta è stata coordinata da referenti del Parco i quali hanno curato anche la registrazione ed archiviazione di tutti i dati prima della spedizione alla volta di Miagliano (BI), luogo in cui verrà selezionata, distinta allevatore per allevatore. In particolare ogni sacco marchiato con il logo del Parco dell'Alta Murgia conterrà tutte le indicazioni relative al lotto di pertinenza.

⇒ **Fase 3: Vendita della lana.**

La lana selezionata, re-imbollata e testata verrà venduta in asta internazionale. L'importo così ottenuto, dedotti i costi di gestione, selezione, analisi e imballaggio, verrà reso agli allevatori. L'allevatore riceverà un rapporto personalizzato, detto “pagella”, con le motivazioni della valutazione ottenuta.

⇒ **Fase 4: Referenti locali.**

Alcuni referenti locali dovranno seguire tutte le fasi a Miagliano (BI) in modo da poter facilitare anche negli anni successivi il lavoro di preparazione. Per ovvie ragioni di contemporaneità, qui si riportano solo i risultati delle prime due fasi di questo primo anno. In totale hanno risposto all'appello 64 aziende per un totale di 20000 capi ed un quantitativo di lana di circa 35 tonnellate (pari a 3 tir con rimorchio) inviate a Miagliano (BI) che è più del doppio delle 16/17 tonnellate previste. Le prime due fasi possono considerarsi concluse con successo. L'auspicio è che l'onda positiva prosegua anche nella fase di vendita e, soprattutto, nel ritorno economico agli allevatori, il che costituirebbe volano per un'espansione delle attività del prossimo anno coinvolgendo un numero maggiore di aziende.

■ **The sheep's wool towards a new future:  
The project “Partnersheep” in Apulia**

**Key words:** Sheep's wool, Landscape Safeguard, Wool Sustainable Supply Chain.

## Bibliografia

Sito web DNA: <http://designnaturaartigianatowordpress.com/2012/02/08/>  
Sito web Parco Gran Sasso: <http://www.gransassolagapark.it/pagina.php?id=105>  
Sito web Parco Alta Murgia: <http://www.parcotaltamurgia.gov.it/>

# Indicatori prognostici nell'anaplasmosi ovina: approccio multivariato



E. PIERAGOSTINI, E. CIANI, I. ALLOGGIO, F. PETAZZI

Dipartimento di Progettazione e gestione dei sistemi agro zootecnici e forestali, Università degli Studi di Bari

**Parole chiave:** *Anaplasma ovis*, analisi canonica discriminante, parametri clinici.

**INTRODUZIONE** - La suscettibilità nei confronti delle malattie trasmesse da zecche (TBD) è un elemento discriminante per gli allevatori nella scelta della razza da allevare in ambienti nei quali tali patologie sono enzootiche. Considerando che tra i parassiti trasmessi agli ovini da zecche (TBP) in Puglia l'*Anaplasma ovis* è quello con maggiore prevalenza (Pieragostini *et al.* 2010), è stata realizzata una prova in cui si valutava la suscettibilità nei confronti di tale parassita da parte di due razze mediterranee, la pugliese Altamura e la siciliana Comisana e della nord-europea Suffolk. I risultati del confronto, effettuato analizzando una serie di 11 parametri clinici con metodo univariato, hanno consentito di stabilire una gradualità di risposta in termini di suscettibilità che vanno da "molto suscettibile" (Suffolk), a "moderatamente suscettibile" (Comisana) ed infine a "non suscettibile" (Altamura). Tra le diverse categorie di parametri clinici di particolare significato sono risultati quelli all'interno dell'esame obiettivo e quelli che definivano il fenotipo ematologico (Pieragostini *et al.*, 2011). A seguito di questa esperienza, ci siamo posti l'interrogativo di come utilizzare ai fini pratici i risultati ottenuti, ovvero come semplificare il messaggio per i veterinari di campo, individuando i parametri più significativi ai fini diagnostici, prognostici e terapeutici. Tale obiettivo può essere conseguito adottando un approccio multivariato al problema che consenta di tenere conto congiuntamente dei diversi fattori in gioco e di poterne valutare il contributo specifico. All'uopo, ad esempio, l'analisi canonica discriminante viene applicata per individuare le funzioni lineari capaci di differenziare nel modo più efficiente possibile gli oggetti rispetto agli attributi. Pertanto, questo lavoro riporta i risultati derivanti dall'utilizzo dell'analisi canonica discriminante sul data set precedentemente citato costituito dall'insieme dei parametri clinici registrati, per lo stesso soggetto, prima e dopo l'infezione sperimentale con *Anaplasma ovis* e nelle diverse fasi della malattia, fino a recupero totale, valutando, nel contempo, il contributo di ciascuna variabile alle funzioni canoniche derivate.

**MATERIALI E METODI** - Il data-set oggetto di analisi è composto da 436 osservazioni fatte su 36 agnelli (18 Altamurani, 9 Comisani e 9 Suffolk) per un totale di 11 variabili costituite da parametri ricavati dall'esame obiettivo dei soggetti e dalle analisi ematologiche.

Tutte le analisi sono state effettuate usando il pacchetto statistico SPSS v. 16.0.0 adottando l'approccio step-wise (a ciascun passaggio viene introdotta la variabile che massimizza la distanza di Mahalanobis tra i gruppi più vicini).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La tabella 1 riporta la percentuale di varianza tra i gruppi spiegata da ciascuna funzione discriminante. Nel caso presentato, il 63,6% di varianza tra i gruppi risulta spiegata dalla prima funzione ed il 36,4% dalla seconda. La tabella 2 mostra la significatività statistica delle funzioni discriminanti. Come si può osservare, il test di Wilks indica che le due funzioni lineari discriminanti risultano significative e, quindi, spiegano bene le differenze tra le razze.

Lo strumento più corretto per stabilire il contributo di una variabile alla discriminazione è dato dal coefficiente di correlazione fra i valori delle funzioni discriminanti e quelli della variabile stessa, contenuti nella matrice di struttura: più elevati sono, in valore assoluto, tali coefficienti, maggiore è il potere discriminante della variabile.

Dalla matrice di struttura riportata in tabella 3 inferiamo che: la prima funzione discriminante è basata soprattutto sul numero dei globuli rossi (RBC) e sul valore ematocrito (HCT), entrambi negativi ed entrambi relativamente pesanti anche sulla seconda funzione discriminante, su cui pesano anche il numero dei globuli bianchi (WBC), il volume cellulare (MCV) e la temperatura (T°C). Si evince perciò che le variabili che hanno maggior potere discriminante sono RBC e HCT, da un lato, e WBC, MCV e T°C, dall'altro.

**Tabella 1** - Autovalori e percentuale di variabilità spiegata dalle due funzioni canoniche discriminanti.

Funzione	Eigenvalue	% di varianza	% Cumulativa	Correlazione canonica
1	1,226	63,6	63,6	0,742
2	0,7	36,4	100	0,642

**Tabella 2** - Significatività delle due funzioni canoniche discriminanti testate mediante il test di Wilks.

Test di funzione	Lambda di Wilks	Chi-quadro	df	Valore di P
1 vs 2	0,264	571,06	14	0,000
2	0,588	227,744	6	0,000

**Tabella 3** - Matrice di struttura. Coefficienti canonici discriminanti per le variabili inserite nel modello mediante analisi step-wise.

Parametro	Funzione	
	1	2
T°C	-0,045	-0,624
HCT	-3,025	-0,632
RBC	-3,402	1,163
MCV	0,514	0,814
MCHC	0,259	0,567
WBC	-0,272	-0,834
Plt	-0,183	0,54

**CONCLUSIONI** - Considerando che, nel caso in questione, avevamo a disposizione insieme di dati ascrivibili a singoli gruppi razziali e che ognuno di essi era caratterizzato da un diverso "fenotipo malattia" (gravissimo, grave, lieve), i risultati ottenuti indicano che, in condizioni di campo, la temperatura corporea ed il valore ematocrito rappresentano semplici, oltre che efficaci, indicazioni diagnostico-prognostiche.

## ■ A multivariate approach to reveal prognosticators for anaplasmosis in sheep

**Key words:** *Anaplasma ovis*, canonical discriminant analysis, clinical parameters.

## Bibliografia

- Pieragostini E., Ciani E., Rubino G., Petazzi F. (2011), In: Health Management. - Different Approaches and Solutions, Ed. Krzysztof Smigorski, Polonia.
- Pieragostini E., Petazzi F. (1999), Parassitologia; 41(1):89-94.
- Pieragostini E., Rubino G., Bramante G., Rullo R., Petazzi F., Caroli A. (2006), J. Anim. Breed. Genet.; 123:122-130.
- Pieragostini E., G. De Ruvo, A. Alongi, S.Scimeca, A. Torina (2010). In: Atti XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. Supplemento al N°5 di Large Animal Review. Pesaro, 22-25 settembre 2010, vol. 16, p. 130.

# Cellule somatiche in latte ovino: analisi e applicazione delle curve ROC



M. TOLONE<sup>1</sup>, M.L. SCATASSA<sup>2</sup>, I. MANCUSO<sup>2</sup>, V. MIRAGLIA<sup>2</sup>, B. PORTOLANO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento DEMETRA, Università degli Studi di Palermo

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

**Parole chiave:** ROC, conta cellule somatiche, mastiti, ovini da latte.

**INTRODUZIONE** - Negli ovini da latte le mastiti costituiscono una delle principali cause di perdite economiche per la ridotta produzione e soprattutto per la scarsa qualità tecnologica del latte, in considerazione del fatto che il latte ovino è utilizzato prevalentemente per la trasformazione casearia (Leitner et al., 2004). L'esame batteriologico, ad oggi, è considerato il miglior metodo di diagnosi delle mastiti negli ovini (Gonzalez-Rodriguez and Càrmenes, 1996). Tuttavia l'esame batteriologico per singolo capo è difficilmente applicabile su larga scala nei programmi di controllo genetico delle mastiti. Diversi studi hanno dimostrato, soprattutto nella specie bovina, che il contenuto in cellule somatiche (SCC) del latte può essere impiegato sia come metodo diagnostico sia come criterio di selezione nei programmi di miglioramento genetico per la resistenza alle mastiti (Colleau and Le Bihan-Duval, 1995). Nei bovini è stato dimostrato che valori inferiori a 100.000 cellule/ml discriminano mammelle infette e sane (Schwarz et al., 2011), mentre negli ovini diversi studi sono stati condotti e sono ancora in corso per definirne un valore soglia (Pengov 2001; Rosati et al., 2005). L'efficacia diagnostica del SCC può essere valutata mediante l'applicazione delle Receiver Operating Characteristics curves (ROC), la cui area sottesa alla curva (AUC) è equivalente alla probabilità che un individuo estratto casualmente da una popolazione di individui infetti abbia un valore di SCC maggiore rispetto a quello di un individuo estratto, sempre casualmente, da una popolazione di individui sani (Bamber, 1975; Hanley and McNeil, 1982). Obiettivo di questo lavoro è stato applicare la metodologia delle ROC per valutare la capacità diagnostica del SCC nel discriminare le mammelle infette da quelle sane e per individuare un valore soglia discriminante in ovini da latte.

**MATERIALI E METODI** - In totale sono stati analizzati 14.072 campioni di latte individuale da 720 pecore di razza Valle del Belice in 5 allevamenti. I campioni sono stati prelevati mensilmente alla mungitura del mattino nel corso di 6 lattazioni comprese tra il 2006 e il 2012. I prelievi sono stati effettuati dalle due emimammelle in contenitori sterili, conservati a 4°C. L'isolamento e l'identificazione batterica sono stati effettuati tramite semina di 10 µl di latte su Agar Sangue (AS) incubato a 37°C per 24 - 48h in aerofilia e, se necessario, in microaerofilia e la determinazione delle SCC mediante citometria di flusso (Fossomatic FC). In base al risultato dell'esame batteriologico sono stati identificati 9 gruppi (Tab. 1). Il contenuto in SCC è stato convertito in "Somatic Cell Score" (SCS) mediante trasformazione logaritmica:  $SCS = \log_{10}(CCS)$ . L'AUC è stata stimata mediante approccio non parametrico utilizzando i valori di sensibilità e specificità ottenuti dicotomizzando i valori osservati in positivi e negativi al test. Pertanto, per ciascun valore  $z$  di SCS è definito un punto della ROC corrispondente a un set di valori  $Se_{(z)}$  e  $[1-Sp_{(z)}]$  (Pepe, 2004). La ROC è stata utilizzata anche per selezionare un valore soglia discriminante ottimale che tenga conto dei costi degli esiti del test diagnostico. La funzione utilizzata per il calcolo del coefficiente angolare della retta tangente al punto operativo ottimale della ROC è stata ottenuta calcolando la derivata prima della funzione di costo proposta da Metz nel 1978 ed eguagliando la stessa a zero. Il Punto Operativo Ottimale (POO) sulla curva ROC è stato quindi individuato con la seguente funzione:

$$S = \frac{(1-p)}{p} \cdot \frac{(C_{FP} - C_{TN})}{(C_{FN} - C_{TP})}$$

dove  $C_{TP}$ ,  $C_{FP}$ ,  $C_{TN}$  e  $C_{FN}$  sono rispettivamente il costo dei veri e falsi positivi e dei veri e falsi negativi. Tali costi approssimativamente sono stati stimati pari a  $C_{TP} = € 50.00$ ,  $C_{FP} = € 75.00$ ,  $C_{TN} = € 12.50$ , e  $C_{FN} = € 99.75$ .

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Le statistiche descrittive per il SCS ed il SCC rispetto all'esito dell'esame batteriologico sono riportate in tabella 1. La media aritmetica del SCS per i test negativi e positivi è risultata rispettivamente di  $5.17 \pm 0.008$  e  $5.80 \pm 0.010$ , la media geometrica del SCC per i test negativi e positivi è risultata rispettivamente di  $146.96 \times 10^3$  e  $630.85 \times$

**Tabella 1** - Media aritmetica per gruppo del SCS e media geometrica del SCC x 1000 cells/ml.

Gruppo	N	Media SCS	Media Geometrica SCC
nessun isolamento	7865	5.17 ± 0.01	146.96 ± 1.98
SNC + altri streptococchi	32	5.88 ± 0.14	754.67 ± 2.22
Altri germi	73	5.41 ± 0.10	258.54 ± 2.90
SNC	4966	5.74 ± 0.01	544.06 ± 2.18
Stafilococchi + coagulasi	730	6.12 ± 0.03	1307.23 ± 2.29
<i>Streptococcus</i> spp	192	6.01 ± 0.05	1028.56 ± 2.07
Streptococchi patogeni	164	6.06 ± 0.05	1140.19 ± 1.95
<i>Corynebacterium</i>	11	6.25 ± 0.22	1756.70 ± 2.07
<i>M. haemolytica</i>	39	6.47 ± 0.09	2961.08 ± 1.77

$10^3$  cells/ml. Complessivamente sono risultati positivi all'esame batteriologico 6207 campioni con una prevalenza pari al 44,1%. L'AUC è risultata pari a  $0.73 \pm 0.004$  ( $P \leq 0.0001$ ). Il POO è risultato essere  $>427 \times 10^3$  cells/ml, in corrispondenza di tale punto la sensibilità è pari al 59,2% mentre la specificità si attesta all'80,9%. In corrispondenza di tale valore il 71% dei soggetti positivi ed il 72% dei soggetti negativi sono classificati correttamente. La metodologia delle ROC fornisce delle utili informazioni per la valutazione dei valori soglia del SCC utilizzabili anche ai fini della selezione per la resistenza alle mastiti. L'approccio di tipo non parametrico per la stima delle ROC, adottato in questo studio, ha dimostrato che il SCC può essere validamente utilizzato per discriminare gli animali infetti da quelli sani. Tuttavia ulteriori studi si ritengono necessari per una più precisa valutazione economica dei costi delle mastiti in considerazione del fatto che il POO sulle ROC tende a spostarsi verso valori con più alta  $Se$  e più bassa  $Sp$  man mano che i costi dei falsi positivi si riducono rispetto a quelli dei falsi negativi o quando aumenta il valore della prevalenza.

## ■ Somatic Cells Count in ewe milk: Receiver Operating Characteristic (ROC) analysis

**Key words:** ROC, somatic cell count, mastitis, dairy sheep.

## Bibliografia

- Bamber D. (1975), Journal of Mathematical Psychology; 12: 387-415.  
 Colleau J.J., Le Bihan-Duval E. (1995), Journal of Dairy Science; 78: 659-671.  
 Gonzalez-Rodriguez M.C., Càrmenes P. (1996), Small Ruminant Research; 21: 245-250.  
 Leitner G., Chaffer M., Shamay A., Shapiro F., Merin U., Ezra E., Saran A., Silanikove N. (2004), Journal of Dairy Science; 87: 46-52.  
 Hanley J.A. McNeil B.J. (1982) Radiology; 143: 29-36.  
 Metz C.E. (1978) Seminars in Nuclear Medicine; 8: 283-298.  
 Pengov a. (2001) Journal of Dairy Science 84; (3): 572-574.  
 Pepe M.S. (2004) Oxford; New York: Oxford University Press.  
 Rosati R., Militello G., Boselli C., Giangolini G., Amatiste S., Brajon G., Gazzoni S., Casini M., Scatassa M.L., Bono P., Cannas A., Mugoni G., Simula M., Denti G., Gradassi S., Fagiolo A. (2005), Scienza e Tecnica Lattiero Casearia; 56 (3): 161-181.  
 Schwarz D., Diestrebeck US., Bragemann K., Zshock M., Wolter W., Czerny CP. (2011) J. Dairy Sci; 94 (10): 5033-44.

# Impiego di *Rosmarinus officinalis* nell'alimentazione dell'ovino: effetti sui principali parametri di degradabilità ruminale *in vivo*



G. COBELLIS<sup>1</sup>, C. FORTE<sup>1</sup>, G. ACUTI<sup>1</sup>, M. RICCI<sup>1</sup>, S. DE VINCENZI<sup>2</sup>, M. TRABALZA-MARINUCCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Biologia Applicata, Facoltà di Agraria, Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** *Rosmarinus officinalis*, degradabilità ruminale, ovini, mangime pellettato.

**INTRODUZIONE** - I fitoderivati sono considerati un gruppo di sostanze importanti in alimentazione animale (Garcia-Gonzalez et al., 2006). Al rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) vengono riconosciute attività antiossidanti, antimutagene, antibatteriche e chemioprotettive (Ibañez, 2003). Risulta infatti ricco di oli essenziali (non meno del 1,5%), i cui principali componenti sono canfora, 1-8 cineolo,  $\alpha$ -pinene, borneolo; sono inoltre presenti triterpeni, tannini, steroli e composti fenolici (Cuvelier, 1996; Houligan e Chang, 1984). Questa sperimentazione ha avuto come obiettivo la valutazione dell'effetto di diverse forme di integrazione di rosmarino nella dieta dell'ovino sui parametri della degradabilità ruminale.

**MATERIALI E METODI** - Per la prova sono state impiegate 4 pecore di razza Bergamasca x Appenninica provviste di fistola ruminale, alimentate con una razione a base di fieno di erba medica (1,5 kg/capo/die) fornito in due pasti giornalieri, con libero accesso all'acqua. È stato utilizzato un protocollo a quadrato latino 4x4 che ha previsto la somministrazione (400 g/capo/die) di 4 diete, isoenergetiche e isoproteiche, ciascuna con un periodo di adattamento di 14 gg: 1) mangime controllo pellettato (CTR); 2) mangime CTR addizionato dopo pellettatura di olio essenziale di rosmarino in ragione dell'1,75%, adsorbito su un supporto inerte (OE); 3) mangime CTR addizionato dopo pellettatura di foglie di rosmarino essiccate e macinate in ragione del 2,50% (FR); 4) mangime CTR contenente foglie di rosmarino in ragione del 2,50% aggiunte alla miscela prima della pellettatura (FR pellet). La cinetica di degradabilità *in situ* è stata determinata secondo la tecnica descritta da Orskov e McDonald (1979). Per l'incubazione nel ruminale sono stati utilizzati sacchetti di poliestere con pori di diametro pari a 50±15  $\mu$ m e di dimensioni pari a 5x10 cm; all'interno è stato posto un campione di 1,5 g di fieno di erba medica macinato. Sono stati utilizzati otto tempi di incubazione: 0, 2, 4, 12, 24, 48, 72 e 120 h. Al momento di ciascun prelievo sono stati estratti dal ruminale due sacchetti. La degradabilità della sostanza secca (SS) è stata calcolata tramite l'equazione di Orskov e McDonald (1979); il residuo è stato analizzato per la determinazione della proteina grezza (PG), con il metodo Kjeldahl (AOAC, 1990) e delle frazioni NDF e ADF della fibra (Van Soest 1991). La degradabilità effettiva delle diverse componenti è stata calcolata grazie all'ausilio del software Naway (Rowett Research Institute, Aberdeen, UK). I dati sono stati analizzati mediante procedura GLM del software SAS (2001) utilizzando un modello per misurazioni ripetute.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I dati mostrano una riduzione ( $P<0,001$ ) della degradabilità della proteina grezza (Tab. 1) nei soggetti alimentati con la dieta FR pellet. Conseguentemente alla riduzione della degradabilità della proteina grezza, si è notata anche una riduzione della degradabilità della SS (Tab. 2), ai tempi 24 ( $P<0,001$ ) e 48 ( $P<0,05$ ). Si può ipotizzare che la riduzione della degradabilità di PG e SS, osservata per la dieta FR pellet, sia legata al trattamento meccanico e termico subito dal fitoderivato durante la pellettatura, tale da condizionare la disponibilità dei principi attivi e quindi le proprietà antimicrobiche.

Le componenti della fibra NDF e ADF non sono state influenzate dall'integrazione di rosmarino nella dieta.

**CONCLUSIONI** - L'impiego del rosmarino non sembra influenzare in maniera importante la degradabilità ruminale della SS. Qualora confermato, l'effetto di modulazione della degradabilità proteica potrebbe essere utilizzato in alcune tipologie di dieta al fine di rendere più efficiente il metabolismo azotato ruminale.

**Tabella 1** - Valori di degradazione ruminale della proteina grezza (PG) in dipendenza dalla dieta. Medie caratterizzate da lettere diverse all'interno della stessa riga differiscono.

Tempi (h)	CTR	FR pellet	FR	OE	ES	P
2	51,29 <sup>a</sup>	43,05 <sup>b</sup>	53,12 <sup>a</sup>	52,19 <sup>a</sup>	1,17	<,0001
4	46,33 <sup>b</sup>	42,94 <sup>b</sup>	51,47 <sup>a</sup>	53,52 <sup>a</sup>	1,27	<,0001
12	61,85 <sup>ab</sup>	57,90 <sup>b</sup>	64,03 <sup>a</sup>	65,72 <sup>a</sup>	1,22	<,0,01
24	65,07 <sup>b</sup>	61,50 <sup>c</sup>	68,34 <sup>a</sup>	63,19 <sup>bc</sup>	0,55	<,0001
48	67,35 <sup>ab</sup>	57,37 <sup>c</sup>	70,27 <sup>a</sup>	64,70 <sup>b</sup>	1,26	<,0001

**Tabella 2** - Valori della degradabilità della sostanza secca. Medie caratterizzate da lettere diverse all'interno della stessa riga differiscono.

Tempi (h)	CTR	FR pellet	FR	OE	ES	P
2	40,85	36,77	38,29	38,82	1,39	NS
4	38,06	40,03	41,11	43,42	1,47	NS
12	48,93	49,20	51,75	53,78	1,38	NS
24	57,13 <sup>a</sup>	53,49 <sup>b</sup>	57,90 <sup>a</sup>	58,94 <sup>a</sup>	0,74	<,0,001
48	58,23 <sup>ab</sup>	53,84 <sup>b</sup>	60,54 <sup>a</sup>	57,89 <sup>ab</sup>	1,40	<,0,05
72	55,81	56,20	59,01	58,01	1,40	NS
120	53,53	55,26	55,19	56,35	1,66	NS

■ ***Rosmarinus officinalis* in the diet of sheep: effects on *in vivo* ruminal degradability**

**Key words:** *Rosmarinus officinalis*, ruminal degradability, sheep, pellet.

## Bibliografia

- AOAC (1990), Official Methods Of Analysis. 15th Edn. Association Of Official Analytical Chemists. Washington, Dc. Usa.
- Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996), Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. J Am Oil Chem; 73: 645-652.
- Garcia-Gonzalez R., Lopez S., Fernandez M., Gonzalez J.S. (2006), Effects of the addition of some medicinal plants on methane production in a rumen simulating fermenter (RUSITEC). Int. Congr. Ser.; 1293: 172-175.
- Houligan C.M., Chang S.S. (1984), Elucidation of the chemical structure of a novel antioxidant, rosmaridiphenol, isolated from rosemary. J Am Oil Chem; 61: 1036-1039.
- Ibañez E. (2003), Subcritical water extraction of antioxidant compounds from rosemary plants. J Agric Food Chem.; 51: 375-382.
- Orskov ER., McDonald I. (1979), The estimation of protein degradability in the rumen from incubation measurements weighted according to rate of passage. J Agric Sci (Cambridge); 92: 499-503.
- SAS Institute Inc. (2001), version 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Van Soest P.J., Robertson J.B., Lewis B.A. (1991), Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. J. Dairy Sci; 74: 3583-3597.

# Impiego di *Rosmarinus officinalis* nell'alimentazione dell'ovino: effetti sul pH e sulla popolazione batterica ruminale



M. RICCI<sup>1</sup>, G. ACUTI<sup>1</sup>, C. FORTE<sup>1</sup>, G. COBELLIS<sup>1</sup>, O. OLIVIERI<sup>1</sup>, A. VALIANI<sup>2</sup>, M. TRABALZA-MARINUCCI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** *Rosmarinus officinalis*, batteri ruminali, mangime pellettato, ovini.

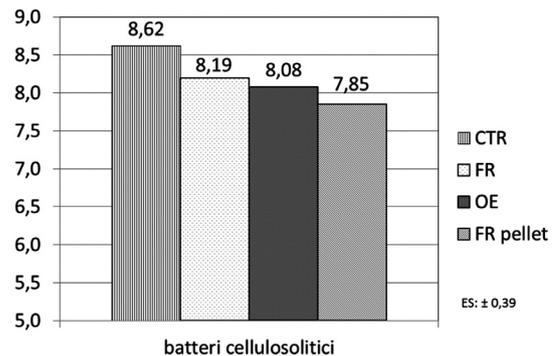
**INTRODUZIONE** - L'interesse crescente verso l'utilizzo di fitoderivati scaturisce dal Regolamento CE 1831/2003 che ha posto il divieto di utilizzo di antibiotici promotori della crescita nei mangimi destinati agli animali da reddito. Una serie di fitoderivati si è dimostrata in grado di modulare le fermentazioni ruminali (Benchaar et al., 2008; Newbold et al., 2004). Il Rosmarino (*Rosmarinus officinalis*) esplica attività antiossidante, antimutagena, antibatterica e chemioprotettiva (Ibañez, 2003; Cuvelier, 1996). Questa sperimentazione ha avuto come obiettivo la valutazione dell'eventuale effetto modulatore dei componenti bioattivi presenti nelle foglie e nell'olio essenziale di rosmarino (canfora, 1-8 cineolo,  $\alpha$ -pinene, borneolo, triterpeni, tannini, steroli e composti fenolici) sulla popolazione batterica e sul pH ruminale dell'ovino.

**MATERIALI E METODI** - Per la sperimentazione sono state utilizzate quattro pecore di razza Bergamasca x Appenninica provviste di fistola ruminale, alimentate con una razione a base di fieno di erba medica (1,5 kg/capo/die) fornito in due pasti giornalieri. È stato utilizzato un protocollo sperimentale a quadrato latino 4x4 che ha previsto la somministrazione di quattro diversi mangimi (PG: 18,4%; NDF: 29,7%), isoenergetici ed iso-proteici, alla dose di 400 g/capo/die: 1) mangime controllo pellettato (CTR); 2) mangime CTR addizionato dopo pellettatura di foglie di rosmarino (2,50%) essiccate e macinate (FR); 3) mangime CTR addizionato dopo pellettatura di olio essenziale di rosmarino (1,75%) adsorbito su un supporto inerte (OE); 4) mangime CTR contenente foglie di rosmarino (2,50%) essiccate e macinate introdotte nella miscela prima della pellettatura (FR pellet). Al termine del periodo di adattamento pari a 14 giorni, da ciascuna pecora fistolata è stato prelevato del contenuto ruminale *in toto* utilizzato, in condizioni di anaerobiosi, per la coltivazione su terreni liquidi della popolazione batterica ruminale totale e delle sotto-popolazioni a prevalente attività amilolitica e cellulolitica presenti. La crescita batterica è stata stimata mediante la tecnica del *Most Probable Number* (MPN) descritta Dehority et al. (1989). Al momento del prelievo, è stato determinato il pH del contenuto ruminale *in toto* e del liquido ruminale (ottenuto per filtrazione su garza). I dati ottenuti sono stati analizzati mediante procedura GLM del software SAS (2001) utilizzando un modello per misurazioni ripetute.

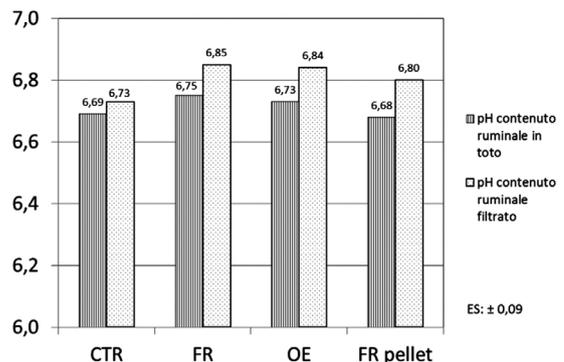
**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La stima della popolazione batterica ruminale non ha evidenziato differenze significative in dipendenza dalla tipologia di mangime utilizzato. Nel caso dei batteri cellulolitici, è stato possibile notare un minore sviluppo, rispetto al gruppo CTR, in tutti i trattamenti, ed in particolare nella dieta FR pellet (Fig. 1). La disponibilità dei componenti bioattivi e quindi le proprietà antimicrobiche del rosmarino potrebbero essere state condizionate dal trattamento termico e meccanico subito dal fitoderivato durante la pellettatura. Per quanto concerne l'andamento del pH (Fig. 2), l'integrazione del mangime con *R. officinalis* sembrerebbe essere collegata ad un tendenziale aumento dei suoi valori, in particolare nel caso del contenuto ruminale ottenuto per filtrazione su garza.

**CONCLUSIONI** - I principi attivi del *R. officinalis* non sembrano influenzare negativamente la funzionalità delle popolazioni batteriche ruminali ed in generale quella dell'ecosistema ruminale. L'assenza di effetti negativi permetterebbe di impiegare il rosmarino nel razionamento dei ruminanti anche a concentrazioni elevate, quali quelle oggetto della presente sperimentazione.

*Sperimentazione effettuata nell'ambito del progetto di ricerca "Effetto di una dieta integrata con fitoderivati sulle caratteristiche microbiologiche, qualitative e nutraceutiche di latte e di formaggi ovini" (IZS UM RC 004/09).*



**Figura 1** - Variazione della popolazione microbica a prevalente attività cellulolitica (espressa in log<sub>10</sub>) in dipendenza dal tipo di mangime somministrato.



**Figura 2** - Variazione del valore di pH del contenuto ruminale *in toto* e ottenuto per filtrazione su garza in dipendenza dal tipo di mangime somministrato.

## ■ *Rosmarinus officinalis* in the diet of sheep: effects on ruminal pH and ruminal bacterial population

**Key words:** *Rosmarinus officinalis*, ruminal bacteria, pellet, sheep.

## Bibliografia

- Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A., Beauchemin K.A. (2008), A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Anim. Feed Sci. Technol.*; 145: 209-228.
- Cuvelier M.E., Richard H., Berset C. (1996), Antioxidative activity and phenolic composition of pilot-plant and commercial extracts of sage and rosemary. *J Am Oil Chem*; 73: 645-652.
- Dehority B.A., Tirabasso P.A., Grifo A.P. (1989), MPN procedures for enumerating ruminal bacteria, including the simultaneous estimation of total and cellulolytic numbers in one medium. *Appl. Environ. Microbiol.*; 55: 2789-2792.
- Ibañez E. (2003), *J Agric Food Chem.*; 51: 375-382.
- Newbold C.J., McIntosh F.M., Williams P., Losa R., Wallace R. J. (2004), Effects of a specific blend of essential oil compounds on rumen fermentation. *Anim. Feed Sci. Technol.*; 114: 105-112.
- SAS Institute Inc. (2001), version 8.2. SAS Institute Inc., Cary, NC.

# Impianto di melatonina nell'ariete: studio ecografico testicoli e ghiandole accessorie



A. SPEZZIGU<sup>1</sup>, F. BERLINGUER<sup>2</sup>, S. MUNTONI<sup>3</sup>, D. BIZZARRI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Veterinario libero professionista, PhD, Perfugas (SS)

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli studi di Sassari, Sassari

<sup>3</sup> CEVA Salute Animale, Agrate Brianza (MB)

**Parole chiave:** melatonina, ariete, ultrasonografia.

La melatonina, molecola molto diffusa in natura, è presente nei batteri, negli organismi unicellulari eucarioti, nelle macroalghe, in molte piante e in molte specie di invertebrati e vertebrati. La melatonina svolge diverse azioni fisiologiche segnalando all'organismo non solo il momento del giorno e dell'anno, ma sviluppando anche un'azione citoprotettiva come antiossidante, svolge inoltre azioni antioncotica, immunomodulatrice, ipnotica e antidepressiva, interviene sul metabolismo osseo e nelle affezioni cardiovascolari e infine sulla maturazione sessuale e sulla regolazione dell'attività riproduttiva. La sintesi avviene a livello della ghiandola pineale mediante un'attività ritmica circadiana con un alto livello durante la notte e un basso livello diurno. Il successo riproduttivo di molte specie animali è garantito dall'andamento sincrono tra attività sessuale e le variazioni climatiche stagionali. Tale andamento dei processi riproduttivi fa sì che il parto e la crescita dei piccoli avvenga in un periodo dell'anno, solitamente in primavera, quando le temperature ambientali e la disponibilità del cibo sono ottimali sia per la vita del neonato che per la produzione latte della madre. Una delle principali caratteristiche della riproduzione ovi-caprina è la stagionalità, infatti, la pecora e la capra sono delle specie poliestruali stagionali che alternano periodi di anaestrosia a quelli di attività sessuale. Nelle regioni temperate, come già asserito, la stagionalità è regolata dal fotoperiodo, ossia dalla durata delle ore di luce nell'ambito della giornata. Riducendo le ore di luce si stimola l'attività sessuale mentre aumentando le ore di luce, si induce l'anaestrosia. I piccoli ruminanti vengono quindi definiti come specie a fotoperiodo decrescente oppure col termine anglosassone di *short day breeders*. Nel presente studio, condotto in arieti di razza sarda, sono stati valutati gli effetti della somministrazione esogena di 3 impianti di melatonina da 18 mg a lento rilascio non solo sul diametro testicolare e sulla circonferenza scrotale, ma anche sulle dimensioni espresse in superficie dalle ghiandole sessuali accessorie, ossia le *Ghiandole Bulbo Uretrali (Cowper's glands)* e le *Ghiandole Vescicolari*. Sono stati utilizzati 37 arieti di razza sarda provenienti da tre diversi allevamenti del nord Sardegna posizionati tutti e tre alla stessa latitudine (circa 40° Nord). Tali allevamenti presentavano un buono e moderno *management*. Gli arieti avevano un'età compresa tra 1,5 e 8 anni. Una parte di questi arieti (21 capi) sono stati trattati con 3 impianti sottocutanei di melatonina a lento rilascio da 18 mg (MELOVINE, Ceva Salute Animale) mentre la restante parte (16 capi) non ha subito alcun trattamento (controlli). La selezione degli arieti è stata effettuata dopo un iniziale *screening* ecografico volto a valutare l'integrità dell'apparato genitale maschile e delle relative ghiandole accessorie, in modo da inserire nei due gruppi solo animali privi di patologie. Il protocollo di studio prevedeva l'esecuzione di tre controlli ecografici degli arieti: il primo controllo è stato effettuato il giorno dell'impianto di melatonina, il secondo con-

trollo a metà del trattamento (in media a 26 giorni dall'impianto), il terzo e ultimo controllo ecografico il giorno dell'inserimento degli arieti nel gregge (ossia in media a 46 giorni dall'inizio del trattamento). Nel corso di ognuna delle tre visite effettuate sugli arieti i parametri presi in considerazione durante l'esame ultrasonografico sono stati: diametro testicolare, area delle ghiandole bulbo-uretrali, area delle vescichette seminali. Allo stesso tempo, utilizzando un metro morbido, è stata misurata la circonferenza scrotale. I dati raccolti dai 37 arieti sono stati raggruppati in tre classi di età ed ovviamente suddivisi in due gruppi, il gruppo trattato con melatonina (MEL, n=21) e il gruppo controllo non trattato (CTR, n=16). Gli arieti più giovani presentavano nel complesso dimensioni testicolari significativamente inferiori (diametro testicolare medio 4,4 cm e circonferenza scrotale 30,9 cm) rispetto alle classi di arieti adulti (arieti tra 2,5-3,5 anni: diametro testicolare medio 5,4 cm; circonferenza scrotale 35,6 cm; arieti maggiori di 4 anni: diametro testicolare medio 5,6 cm; circonferenza scrotale 37 cm; p<0.001) i quali ultimi presentavano invece delle dimensioni non significativamente differenti. Riguardo alla superficie delle ghiandole accessorie invece, sono state registrate differenze significative tra tutte le classi di età prese in considerazione. Infatti, le dimensioni di queste ghiandole sono risultate positivamente correlate all'età degli arieti, essendo quindi maggiori negli animali più vecchi. I dati conseguiti durante i tre controlli ecografici effettuati a inizio (giorno 0), metà (giorno 26) e fine trattamento (giorno 46) sono descritti nella tabella 1.

Sulla base dei risultati ottenuti risulta evidente che i soggetti trattati con i tre impianti di melatonina hanno presentato un incremento decisamente maggiore di tutti i parametri considerati nella presente sperimentazione.

## ■ Melatonin implant in ram: echografic evaluation of testis and accessory glands

**Key words:** melatonin, ram, ultrasonography.

## Bibliografia

- Barrell GK, Thrun LA, Brown ME, Viguie C e Karsch FJ (2000) Importance of photoperiodic signal quality to entrainment of the circannual reproductive rhythm of the Ewe. *BiolReprod*63, 769-774.
- Arendt J, Symons AM, Laud C, Pryde SJ. Melatonin can induce early onset of the breeding season in ewes. *J Endocrinol*1983;97:395-400.
- Chemineau P, Malpoux B, Delgadillo JA, Guérin Y, RavaultJP, Thimonier J, et al. Control of sheep and goat reproduction: use of light and melatonin. *AnimReprodSci* 1992;30:157-84.

**Tabella 1** - Media delle misurazioni della circonferenza scrotale, diametro testicolare e superficie delle ghiandole bulbo uretrali e delle vescichette seminali degli arieti trattati (MEL) o meno (CTR) con n° 3 impianti sottocutanei di melatonina al giorno 0 (data dell'impianto), giorno 26 (metà trattamento) e giorno 46 (inserimento arieti nel gregge).

gg	Circonferenza scrotale (cm)		Φ testicoli (cm)		Area Gh Bulbo U. (cm <sup>2</sup> )		Area Vescichette s (cm <sup>2</sup> )	
	CTR	MEL	CTR	MEL	CTR	MEL	CTR	MEL
0	34,35	33,33	5,11	4,92	1,37	1,37	3,35	3,02
26	34,22	34,40	5,20	5,22	1,48	1,58	3,65	3,74
46	35,31	36,02	5,48	5,63	1,61	1,82	4,09	4,45

# Linfoma ovino: descrizione di 9 casi



E. LEPRI<sup>1</sup>, G. FILIPPINI<sup>2</sup>, S. PAVONE<sup>2</sup>, N. D'AVINO<sup>2</sup>, S. SALAMIDA<sup>2</sup>, G. VITELLOZZI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento Scienze Biopatologiche Veterinarie ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** ovino, tumore, linfoma, immunoistochimica.

**INTRODUZIONE** - Il linfoma ovino è un tumore raro, la cui incidenza varia molto nelle diverse aree geografiche: in USA sono segnalati 0.5 casi ogni 100.000 animali, 21 in UK e 46 in Nuova Zelanda, ed esso si riscontra nel 21-41% dei sequestri di pecore macellate in UK e USA<sup>1</sup>. L'eziologia del linfoma ovino non è nota; l'ovino è sensibile all'infezione, sia spontanea che sperimentale, con virus della leucosi bovina (BLV), ed il ruolo patogenetico di tale virus nella specie ovina è stato dimostrato sperimentalmente. Il BLV infatti è in grado di indurre nell'ovino, dopo un periodo di incubazione relativamente breve, linfomi che presentano analogie anatomiche, istologiche e fenotipiche con il linfoma indotto da BLV nel bovino<sup>2</sup>. La maggior parte dei dati riportati in letteratura sono relativi al linfoma sperimentale da BLV, e rare sono le descrizioni di forme spontanee. Scopo della presente nota è descrivere gli aspetti anatomoistopatologici di 9 casi di linfoma ovino.

**MATERIALI E METODI** - Nove casi di linfoma ovino provenienti dagli archivi del materiale patologico del Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari della facoltà di Medicina Veterinaria di Perugia e dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Perugia sono stati revisionati retrospettivamente. Di ciascun tumore sono state annotate forma anatomica, tipo e grado istologico e, quando possibile, immunofenotipo con indagini immunoistochimiche (IHC) effettuate mediante l'utilizzo di anticorpi specifici nei confronti di CD20 (pan-B) e CD3 (pan-T).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Sono stati individuati 9 linfomi; di 8 era disponibile in archivio materiale patologico adeguato per poter effettuare indagini IHC. Tre dei soggetti erano stati regolarmente macellati, mentre i restanti 6 morti spontaneamente o sacrificati e successivamente sottoposti a necropsopia completa. Il lasso di tempo durante il quale i casi sono stati collezionati è molto ampio; per i casi provenienti dall'IZS esso è limitato agli ultimi 7 anni (2005-2011), periodo in cui sono stati osservati 5 linfomi su un totale di circa 1200 accettazioni di materiale patologico ovino (organi o carcasse). La forma anatomica dei linfomi osservati era riferibile in 3 casi a forma multicentrica con coinvolgimento linfonodale sistemico, in 5 casi a forma "di organo isolato" (fegato in 2 casi, milza, rene e timo/mediastino in un caso ciascuno), mentre in un caso non fu evidenziata alla necropsopia alcuna massa neoplastica ma soltanto epatosplenomegalia; il successivo esame istologico dimostrò tuttavia una diffusa infiltrazione linfomatosa a crescita prevalentemente intravascolare (linfoma intravascolare). Nei casi di linfoma multicentrico i linfonodi risultavano uniformemente aumentati di volume, con aspetto omogeneo biancastro lardaceo; erano coinvolti i linfonodi esplorabili (prescapolari, precurali e mandibolari) ed i viscerali (mediastinici e mesenterici); fegato e milza apparivano aumentati di volume in maniera omogenea. Istologicamente era evidente un'infiltrazione, prevalentemente perivascolare, di tutti gli organi, verosimilmente testimone di una sottostante condizione leucemica. Nei casi di coinvolgimento di organo isolato, il parenchima coinvolto dalla neoplasia appariva tempestato di noduli biancastri confluenti omogenei di dimensioni variabili (0,5-5 cm), senza coinvolgimento macroscopico

di altri organi; all'esame istologico tuttavia infiltrazioni linfomatose erano evidenti anche in altri organi. Istologicamente soltanto 8/9 tumori sono stati disponibili per la revisione: di questi 3 erano formati da cellule da piccole a medio-piccole dimensioni (diametro nucleare < diametro di 2 globuli rossi), mentre i restanti 5 tumori da cellule medio-grandi (diametro nucleare > 2 globuli rossi); il grado del tumore, valutato sulla base della evidenza di figure mitotiche (basso grado < 2 figure mitotiche / hpf, alto grado > 2 / hpf), risultava alto in 5 casi e basso in 3. L'immunofenotipo è stato valutato in 8 casi ed è risultato riferibile a linfoma B in 5 casi e linfoma T in 3 casi. Le nostre osservazioni non si discostano dalle scarse descrizioni di linfoma spontaneo riportate in letteratura<sup>3</sup>. In bibliografia la forma multicentrica viene considerata più comune e prevalentemente T cellulare, mentre meno comuni sono la forma alimentare e isolata, entrambe di prevalente fenotipo B<sup>4</sup>. Nella nostra casistica dominano le forme isolate con fenotipo misto (T per le forme timica, splenica e intravascolare, B per le forme epatiche), seguite dalle forme multicentriche, tutte a fenotipo B; il linfoma renale non è risultato disponibile per valutazioni immunoistochimiche. La mancata osservazione di forme alimentari potrebbe dipendere dalla scarsa attenzione riservata al macello per l'apparato gastroenterico degli animali regolarmente macellati, che quindi potrebbe precluderne l'osservazione. I caratteri istopatologici ed immunoistochimici osservati in molti casi sono simili a quelli riportati per i linfomi ovis e bovini indotti da BLV (linfomi multicentrici, spesso leucemici, a fenotipo B). Il coinvolgimento del virus BLV non è stato adeguatamente indagato nel linfoma ovino spontaneo, e solo un precedente lavoro riporta la mancata evidenziazione con microscopia elettronica di particelle riferibili a virus nelle cellule neoplastiche<sup>3</sup>; tuttavia, alla luce delle moderne indagini diagnostiche biomolecolari disponibili, riteniamo che tale possibilità debba essere più accuratamente considerata.

**CONCLUSIONI** - I dati qui riportati sono relativi a materiale patologico o animali inoltrati al servizio diagnostico dell'Università o dell'IZS, e non già di patologie spontaneamente osservate sul territorio, quindi sicuramente non fedeli della reale situazione e frequenza della patologia nel territorio nazionale, che resta ancora non determinata. Riteniamo quindi che il linfoma ovino rappresenti una patologia sottostimata che meriterebbe maggiore attenzione.

## ■ Ovine lymphoma: description of 9 cases

**Key words:** ovine, tumor, lymphoma, immunohistochemistry.

## Bibliografia

1. Meuten DJ. (2005), Tumors in Domestic Animals: 119-198.
2. Djilali S, Parodi AL, Levy D, and Cockerell GL. (1987), *Leukemia* 1: 777-781.
3. Johnstone AC and Manktelow BW. (1978), *Vet Pathol*; 15: 301.
4. Dixon RJ, Moriarty KM, Johnstone AC. (1984), *J Comp Pathol*; 94:107-113.

# Aborti da zearalenone in un allevamento ovino siciliano



A. CICERO<sup>1</sup>, G. GIANGROSSO<sup>1</sup>, V. CURRÒ<sup>1</sup>, C. MALARA<sup>2</sup>, A. VELLA<sup>1</sup>, V. FERRANTELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo

<sup>2</sup> Medico veterinario LP

**Parole chiave:** zearalenone, intossicazione, ELISA.

**INTRODUZIONE** - Lo Zearalenone (ZEA) è una micotossina con attività simil-estrogenica prodotta da una varietà di funghi del genere *Fusarium* di cui i più comuni sono: *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. Cerealis*, *F. equiseti*, e *F. crookwellense semitectum*. Sono funghi terrestri comunemente presenti nei paesi temperati e caldi ed altrettanto comunemente contaminanti di cereali in tutto il mondo<sup>1</sup>. Lo Zearalenone (ZEA), latrone dell'acido resorcilico, viene chimicamente descritto come 6 - [10-idrossi-6-oxo-trans-1-undecenil]-B-resorcyclic acido lattone (Fig. 1). I funghi produttori di ZEA contaminano mais e in misura minore, orzo, avena, frumento, sorgo, miglio e riso anche se, in particolari condizioni climatiche, si possono verificare elevate infestazioni in cereali di campo.

Il rischio tossicologico per gli animali è legato all'assunzione della tossina con l'alimento.

Lo ZEA ha dimostrato di possedere una notevole attività estrogenica soprattutto nei monogastrici<sup>2</sup> mentre molto limitate sono le segnalazioni di interferenze con il ciclo estrale nei ruminanti<sup>3,4</sup> anche se a livelli elevati, 1 mg/Kg di foraggio<sup>5</sup>, è risultato tossico negli ovini.

I sintomi più comunemente associati alla presenza di ZEA sono aborto, cicli estrali abbreviati, ninfomania, calo della fertilità, vaginiti e anomalo ingrossamento della mammella. Questo lavoro riporta un episodio di intossicazione da Zearalenone che ha interessato un allevamento ovino sito del territorio siciliano.

**MATERIALI E METODI** - Il gregge di circa 300 capi comprendeva animali in lattazione, in asciutta e agnelli allevati a stabulazione libera per l'intero periodo dell'anno. Il proprietario riferiva che, nella settimana precedente 18 pecore avevano abortito senza manifestare particolare sintomatologia. Al momento della visita in allevamento 4 pecore avevano abortito la notte precedente; il quadro era caratterizzato da edema vulvare, e mammario e scolo vaginale. Ipotizzando una causa infettiva sono stati prelevati tamponi vaginali, sangue, latte, urine e frammenti di placenta. Venivano inoltre prelevati campioni di foraggio direttamente dal pascolo. I campioni venivano conferiti ai laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia dove è stata condotta una indagine per la ricerca dei più comuni agenti infettivi (*Brucella*, *Chlamidia*, *Leptospira*, *Neospora*, *Toxoplasma* ecc.) causa di aborto, e conferiti ai laboratori dell'Area di Chimica e Tecnologie Alimentari per la ri-

cerca di tossici. Tale scelta è stata dettata dal fatto che gli animali avevano nell'ultimo mese cambiato il pascolo ed in particolare si alimentavano in un campo coltivato ad orzo. La stagione precedente era stata molto piovosa nei mesi di maggio, giugno e luglio e quindi nel pascolo in questione era residuo dopo la trebbiatura dell'alimento andato incontro ad ammassamento. La tecnica utilizzata è un'E.L.I.S.A. diretta (Europroxima) per l'analisi dei campioni di foraggio ed urine.

Il metodo utilizzato per la ricerca di zearalenone e suoi metaboliti, ha capacità di rilevazione di 2 µg/l per le urine e 100 µg/Kg per il foraggio. 50 µl di soluzione standard dei campioni precedentemente preparati sono stati aggiunti nei pozzetti della micropiastra a 96 pozzetti precedentemente adsorbita con anticorpi anti-zearalenone e quindi incubati a temperatura ambiente per 30 minuti per le urine e 37°C per 1 ora per il foraggio. Al termine dell'incubazione, viene eliminato l'aspecifico legato nei pozzetti con lavaggio con opportuno tampone e successivamente viene aggiunta a ciascun pozzetto la soluzione di sviluppo. Infine, dopo l'aggiunta del reagente di arresto, viene misurata l'assorbanza a 450 e 405 nm rispettivamente per il foraggio e l'urina tramite lettore spettrofotometrico (Thermo, Multy Scan Ascent) da cui si ricava, in seguito a confronto con una curva di calibrazione, la concentrazione dell'analita.

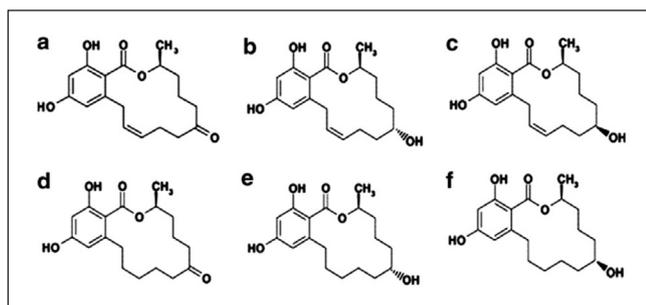
**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La ricerca di agenti biologici causa di aborto ha dato esito negativo, i campioni di foraggio sono risultati positivi allo Zearalenone, mentre i campioni di urine hanno dato esito positivo per i metaboliti dello stesso ( $\alpha$  e  $\beta$ ). La ricerca di altre micotossine ha dato esito negativo.

**CONCLUSIONI** - Non è di raro riscontro negli alimenti inquinati da ZEA la copresenza di più di una micotossina, o metaboliti delle stesse. Nel caso specifico dello zearalenone la trasformazione della tossina a zearalenolo (alfa e beta zearalenolo) può avvenire direttamente ad opera dei protozoi ruminali<sup>6</sup>, mentre i batteri sembrerebbero non partecipare a tale processo.

La sintomatologia abortiva nel nostro caso potrebbe essere stata frutto dell'azione sinergica di più metaboliti attivi che agendo a livello epatico possono modificare la risposta di detossificazione nei confronti della singola micotossina. Una volta cambiato il pascolo gli animali non hanno più manifestato sintomatologia abortiva.

## ■ Zearalenone abortion in a Sicilian sheep farm

**Key words:** zearalenone, intoxication, ELISA.



**Figura 1** - Struttura chimica dello ZEA e dei suoi derivati: (a) zearalenone (ZEA), (b)  $\alpha$ -zearalenone (a-ZEA), (c)  $\beta$ -zearalenone (b-ZEA), (d) zearalanone (ZAN), (e) a-zearalanol (a-ZAL) and (f) b-zearalanol (b-ZAL).

## Bibliografia

- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497-516.
- Sundlof, S.F. and C. Strickland. 1986. *Vet. Hum. Toxicol.* 28:242.
- Kellela, K. and E. Ettala. 1984. *Nord. Vet. Med.* 36:305.
- Sprosen, J.M. And N.R. Towers. 1995. Urinary zearalenone metabolite concentrations in herds with fertility problems. In: *Toxinology and Food Safety*. Toxinology and Food Safety Research Group, Ruakura Research Centre, Hamilton, New Zealand.
- Hagler W. M. Jr., N.R. Towers, C.J. Mirocha, R.M. Eppley and W.L. Bryden. Pp. 321-331. In *Memorial Symposium*. APS Press, St Paul, Minnesota.
- Karl-Heinz Kiessling, Hans Pettersson, Kerstin Sandholm, and Monica Olsen, 1984 *Appl. Env. Micr.* 47(5):1070-73.

# Milk Amyloid A: utilizzo nella diagnosi della mastite subclinica nelle pecore



L. MOSCATI\*, A. MIGLIO\*\*, A. ANTOLINI\*, G. FRUGANTI\*\*, M. PELA\*, E. SCOCCIA\*, C. MARESCA\*

\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

\*\* Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria - Sezione di Medicina Interna - Università degli Studi di Perugia

**Parole chiave:** pecore da latte, immunità innata, stato ossidativo.

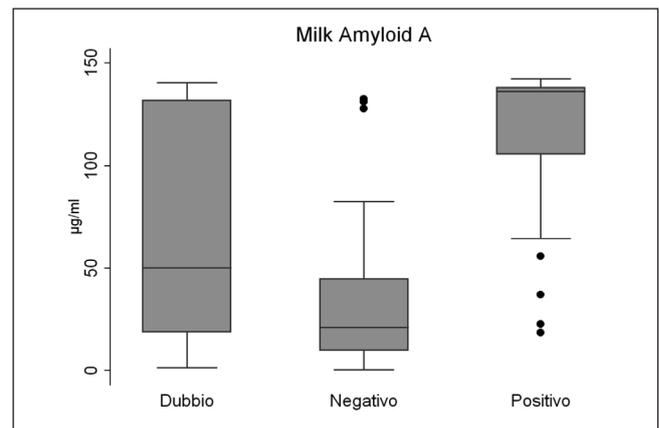
**INTRODUZIONE** - La mastite è una delle più importanti patologie a carico della mammella. Pecore con mastiti cliniche sono facilmente individuabili mediante ispezione e palpazione dei capezzoli e della mammella mentre gli animali con mastite subclinica (SM), spesso non vengono trattati, perché la malattia non è clinicamente individuabile. È pertanto necessario, l'uso di test di laboratorio per individuare questa patologia e per limitarne la diffusione nel gregge. La mammella di pecora con SM è clinicamente sana, ma il latte presenta un aumento delle cellule somatiche (SCC > 500.000 cellule/ml) e presenza di germi mastidogeni, mentre il solo aumento di SCC o l'isolamento di germi mastidogeni sono indicativi di un dubbio (DM) (Albenzio et al. 2002, Bergonier et al. 2003). L'alta incidenza e la prevalenza della forma subclinica della mastite in greggi ovinie influisce sulla resa e la qualità del latte con un impatto negativo sulla salute degli animali, il reddito degli allevatori e la salute pubblica (Kiossis et al. 2007). Tuttavia, SCC e l'esame batteriologico sono costosi, anche in termini di tempo e non sono di utilizzo routinario (McDougall et al. 2001). In questo lavoro sono stati confrontati i metodi classici di diagnosi di mastite subclinica (ispezione e palpazione della mammella, esame cito-batteriologico del secreto mammario) con una tecnica innovativa non invasiva, come la determinazione di marker dell'infiammazione della ghiandola mammaria. Abbiamo scelto, come marker di un processo infiammatorio, la proteina di fase acuta Milk Amyloid A (MAA) che viene prodotta esclusivamente dal tessuto mammario (Peterson et al. 2004).

**MATERIALI E METODI** - Sono state prese in considerazione 77 pecore di razza Lacaune, di età compresa tra 2 e 6 anni, clinicamente sane a metà lattazione (mesi di lattazione dal terzo al settimo). Sono stati effettuati prelievi di latte da ogni emimammella per un totale di 154 campioni. I prelievi sono stati fatti all'inizio della mungitura del mattino utilizzando contenitori di plastica sterili. I campioni di latte sono stati refrigerati e, entro 2 ore dal prelievo, sottoposti ad esame batteriologico e SCC. Un'aliquota è stata conservata a -80 °C fino al momento del test eseguito utilizzando un kit commerciale (Tridelta Development Ltd Maynooth, Ireland.). Le emimammelle sono state classificate in tre gruppi: sane, con mastite subclinica e con mastite subclinica dubbia (Albenzio et al. 2002, Bergonier et al. 2003). L'emimammella è stata definita SM a seguito di un esame batteriologico positivo (presenza di germi mastidogeni) e aumento di SCC nel latte (SCC > 500.000 cellule/ml). L'emimammella è stata definita DM a seguito o della presenza di SCC > a 500.000 cellule/ml o ad un esame batteriologico positivo in linea con quanto segnalato in letteratura (Kiossis et al 2007, Bergonier et al 2003). L'emimammella è stata definita sana a seguito di un esame batteriologico negativo e di SCC ≤ a 500.000 cellule/ml nel latte. Sono stati calcolati gli indici di dispersione per gli esiti di SM ed i rispettivi intervalli di confidenza al 95% (IC 95%), inoltre è stata valutata la normalità dei dati con il test di Shapiro-Wilk. Attraverso l'ANOVA è stata analizzata la differenza tra i vari esiti di mastite subclinica (Negativo, Dubbio, Positivo) considerando significativo un p-value ≤ 0,05 e con il test di Bonferroni si è andati a valutare la differenza tra ogni coppia di esiti. Tutte le analisi statistiche sono state effettuate con il software Stata 11.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Sono stati ottenuti dati da 153 campioni di latte poiché in uno non è stato possibile determinare SCC. La SM è stata riscontrata in 25 emimammelle e sono stati isolati i seguenti agenti patogeni: Stafilococchi coagulasi negativi (*Staphylococcus epidermidis* e *S. chromogenes*), *S. aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus uberis*. Le emimammelle con DM sono state 40. Nella nostra indagine la prevalenza complessiva di emimammella con SM è stata 16,34%. Dai risultati della MAA sono stati calcolati media, deviazione standard ed IC 95% (Tab. 1 e Fig. 1). I valori della MAA non essendo distribuiti normalmente

**Tabella 1** - Indice di dispersione ed intervalli di riferimento per esito di mastite.

Milk Amyloid A µg/ml	Media±SD	SE	Min	Max	IC 95%
Negativo	29,68±27,98	2,98	0,48	132,58	23,75-35,61
Dubbio	68,32±53,56	8,47	1,39	140,56	51,19-85,45
Positivo	114,37±41,14	8,23	18,41	142,43	97,39-131,35



**Figura 1** - Boxplot per esito mastite subclinica.

hanno reso necessaria una trasformazione logaritmica. L'ANOVA ha mostrato una differenza statisticamente significativa ( $p \leq 0,05$ ) tra i tre gruppi: negativo, DM, SM. Applicando il test di Bonferroni anche la differenza tra ogni coppia di esiti è risultata significativa ( $p \leq 0,05$ ).

**CONCLUSIONI** - I dati ottenuti suggeriscono che la Milk Amyloid A possa essere un potenziale marcatore della SM negli ovinie.

## ■ Milk Amyloid A: use in the diagnosis of subclinical mastitis in dairy sheep

**Key words:** milk Amyloid A, subclinical mastitis, dairy ewes.

## Bibliografia

- Albenzio M, Taibi L, Muscio A, Sevi A 2002 Prevalence and etiology of subclinical mastitis in intensively managed flocks and related changes in the yield and quality of ewe milk. *Small Ruminant Research* 43 219-226.
- Bergonier D, De Cremoux R, Rupp R, Lagriffoul G, Berthelot X 2003 Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34 689-716.
- Kiossis E, Brozos CN, Petridou E, Boscos C 2007 Program for the control of subclinical mastitis in dairy Chios breed ewes during lactation. *Small Ruminant Research* 73 194-199.
- McDougall SM, Murdough P, Pankey W, Delaney C, Barlow J, Scruton D 2001 Relationships among somatic cell count, California mastitis test, impedance and bacteriological status of milk in goats and sheep in early lactation. *Small Ruminant Research*. 40 245-254.
- Petersen HH, Nielsen JP, Heegaard PMH 2004 Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*. 35 163-187.

# Il piano di controllo/eradicazione per l'agalassia contagiosa in Provincia di Trento



D. DELLAMARIA<sup>1</sup>, E. FRANCIONE<sup>1</sup>, R. LUCCHINI<sup>1</sup>, S. PATERNOLLI<sup>1</sup>, F. GOBBO<sup>1</sup>, S. CATANIA<sup>1</sup>, R.A.J. NICHOLAS<sup>4</sup>, C. COSTANZI<sup>2</sup>, F. CHIN<sup>3</sup>, G. MINGHETTI<sup>5</sup>, G. FARINA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

<sup>2</sup> Assessorato alla Salute e politiche sociali della Provincia Autonoma di Trento

<sup>3</sup> Dipartimento di Igiene e Sanità pubblica veterinaria, Azienda Sanitaria di Trento

<sup>4</sup> Animal Health and Veterinary Laboratories Agency (Weybridge), New Haw, Addlestone Surrey, KT15 3NB UK

<sup>5</sup> Fondazione Edmund Mach - Centro Trasferimento Tecnologico

**Parole chiave:** agalassia contagiosa, eradicazione, Trento.

**INTRODUZIONE** - L'infezione causata da *Mycoplasma agalactiae* (*M. agalactiae*), è denunciabile ai sensi del Regolamento di Polizia Veterinaria; la Provincia di Trento, a partire dal 2010, ha attivato un piano di controllo obbligatorio finalizzato all'eradicazione dell'agalassia contagiosa<sup>1</sup>. Il presente lavoro illustra i punti cardine sui quali si basa tale piano e i risultati ottenuti durante i primi due anni di attuazione dello stesso.

**MATERIALI E METODI** - A seguito di un vasto focolaio verificatosi in una malga del Trentino nell'estate del 2010, si è reso necessario predisporre un piano obbligatorio finalizzato all'eradicazione della agalassia negli allevamenti di soli caprini e negli allevamenti misti con prevalenza di caprini sugli ovini. Esso prevede: controlli clinici in azienda, esami sierologici/ricerca diretta di *M. agalactiae* (Tab. 1), eliminazione dei capi positivi in caso di focolaio conclamato, disinfezione dell'azienda, controllo delle compravendite, indennizzo agli allevatori, eventuale acquisizione di *status* di allevamento indenne o ufficialmente indenne.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Il piano di controllo/eradicazione della malattia trova giustificazione in un territorio come la provincia di Trento dove l'infezione da *M. agalactiae* presenta una bassa prevalenza (Tab. 2). Tra gli animali sieropositivi della Tabella 2 una piccola percentuale risultava vaccinata, per cui il dato sovrastima la prevalenza sierologica. Nel 2012 si ha una diminuzione degli allevamenti positivi sebbene si siano verificate alcune recidive in focolai del 2011 tutti risanati. Inoltre i focolai di agalassia contagiosa si sono verificati sia in allevamenti vaccinati che in quelli non vaccinati. L'agalassia contagiosa è diffusa in Europa, Asia, USA e Nord Africa e, è considerata endemica nel bacino del Mediterraneo<sup>5</sup>. Anche in altre aree del Nord Italia, dove la malattia è presumibilmente meno diffusa rispetto alle regioni insulari e del sud, si sono attivati dei piani di controllo/eradicazione per tale malattia (provincia di Como, ASL Vallecambonica-Sebino - comunicazione agli autori). A differenza di quanto accade nelle aree endemiche dove normalmente la malattia si manifesta in forma blanda o subclinica<sup>5</sup>, negli allevamenti trentini si evidenziano ancora dei focolai con gravi e tipiche manifestazioni sintomatologiche. Ad oggi sono stati isolati solo ceppi di *M. agalactiae* e le analisi mediante VNTR hanno evidenziato che i ceppi del 2011 risultano appartenere al cluster 8 diffuso in Italia continentale, Sicilia, Spagna, Portogallo e Macedonia, a differenza dei ceppi isolati in Sardegna ed in Francia appartenenti al cluster 5<sup>4</sup>.

**CONCLUSIONI** - L'agalassia contagiosa è una patologia poco diffusa in Provincia di Trento ma non è raro evidenziare i sintomi tipici della malattia. Nel 2012 si è assistito alla diminuzione del numero di focolai anche se sono comparse recidive di infezione in allevamenti risanati l'anno precedente. A tal proposito, si ricordi che la strategia vaccinale ha lo scopo di controllare la sintomatologia clinica non tanto di impedire la circolazione del patogeno in allevamento. Al fine di contenere la prevalenza della malattia, occorre mantenere alta l'attenzione nell'applicazione delle misure di controllo dettate dal piano e occorre responsabilizzare l'allevatore nella gestione del gregge e nell'attuazione delle misure di biosicurezza in allevamento.

**Tabella 1**

	METODI	
	Screening	Conferma
Allevamenti vaccinati (matrici biologiche)	isolamento colturale (2)	Immunofluorescenza indiretta (2) DGGE (3) tipizzazione VNTR (4)
Allevamenti non vaccinati (siero di sangue)	<i>Mycoplasma agalactiae</i> Antibody Test Kit screeningIDEXX®	<i>Mycoplasma agalactiae</i> Antibody Test Kit VerificationIDEXX®

**Tabella 2**

	2011	2012
Allevamenti testati	771	654
Capi controllati	13261	9413
Allevamenti focolai	26 (3,3%)	15 (2,3%)
Capi Sieropositivi	477 (3,6%)	260 (2,8%)
Allevamenti vaccinati	15	15

Dalla sottotipizzazione genomica mediante VNTR si evince che i ceppi isolati in Trentino sono tutti appartenenti al cluster 8 evidenziando una omogeneità territoriale.

## Contagious agalactia eradication program in the Province of Trento

**Key words:** contagious agalactia, eradication, Trento.

## Bibliografia

1. Delibera Giunta Provinciale n. 2362 del 15/10/2010.
2. Manual OIE Terrestrial, 2008, chapter 2.3.5:482-96.
3. McAuliffe L., Ellis R.J., Lawes J.R., Ayling R.D., Nicholas R.A. (2005): "16S rDNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis a single generic test for detecting and differentiating *Mycoplasma* species"; *J Med Microbiol*, 54(Pt 8):731-9.
4. McAuliffe L., Churchward C.P., Lawes J.R., Loria G., Ayling R.D., Nicholas A.J. (2008): "VNTR analysis reveals unexpected genetic diversity within *Mycoplasma agalactiae*, the main causative agent of contagious agalactia"; *BMC Microbiology*, 8:193.
5. Corrales J.C., Esnal A., De la Fe C., Sanchez A., Assunção P., Poveda J.B., Contreras A. (2007): "Contagious agalactia in small ruminants"; *Small Ruminant Res*, 68:154-166.

# Screening della contaminazione da aflatossina M1 in latte crudo ovino per la produzione del "Piacentinu ennese"



G. GIANGROSSO<sup>1</sup>, A. VELLA<sup>1</sup>, A. CICERO<sup>3</sup>, C. MALARA<sup>2</sup>, A. MIGLIAZZO<sup>1</sup>, A. MACALUSO<sup>1</sup>, F. GRIPPI<sup>1</sup>, V. FERRANTELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" Palermo

<sup>2</sup> Medico veterinario LP

<sup>3</sup> Università degli studi di Messina

**Parole chiave:** aflatossina M1, Piacentinu Ennese, HPLC.

**INTRODUZIONE** - Il Piacentinu ennese è un formaggio a pasta compatta pressata ottenuto con latte ovino intero, crudo ad acidità naturale di fermentazione, prodotto dalle razze ovine autoctone siciliane Comisana, Pinzirita, Valle del Belice e loro meticcii nella provincia di Enna caratterizzato dall'aggiunta di zafferano e di grani di pepe nero. Il prodotto ha ricevuto nel 2011 il riconoscimento DOP a livello europeo. Nell'ambito del servizio di certificazione di prodotto, vengono eseguite numerose analisi per la verifica della conformità del prodotto e per la valutazione della qualità igienica e del rischio sanitario legato alla presenza di contaminanti chimici<sup>1</sup>. In un'ottica di controllo integrato di filiera, l'indagine qui brevemente introdotta ha avuto come obiettivo la correlazione tra metodo immunoenzimatico ELISA e metodo cromatografico HPLC/FLD per la ricerca dell'aflatossina M1 (AFM1), metabolita dell'aflatossina B1 prodotta da miceti del genere *Aspergillus* spp. parassiti dei mangimi e che, a seguito di escrezione da parte della ghiandola mammaria, si può ritrovare nel latte destinato alla caseificazione. Inoltre si vuole valutare l'eventuale presenza di aflatossina nel latte ovino utilizzato per la produzione di Piacentinu ennese.

**MATERIALI E METODI** - Le metodiche utilizzate per questo studio sono state l'HPLC-FLD e l'ELISA, nonostante la prima rappresenti la tecnica più accurata per la determinazione delle aflatossine, la seconda è stata utilizzata in quanto di più rapida esecuzione. Ai fini della preparazione del campione per l'HPLC con rivelazione fluorimetrica (FLD), è stata utilizzata la cromatografia di immunoaffinità (IAC) poiché è in grado di fornire una combinazione favorevole tra la fase di estrazione e le fasi di clean-up. Il latte, dopo una fase di riscaldamento a circa 37°C, è stato sottoposto a centrifugazione per separare lo strato di grasso e quindi filtrato e purificato con colonnine di immunoaffinità<sup>2</sup>. La fase successiva di determinazione è stata realizzata mediante sistema HPLC Agilent Technologies (Palo Alto, CA) Serie 1200, dotato di campionatore automatico e di rivelatore spettrofluorimetrico (365 nm EC - 435 nm EM). Come fase stazionaria è stata utilizzata una colonna Zorbax Eclipse XDB-C18 (Agilent, USA), 4,6 x 150 mm ed ID 5 µm e come fase mobile una miscela Acetonitrile/Acqua (25/75,v/v). Il flusso è stato mantenuto ad 1,0 ml/min determinando un tempo di ritenzione per l'aflatossina M1 pari a 6,34 min. Il test di screening per la determinazione di AFM1 nel latte è stato eseguito con il Kit ELISA "Immunoscreen AFLA M1" Tecna s.r.l. - Trieste - Italia. Il kit è basato sul principio del saggio immunoenzimatico competitivo diretto. In tutti i campioni analizzati il livello di aflatossina M1 è risultato inferiore al limite di rilevabilità del metodo<sup>3</sup>. La capacità di rilevazione del metodo è di 0,01 µg/L. L'unico pre-trattamento del campione consiste in una semplice sgrassatura del latte per centrifugazione. Il saggio viene effettuato su micropiastre di polistirene da 96 pozzetti precedentemente adsorbite con anticorpi anti-aflatossina M1. 100 µL di soluzione standard e dei campioni precedentemente sgrassati sono stati aggiunti nei pozzetti della micropiastre e quindi incubati a temperatura ambiente per 45 minuti. Al termine della incubazione, viene eliminato l'aspecifico legato nei pozzetti mediante lavaggio con opportuno tampone e successivamente vengono aggiunti a ciascun pozzetto 100 µL di coniugato enzimatico. Nuovamente viene effettuato il lavaggio dei pozzetti; scaricato il tampone di lavaggio, vengono aggiunti a ciascun pozzetto 100 µL di soluzione di sviluppo. Infine, dopo l'aggiunta in ogni pozzetto di 50 µL di reagente di arresto, è stata misurata l'assorbanza a 450 nm tramite lettore spettrofotometrico (Thermo, Multy Scan Ascent) da cui si ricava, mediante confronto con una curva di calibrazione, la concentrazione del campione<sup>4</sup>. Nella tabella 1 sono riportati i dati di validazione della metodica ELISA secondo la NORMA UNI/EN ISO 17025.

**Tabella 1** - Dati Validazione secondo la Norma UNI/EN ISO 17025.

Livello di fortificazione dell'Aflatossina M1 nel latte (µg/L)	CC (µg/L)	Ripetibilità (µg/Lg)	Incertezza estesa di misura (µg/L)	Campo di misura (µg/Lg)	Recupero %
0,01	0,01	0,003	0,002	da 0,005 a 0,25	100

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Da giugno 2011 a giugno 2012 sono stati analizzati 86 campioni di latte crudo ovino di razze Comisana, Pinzirita, Valle del Belice e loro meticcii provenienti dal comprensorio di produzione del Piacentinu ennese. Il limite di legge stabilito dalla Commissione Europea per l'aflatossina M1 nel latte è di 0.05 µg/Kg (ppb). Tutti i campioni sono stati sottoposti a screening con metodo ELISA per aflatossina M1 e circa il 18%, che erano risultati dubbi, sono stati sottoposti ad analisi di conferma con FLD-HPLC. In tutti i campioni analizzati il livello di aflatossina M1 è risultato inferiore al limite di rilevabilità del metodo. Quanto ottenuto permette di stabilire una correlazione accettabile tra la metodica immunoenzimatica e la metodica cromatografica visto che i campioni risultati dubbi alla prima metodica, sono stati comunque confermati dalla seconda. Prendendo in considerazione i fattori climatici dell'area di produzione del Piacentinu ennese, con temperatura media annua di circa 16°C (minima di 2°C e massima di 35°C) e piovosità media annua di 770 mm (inverno di 302 mm. ed estate di 22 mm) e il sistema di alimentazione degli ovini che è costituito principalmente dal pascolo naturale e/o coltivato, da foraggi freschi, da fieni e paglia ottenuti nella zona di produzione e da eventuale integrazione con granella di cereali, con leguminose e concentrati semplici o complessi NO OGM<sup>1</sup>, ben si spiega l'assenza di aflatossina M1 nel latte da noi esaminato. Infatti, essendo le aflatossine delle micotossine prodotte da specie fungine appartenenti alla classe degli Ascomiceti (genere *Aspergillus* spp.), come tali hanno bisogno per sviluppare di condizioni ambientali favorevoli (temperatura ed umidità), condizioni che raramente si possono riscontrare nell'area di produzione del Piacentinu ennese.

## ■ Screening for aflatoxin contamination M1 in row sheep's milk for the production of the "Piacentinu ennese"

**Key words:** Aflatoxin M1, Piacentinu Ennese, HPLC.

## Bibliografia

1. Disciplinare di Produzione della Denominazione d'Origine Protetta "Piacentinu ennese" (www.izssicilia.it).
2. Dragacci, S., Grosso, F., & Gilbert, J. (2001). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography for determination of aflatoxinM1 in liquid milk: collaborative study. *Journal of AOAC International*, 84 (2), 437-443.
3. Hussain, I., & Anwar, J. (2008). A study on contamination of aflatoxinM1 in raw milk in the Punjab province of Pakistan. *Food Control*, 19(4), 393-395.
4. Rosi, P., Borsari, A., Lodi, S., Galanti, A., Fava, A. Determinazione del contenuto di aflatossina M1 nel Latte: Correlazione tra metodo immunoenzimatico (ELISA) e cromatografico (HPLC-FLD). Sessione poster. I Convegno Nazionale micotossine nella filiera Agroalimentare. 29-30 Novembre 2004, Roma, Italia.

# Piano Straordinario per l'eradicazione della Brucellosi Ovina e Caprina in Sicilia: confronto di metodi diagnostici

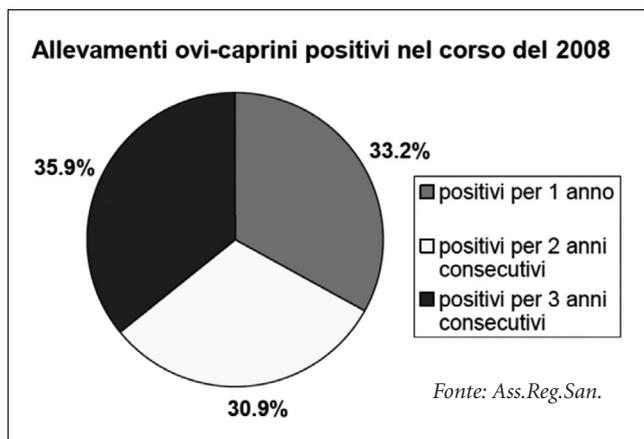


F. VITALE, S. REALE, M. BIVONA, T. LUPO, A. MIGLIAZZO, F. BRUNO, G. CASTELLI, D. SCOPELLITI, C. DE MARIA, P. GALLUZZO, S. CARACAPPA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri". Palermo

**Parole chiave:** Brucella, PCR, metodi diagnostici.

**INTRODUZIONE** - La brucellosi in Sicilia rappresenta ancora oggi il principale limite allo sviluppo dell'allevamento ovino e caprino, non solo per le restrizioni imposte agli allevamenti ritenuti infetti, ma anche per le ripercussioni sulle produzioni zootecniche del settore lattiero-caseario. Poiché la percentuale di allevamenti positivi nel corso del 2008 è rimasta eccessivamente elevata rispetto alle aspettative (Grafico 1), con D.A. 3 luglio 2009 n. 1327 si è deciso di potenziare l'attività di controllo rispetto agli obiettivi prefissati dalla precedente ordinanza ministeriale 14 novembre 2006. L'indagine di prima istanza per la brucellosi si basa sull'impiego di metodi sierologici, quali il test di agglutinazione rapida su vetrino ed eventuale titolazione anticorpale, per la valutazione della immunocompetenza degli animali. Tuttavia, a fronte di questo metodo indiretto, vengono anche impiegati dei metodi diagnostici diretti basati sulla rilevazione del patogeno vivo o del suo DNA. Tali approcci sono oggi stati presi in considerazione dal legislatore per la conferma dell'infezione sui soggetti positivi in prima istanza.



Il citato Decreto prevede, tra le azioni da intraprendere sugli animali infetti appartenenti ad allevamenti "problema" e destinati al macello, prelievi di organi e i fluidi biologici al momento della macellazione, su cui effettuare approfondimenti diagnostici quali la PCR e l'isolamento microbiologico mediante metodo OIE. In questo lavoro sono stati raccolti tutti i dati del triennio 2010/2012 per un confronto tra le due tecniche diagnostiche impiegate e per la valutazione dei positivi.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su un totale di 6.697 campioni suddivisi per matrici biologiche. I campioni in esame sono stati analizzati mediante test microbiologico in terreni di arricchimento e selettivi specifici per l'isolamento, e mediante test molecolare su DNA estratto tramite appositi kit del commercio. In particolare il target di DNA specifico per *Brucella* spp, è stato ricercato tramite Real Time PCR su apparato Abi Prism 7700 (Applied Biosystem). I risultati sono stati valutati per comparazione con opportuni controlli positivi che fungono da standard di riferimento.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Nella tabella seguente (Tab. 1), sono raccolti i dati relativi ai 6.697 campioni ovi-caprini analizzati nel triennio di riferimento, suddivisi per matrice e per tipologia di esame. Dalle elaborazioni eseguite, si evidenzia come 1.145 campioni risultino positivi all'isolamento microbiologico e 1.074 all'indagine molecolare. Dall'analisi

**Tabella 1** - Esami effettuati nel triennio suddivisi per matrice e tipologia.

	2010 - 2011 - 2012			
	Positivi		Negativi	
	PCR	ISOL	PCR	ISOL
Ln sopramam.	82	52	280	310
Pool	206	235	912	883
Milza	382	419	1862	1825
Tamp. vaginale	80	43	446	483
Latte	20	11	243	252
Utero	40	65	275	250
Linfonodo	118	135	627	610
Mammella	120	156	802	766
Testicolo	5	5	62	62
Placenta	0	0	5	5
Altro	21	24	109	106
<b>TOT.</b>	<b>1074</b>	<b>1145</b>	<b>5623</b>	<b>5552</b>
<b>Totale campioni analizzati 6697</b>				

dei dati si evidenzia come, tra le matrici biologiche analizzate, la milza costituisca l'organo di elezione per le indagini microbiologiche in accordo al carattere di invasività cellulare del batterio. Inoltre il confronto tra i positivi ottenuti con i differenti approcci, può indicare come matrici biologiche differenti possano essere più idonee per l'isolamento piuttosto che per la PCR. Questa può infatti soffrire della presenza di inibitori e frazioni proteiche degradate che spesso sono estratti insieme al DNA dai tessuti. D'altro canto campioni positivi in PCR possono anche essere negativi all'isolamento quando si è in presenza di batteri non più vitali. Inoltre è evidente che il gruppo di campioni analizzato non è omogeneo e talvolta non costituito da matrici di elezione per la ricerca della Brucella.

**CONCLUSIONI** - L'analisi dei dati mostra come l'utilizzo di test di laboratorio utilizzati in parallelo dia risultati più affidabili. L'uso di test differenti rappresenta, nel suo insieme, un valido strumento diagnostico posto a sentinella dell'evento infettivo per il monitoraggio della situazione endemica sul territorio. Dall'analisi dei dati si evince come matrici preferenziali per la ricerca siano la milza, i linfonodi e la mammella.

## Extraordinary Plan for the eradication of ovine and caprine brucellosis in Sicily: a comparison of diagnostic methods

**Key words:** Brucella, PCR, diagnostic tools.

## Bibliografia

- Reale S., Vitale F., Maxia L., Glorioso N.S., Vesco G., Caracappa S. (1999) Controllo della contaminazione da Brucella nel latte e suoi derivati mediante PCR. Atti XIII Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C. 494-496.
- Real-Time detection of *Brucella abortus*, *Brucella melitensis* and *Brucella suis*. Redkar R, Rose S, Bricker B, Del Vecchio V. Mol Cellule Probes. 2001 Feb;15(1):43-52.
- Romero C., Gamazo C., Pardo M., Lopez-Goni I. (1995) Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. Journal of Clinical Microbiology 33,3, 615-617.

# Diffusione di *Brucella abortus* in capre autoctone siciliane



S. CARACAPPA, D. VICARI, V. BLANDA, F. ANTOCI, S. PROPERZI, L. GALUPPO, S. MARINEO, L. SEMINARA, V. LO GIUDICE, V. CURRÒ

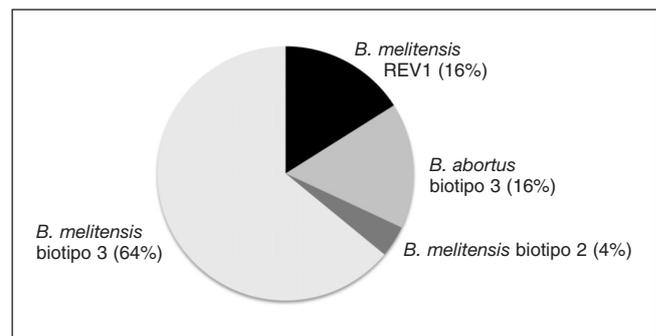
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Area Assistenza Territoriale

**Parole chiave:** Brucella, caprini, zoonosi.

**INTRODUZIONE** - La brucellosi è una malattia infettiva, causata da microrganismi del genere *Brucella*, presente in modo particolare nell'area del Mediterraneo, in India, Medio Oriente, nell'Asia centrale e in America Latina. Zoonosi. Si tratta di una patologia a decorso lento, spesso clinicamente asintomatico che colpisce varie specie animali sia domestiche che selvatiche quali bovini, caprini, ovini, suini, selvatici e cani in cui può causare aborti, artriti, borsiti oppure orchiti. *Brucella melitensis* è l'agente eziologico più comune di brucellosi nelle capre, ma altre specie del genere *Brucella* quali *abortus*, *neotomae*, *suis* e *ovis* possono infettare questi ruminanti. Sebbene i bovini siano gli ospiti d'elezione di *B. abortus*, le capre infette con ceppi virulenti di *B. abortus* sviluppano segni clinici e risposta sierologica simile a quella dei bovini infetti. La brucellosi costituisce da sempre uno dei più gravi problemi economici per gli allevamenti a causa degli ingenti danni provocati quali: fenomeni d'ipofertilità o sterilità temporanea o permanente, aborti tardivi, micromastiti e notevole perdita del valore commerciale dei soggetti colpiti. La brucellosi viene trasmessa con l'eliminazione di *B. melitensis* mediante secrezioni utero-vaginali successive ad un aborto, tramite ingestione di materiale infetto o attraverso ferite cutanee e mucose, oppure mediante accoppiamenti con animali infetti. Le infezioni aerogene e veneree si stabiliscono più frequentemente nei caprini che nei bovini anche per le abitudini sessuali dei maschi. L'aborto si manifesta tra il 3° e il 4° mese di gravidanza con possibile ritenzione della placenta; se non si verificano complicazioni tale patologia non dovrebbe compromettere l'attività riproduttiva futura della capra. Nelle capre infette, specie dopo aborto, si verifica una diminuzione della secrezione latte, che può protrarsi per l'intera lattazione per la presenza di micro mastite e di noduli mammari di varie dimensioni. Gli aborti, il latte crudo infetto e i latticini non pastorizzati sono le fonti d'infezione più importanti sia all'interno del gregge che per le categorie professionali a rischio, per tale motivo la brucellosi rappresenta un importante problema di sanità pubblica in quanto, sebbene sia una malattia a denuncia obbligatoria, i casi segnalati rappresentano una sottostima della situazione reale. L'OMS stima che la reale incidenza sia da 10 a 25 volte superiore a quella ufficiale.

**MATERIALI E METODI** - Il materiale patologico era costituito da milza, linfonodi, testicoli, utero, placenta ecc. prelevato in impianti di macellazione, da capi positivi ai test sierologici, mentre altre matrici (aborti, latte, tamponi vaginali, prepuziali) provenivano da allevamenti con patologie riferibili alla sfera riproduttiva durante sopralluoghi effettuati congiuntamente con il personale veterinario che opera nel territorio. Gli isolamenti sono stati eseguiti secondo la POS-DIA20 OIE da diverse aree della regione Sicilia. Tutti i ceppi di *Brucella spp.* isolati sono stati tipizzati e inviati successivamente al Centro di Referenza Nazionale per le brucellosi (Istituto G. Caporale, Teramo).

**RISULTATI** - I campioni sono stati prelevati da Giugno 2011 a Giugno 2012. In questo periodo sono stati effettuati prelievi da 86 allevamenti e 25 di questi sono risultati positivi (29%). Tutti i ceppi isolati sono stati caratterizzati presso il Centro di Referenza Nazionale e nel grafico 1 sono indicati i ceppi isolati e la percentuale di isolamento.



**Grafico 1**

In un'area della Sicilia Nord Orientale sono stati individuati quattro focolai di ceppi vaccinali REV.1.

Inoltre uno degli isolati appartiene al biovar 2 di *B. melitensis* e quattro isolati si sono rivelati essere *B. abortus*.

Scopo di questo lavoro è quello di riportare i risultati degli isolamenti di *Brucella spp.* isolati da caprini e ovini siciliani appartenente a un periodo compreso tra giugno 2011 e giugno 2012.

**DISCUSSIONE** - I risultati ottenuti mostrano un'importante cambiamento rispetto a quanto osservato negli anni precedenti. Nel quinquennio precedente all'introduzione del piano di eradicazione del 2006, e nel triennio immediatamente successivo, 2007-2009, tutti i ceppi di *Brucella spp.* isolati da caprini e ovini siciliani appartenevano al biovar 3 di *B. melitensis*<sup>1,2</sup>.

Nell'ultimo anno si è osservata la comparsa del ceppo vaccinale, osservazione fatta anche negli ovini, del biovar 2 di *B. melitensis* e di *B. abortus* biovar 2. In passato *B. abortus* è stata isolata in ovini in Calabria, ma altri isolamenti non sono stati riportati negli ultimi anni<sup>1</sup>.

*Ringraziamenti:* si ringraziano V. Vitale Badaco, G. Lo Bue e N. Galati per il supporto tecnico fornito.

## ■ Isolation of *Brucella abortus* in Sicilian caprines

**Key words:** *B. melitensis*, vaccine strains REV.1, *B. abortus*, caprine.

## Bibliografia

1. Di Giannatale E., De Massis F., Ancora M., Zilli K., Alessiani A. (2008) Vet Ital 44(2): 383-388.
2. Currò V, Marineo S, Vicari D, Galuppo L, Galluzzo P, Pugliese M, Migliazzo A, Torina A and Caracappa S (2012) Small Ruminant Research, in press.
3. Luchsinger D.W., Anderson R.K. (1979) Am. J. Vet. Res. 40: 1307-1312.

# Soia G.M. nella dieta per capre: performance dei capretti allattanti



R. TUDISCO<sup>1</sup>, S. CALABRÒ<sup>1</sup>, M.I. CUTRIGNELLI<sup>1</sup>, G. MONIELLO<sup>2</sup>, M. GROSSI<sup>1</sup>, V. MASTELLONE<sup>3</sup>, P. LOMBARDI<sup>3</sup>, L. AVALLONE<sup>3</sup>, F. INFASCELLI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli alimenti. Università di Napoli Federico II

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria. Università di Sassari

<sup>3</sup> Dipartimento di Strutture, Funzioni e Tecnologie Biologiche. Università di Napoli Federico II

**Parole chiave:** Capra, Soia GM, Performance, Capretti.

**INTRODUZIONE** - Tra le preoccupazioni sollevate dall'opinione pubblica sull'impiego degli OGM in alimentazione animale figurano il destino dei frammenti di DNA modificato nell'organismo e la eventuale influenza sulle performance degli animali e la qualità dei prodotti da essi forniti. In un precedente studio (Tudisco et al., 2010) sono stati rilevati frammenti transgenici nel latte di capre alimentate con soia geneticamente modificata (GM), e anche nel fegato, rene, muscolo, milza, cuore e sangue dei capretti allattanti. Scopo della presente ricerca è stato quello di valutare l'influenza della somministrazione di soia GM a capre nell'ultima fase di gravidanza e nella prima fase di lattazione sulle performance dei capretti alimentati con il solo latte materno.

**MATERIALI E METODI** - Venti capre pluripare, equamente suddivise in due gruppi (A e B) omogenei per numero di parti e per quantità di latte prodotto nella precedente lattazione, hanno ricevuto diete isoproteiche e isoenergetiche (AOAC, 2000) costituite da fieno di avena ad libitum e da mangime del commercio somministrato in ragione di 200 - 300 e 400 g/capo/die, rispettivamente 45, 30 e 15 giorni prima della presunta data del parto, individuata mediante ecografia al 60° giorno di gravidanza. Il mangime del gruppo A conteneva soia convenzionale, non isogena con quella GM (RoundUp® Ready) presente nel mangime somministrato al gruppo B. Immediatamente dopo il parto sono stati prelevati campioni di colostro per determinare la composizione chimica e la concentrazione di IgG (immunodiffusione radiale, Bethyl Laboratories, USA). A cadenza quindicinale sono stati prelevati campioni di latte per le determinazioni chimiche (Milko Scan 133B, Foss Matic). Dopo il parto, 10 capretti per gruppo (A e B) nati da parti bigemini sono stati tenuti in box separati, su lettiera in terra battuta e alimentati unicamente con il latte materno. Si è registrato il peso vivo alla nascita e poi a cadenza mensile. Tutti gli animali sono stati sacrificati alla età media di 60 ± 7 giorni.

Si è quindi proceduto al peso delle carcasse e degli organi interni nonché a quello del taglio campione (ASPA, 1991), all'incidenza in quest'ultimo di carne, ossa e grasso e alla sua analisi chimica (FoodScan Lab, FOSS Electric, Denmark). I dati sperimentali sono stati analizzati mediante procedura GLM (SAS, 2000).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La composizione chimica dei due mangimi è risultata sovrapponibile. Le percentuali di proteine e di grasso del colostro del gruppo B sono risultate significativamente ( $P < 0.01$ ) inferiori a quelle del gruppo A ( $6.1 \pm 0.9$  vs  $18.7 \pm 1.4$ , e  $4.6 \pm 0.9$  vs  $7.2 \pm 0.3$ , rispettivamente) così come le concentrazioni di IgG (mg/ml  $10.3 \pm 2.5$  vs  $28.2 \pm 3.2$ ). Allo stesso modo, significativamente diversi sono risultati entrambi i parametri nel prelievo di latte effettuato 15 d dopo il parto (proteine %:  $3.8 \pm 0.6$  vs  $4.3 \pm 0.6$ ; grasso %:  $3.0 \pm 0.8$  vs  $5.8 \pm 1.1$ , rispettivamente nel gruppo B e A). Le differenze si sono annullate nei prelievi successivi. Il peso dei capretti alla nascita è risultato sovrapponibile, mentre significativamente ( $P < 0.05$ ) diversi quelli ad 1 mese ( $kg 8.3 \pm 0.5$  vs  $9.4 \pm 0.7$ , per il gruppo B e A, rispettivamente) e alla macellazione ( $kg 10.5 \pm 0.5$  vs  $12.4 \pm 0.8$ , per il gruppo B e A, rispettivamente). I soggetti del gruppo B hanno, inoltre, presentato pesi significativamente inferiori della carcassa ( $P < 0.05$ ), dell'apparato uro-genitale e del fegato ( $P < 0.01$ ). Per quanto riguarda il taglio campione, mentre il peso è risultato significativamente ( $P < 0.05$ ) superiore nel gruppo A, ma con analoga incidenza di ossa, grasso e carne nei due gruppi, l'analisi chimica non ha fatto registrare differenze tra i gruppi ad eccezione dell'umidità, risultata superiore per quello B (Tab. 1). Le minori performance registrate nei capretti del gruppo B

**Tabella 1** - Analisi chimica (%) del taglio campione.

	A	B	Sign.
Grasso	$3.25 \pm 0.8$	$3.18 \pm 0.7$	NS
Proteine	$21.05 \pm 0.5$	$21.02 \pm 0.4$	NS
Collagene	$1.47 \pm 0.2$	$1.33 \pm 0.3$	NS
Umidità	$75.07 \pm 1.0$	$76.52 \pm 1.3$	*

NS: non significativo; \*:  $P < 0.05$ .

sono probabilmente da ascrivere alla minore concentrazione proteica e in particolare delle IgG (Massimini et al., 2007) registrate nel colostro e al primo prelievo di latte delle madri. Infatti, le immunoglobuline del colostro risultano strettamente legate a diversi fattori di crescita e maturazione (IGF-1, IGF-2, somatotropina, fibroblast growth factor, TGF, insulin, PDGF e EGF) che aumentano le sintesi di DNA, RNA e proteine, inibendo nel contempo la scissione di queste ultime (Ginjala and Pakkanen, 1998). La presenza di recettori per questi fattori nel tratto intestinale faciliterebbe l'assorbimento di elettroliti e di principi nutritivi (Alexander and Carey, 1999). La minore concentrazione di IgG nel colostro è ipotizzabile sia conseguenza di una diminuzione significativa dei linfociti B negli animali alimentati con materie prime GM, come riportato da Finamore et al. (2008) nei topi. Anche Buzoianu et al. (2012) hanno osservato riduzione del numero di linfociti B nei suini alimentati con mais GM, anche se in questo caso non è stata raggiunta la significatività statistica.

**CONCLUSIONI** - Alla luce dei risultati su esposti, emergerebbe che la somministrazione di soia GM alle capre nell'ultima fase della gravidanza determina una diminuzione della qualità del colostro e di conseguenza un peggioramento delle performance dei capretti allattanti.

## GM soybean in goats diet: influence on kids performances

**Key words:** Goat, GM soybean, Performances, Kids.

## Bibliografia

- Alexander AN, Carey BV (1999) Am. J. Physiol., 271: 619-625.  
 A.O.A.C. (2000), Official methods of Analysis 17th Edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, Virginia.  
 A.S.P.A. (1991) Metodologie relative alla macellazione degli animali di interesse zootecnico e alla valutazione e dissezione della loro carcassa. ISMEA, Roma.  
 Buzoianu SG, Walsh MC, Rea MC et al. (2012) Plos One, 7(10), e47851.  
 Finamore A, Roselli M, Britti S, Monastra G, Ambra R, Turrini A, Mengheri E (2008) J. Agric. Food Chem., 56 (23), 11533-11539.  
 Ginjala V, Pakkanen R (1998) J. Immunoassay, 19: 195-207.  
 Massimini G., Mastellone V., Britti D., Lombardi P., Avallone L. (2007) J. Am. Vet. Med. Ass., 231 (12):1873-1877.  
 SAS (2000). SAS/STAT Software: Changes and Enhancements through Release 8.1.  
 Tudisco R., Mastellone V., Cutrignelli MI, Lombardi, Bovera F, Mirabella N, Piccolo G, Calabrò S, Avallone L, Infascelli F. (2010). Animal, 4 (10): 1662-1671.

# “Latte di gesso” nell’abomaso dei capretti: descrizione di un caso



G. FILIPPINI<sup>1</sup>, N. D’AVINO<sup>1</sup>, S. PAVONE<sup>1</sup>, S. SALAMIDA<sup>1</sup>, M. GARAGUSO<sup>2</sup>, G. PRESTERA<sup>2</sup>, E. CARIATI<sup>2</sup>, E. LEPRI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell’Umbria e delle Marche

<sup>2</sup> Associazione Regionale Allevatori della Basilicata

<sup>3</sup> Dipartimento Scienze Biopatologiche Veterinarie ed Igiene delle Produzioni Animali ed Alimentari, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

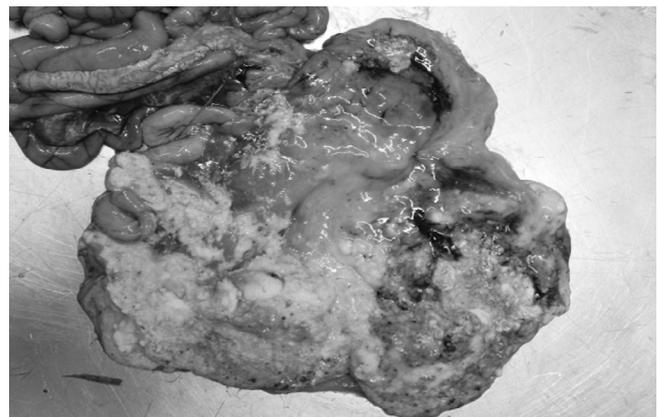
**Parole chiave:** Capra, abomasite, clostridiosi, *C. sordellii*.

**INTRODUZIONE** - Nei giovani agnelli e capretti la patologia gastro-intestinale è sicuramente una delle principali cause di mortalità neonatale, spesso provocata da infezioni sostenute da germi appartenenti al genere *Clostridium*. È ormai assodato che nel determinismo delle gastro-enterotossiemie rientrano, oltre al *C. perfringens*, anche altri clostridi, fra cui emergono, in termini di rilevanza epidemiologica, soprattutto *C. sordellii* e *C. septicum*. Il primo, in particolare, risulta sempre più spesso associato ad abomasite ed enterite necrotica-emorragica soprattutto nei giovani animali.

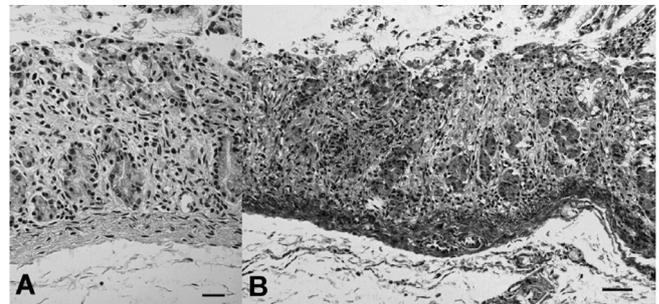
**MATERIALI E METODI** - Nel caso in oggetto le notizie anamnestiche riferiscono della comparsa in capretti tra i 4 e 25 giorni di vita, di una sindrome neurologica con atassia e barcollamenti, seguita da morte nel 100% dei soggetti colpiti. La sindrome coinvolgeva tutti i giovani soggetti presenti nel gregge con una stagionalità relativa ai mesi di Gennaio-Febbraio ed era resistente ai più comuni trattamenti terapeutici di supporto. Un comune reperto anatomopatologico riportato in anamnesi è la presenza a livello abomasale di latte coagulato estremamente compatto, tanto da meritare la definizione di “latte di gesso”.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - L’esame necroscopico condotto su due capretti ha evidenziato in un soggetto polmonite interstiziale acuta diffusa, splenomegalia e degenerazione epatica diffusa, lesioni compatibili con una condizione tossiemica; l’abomaso appariva ripieno di latte coagulato, con soffusioni emorragiche visibili sulla sierosa e nella mucosa dell’organo (Fig. 1); nei soggetti esaminati non è stato evidenziato il singolare reperto del “latte di gesso” riportato in anamnesi. L’esame istologico della parete abomasale ha consentito di evidenziare multifocali erosioni della mucosa abomasale associate a perdita delle ghiandole e iniziali segni di fibrosi (Fig. 2). L’esame batteriologico condotto da abomaso, intestino e milza ha consentito l’isolamento di *Clostridium perfringens* e *Clostridium sordellii*.

**CONCLUSIONI** - I rilievi anatomo-istopatologici ed i risultati degli esami batteriologici hanno suggerito un possibile meccanismo eziopatogenetico responsabile della formazione del singolare quadro macroscopico abomasale definito “latte di gesso”, e del successivo decesso degli animali. Infatti, l’alimentazione spinta, spesso adottata nelle capre durante la lattazione, potrebbe aver determinato la produzione di un latte particolarmente ricco di grassi e quindi mal digeribile; la variazione nella composizione del latte potrebbe aver inciso sul rapporto dei vari enzimi proteolitici secreti a livello abomasale (chimosina/pepsina), così come già dimostrato per la specie bovina, contribuendo ulteriormente ad una cattiva digestione. La persistenza di latte coagulato in abomaso potrebbe essere alla base di iniziali lesioni a carico della mucosa e della virulentazione dei clostridi eventualmente presenti. La mucosa abomasale già lesa da basse quantità di tossine clostridiali, potrebbe sviluppare danni più gravi ad andamento sub-acute-cronico (atrofia e perdita delle ghiandole abomasali, iniziali eventi di fibrosi), come quelli evidenziati nel presente caso, che comporterebbero un ulteriore peggioramento delle capacità digestive, innalzamento del pH abomasale e in ultimo una massiva proliferazione batterica e liberazione di tossine causa della enterotossiemia e del decesso improvviso dell’animale. È verosimile che nel determinismo delle lesioni a carattere sub-acute cronico della mucosa abomasale possa essere intervenuto il *C. sordellii*, recentemente riconosciuto come causa di abomasiti, enteriti ed enterotossiemie nel bovino e nella pecora, in sinergia con il *C. perfringens*. Ap-



**Figura 1** - Abomaso di capretto con contenuto consolidato ed erosioni mucosali disseminate.



**Figura 2** - Abomaso: erosione della mucosa con perdita delle ghiandole e iniziali segni di fibrosi (A: E-E; B: Tricromica di Masson. Barra = 25 µm).

pare chiaro come l’ampliamento della casistica, l’identificazione delle tossine prodotte e l’isolamento dell’agente eziologico e/o delle tossine secrete in altri organi siano di fondamentale importanza per avvalorare il quadro descritto.

## ■ “Chalky milk” in the abomasum of kids: description of a case

**Key words:** caprine, abomasums, Clostridiosis; *C.sordellii*.

## Bibliografia

- Andren A, Bjorck L, Claesson O (1980). Journal of Agricultural Research 10:123-130).
- Lewis CJ and Naylor RD (1998). Vet Record 142:417-421.
- Coleman JD, Hill JS, Bray HT et al. (1975). Vet Med Small Anim Clin. 70:191-5.

# Malattie trasmesse da zecche (TBDs) in ovini della Sicilia Occidentale



A. TORINA<sup>1</sup>, S. CARACAPPA<sup>1</sup>, V. BLANDA<sup>1</sup>, M.E. SCARIANO<sup>1</sup>,  
V. DI MARCO LO PRESTI<sup>1</sup>, S. BRIGANÒ<sup>1</sup>, R. D'AGOSTINO<sup>1</sup>, S. SCIMECA<sup>1</sup>,  
J. DE LA FUENTE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo

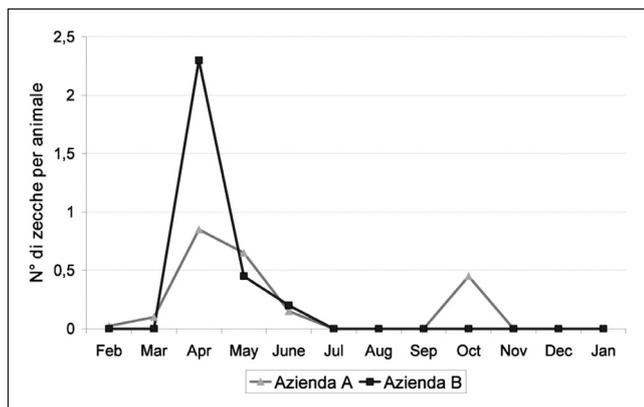
<sup>2</sup> Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos Ciudad Real, Spain

**Parole chiave:** zecche, ovini, TBDs, Sicilia.

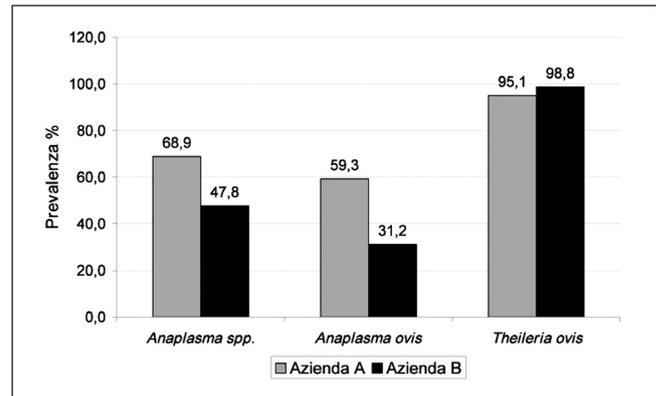
**INTRODUZIONE** - Numerose specie di zecche sono associate alla trasmissione di malattie con gravi conseguenze per la salute umana e animale, in particolare nei piccoli ruminanti le malattie trasmesse da zecche provocano seri danni nelle regioni tropicali e subtropicali del pianeta. L'anaplasmosi, la theileriosi e la babesiosi sono alcune delle malattie trasmesse da zecche che provocano alle aziende zootecniche ingenti danni economici riducendo le produzioni zootecniche negli ovini. Altro patogeno trasmesso talvolta dalle zecche è *Coxiella burnetii* che è in grado di determinare gravi perdite al bestiame e che spesso è causa di zoonosi. Questo lavoro descrive i risultati di uno studio condotto per dodici mesi su due allevamenti ovini della provincia di Palermo. Lo scopo di tale analisi è di ottenere informazioni sulla prevalenza dei principali patogeni trasmessi da zecca in condizioni di campo.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su due allevamenti di ovini, A e B, siti a Partinico, in Provincia di Palermo, Sicilia. I due allevamenti presentavano le medesime condizioni climatico-ambientali ed erano costituiti rispettivamente da 123 e 133 ovini. Dopo un iniziale screening eseguito su tutti gli animali delle due aziende (febbraio 2011), per un intero anno, mensilmente, è stato condotto un monitoraggio su 20 ovini per allevamento, individuati casualmente di volta in volta. Per ogni animale è stato prelevato il sangue e sono state raccolte le zecche eventualmente presenti. Le zecche prelevate sono state identificate secondo i criteri morfologici descritti<sup>1</sup> e conservate in alcool. Il DNA, estratto dai campioni di sangue in EDTA mediante PureLink Genomic Mini kit (Invitrogen), è stato saggiato tramite PCR per rilevare la presenza del DNA dei patogeni *Anaplasma* spp.<sup>2</sup>, *Anaplasma phagocytophilum*<sup>3</sup>, *Anaplasma ovis*<sup>4</sup>, *Babesia ovis*<sup>5</sup>, *Theileria ovis*<sup>6</sup> e *Coxiella burnetii*<sup>7</sup>.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Il valore annuale medio di zecche per animale era di 0.41 per l'allevamento A e di 0.17 per l'allevamento B. Le zecche raccolte appartenevano alle seguenti specie: *Hyalomma lusitanicum*, *Haemaphysalis punctata*, *Rhipicephalus bursa*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Rhipicephalus turanicus*. L'andamento mensile della presenza di zecche, espresso in termini di numero medio per animale, è riportato in Figura 1. Nella Figura 2 si rappresenta graficamente il valore medio annuo di prevalenza riscontrato nei due allevamenti considerati per i patogeni presi in esame. Le PCR effettuate per *A. phagocytophilum*, *B. ovis* e *C. burnetii* hanno dato esito negativo. Interessante è l'osservazione di un'elevata prevalenza per *Theileria ovis* in entrambi gli allevamenti considerati. Valori di prevalenza significativi sono stati ottenuti anche per *Anaplasma* spp. e, in particolare, per *A. ovis*. Nessun animale è invece ri-



**Figura 1** - Numero medio di zecche per animale nei due allevamenti nel corso del monitoraggio.



**Figura 2** - Valore medio annuo di prevalenza dei patogeni nei due allevamenti.

sultato positivo ad *A. phagocytophilum* trasmesso da *Ixodes ricinus*.

Tale organismo, agente di una sindrome da scarso rendimento delle lattifere, è anch'esso presente nel territorio, come riportato in precedenti lavori. A differenza di quanto osservato in altri studi, non è stata riscontrata la presenza di babesiosi.

**CONCLUSIONI** - Le infezioni di patogeni trasmessi da zecche sono presenti su tutto il territorio nazionale negli animali domestici e sono particolarmente diffuse nel Sud Italia, in accordo alle informazioni relative alla distribuzione delle zecche nella penisola italiana<sup>8</sup>. I dati riportati, inerenti alle indagini molecolari, evidenziano principalmente la diffusione di quei patogeni che permangono in forma di latenza nell'ospite. Al contrario, patogeni come *A. phagocytophilum* e *C. burnetii*, che non causano l'instaurarsi dello stato di portatore, possono essere individuati con maggiore difficoltà attraverso tale tipologia di indagini. Indicativo, quindi, sarebbe lo studio sierologico per definire la prevalenza di tali patogeni nel territorio. Nonostante tutto, la ricerca diretta del patogeno riveste un'importanza fondamentale per valutare l'effettivo rischio di trasmissione dell'agente eziologico al vettore. Nelle regioni meridionali le condizioni climatiche rendono gli ovini maggiormente esposti ai rischi delle infestazioni da zecche. È noto che un controllo adeguato delle malattie trasmesse da vettori si traduce in una maggiore produttività di carne e latte, dal momento che le TBDs hanno un forte impatto nell'economia zootecnica. I risultati qui riportati mostrano come numerose malattie trasmesse da zecche siano endemiche in Sicilia, anche se ci si auspica la conduzione di ulteriori studi epidemiologici al fine di consentire una migliore valutazione del rischio e l'implementazione di un efficace programma di controllo.

Ricerca finanziata dal Ministero Italiano della Salute, fondi Ricerca corrente IZSSi 09/09.

## ■ Tick born diseases (TBDs) in ovine of Western Sicily

**Key words:** Ticks, ovine, TBDs, Sicilia.

## Bibliografia

- Manilla G. (), Fauna d'Italia, Acari, Ixodida; Edizione Calderini, Bologna.
- Stuen S et al. (2003), Ann NY Acad Sci; 990: 443-434.
- de la Fuente J. et al. (2005), J Clin Microbiol; 43: 1309-1317.
- de la Fuente J. et al. (2003), J Clin Microbiol; 41: 1609-16.
- Aktas M. et al. (2005), Vet Parasitol; 133: 277-281.
- Altay K. et al. (2005) Vet Parasitol; 127: 99-104.
- To H. et al. (1996), J Clin Microbiol; 34: 647-51.
- Torina A. et al. (2008), Appl Environ Microbiol; 74: 7578-7584.

# Control of vector-borne diseases with Subolesin/Akirin vaccines



J. DE LA FUENTE<sup>1,2,§</sup>, O. MERINO<sup>1</sup>, J.A. MORENO-CID<sup>1</sup>, M. VILLAR<sup>1</sup>, R.C. GALINDO<sup>1</sup>, C. ALMAZÁN<sup>3</sup>, K.M. KOCAN<sup>2</sup>, J.M. PÉREZ DE LA LASTRA<sup>1</sup>, P. ALBERDI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> SaBio. Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC-CSIC-UCLM-JCCM, Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain

<sup>2</sup> Department of Veterinary Pathobiology, Center for Veterinary Health Sciences, Oklahoma State University, Stillwater, OK 74078, USA

<sup>3</sup> Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km. 5 carretera Victoria-Mante, CP 87000 Ciudad Victoria, Tamaulipas, Mexico

<sup>§</sup> Correspondence: José de la Fuente, SaBio, Instituto de Investigación en Recursos Cinegéticos IREC-CSIC-UCLM-JCCM, Ronda de Toledo s/n, 13005 Ciudad Real, Spain. Email: jose\_delafuente@yahoo.com

**ABSTRACT** - Diseases transmitted by arthropod vectors greatly impact human and animal health. Vaccination is an environmentally friendly alternative for vector control that allows control of several vector-borne diseases (VBD) by targeting their common vector. Recent results have suggested that Subolesin (SUB) and its ortholog in insects, Akirin (AKR) are good candidate antigens for the control of VBD. Vaccination trials with recombinant SUB/AKR demonstrated effective control of arthropod vector infestations and infection with tick-borne pathogens. These results demonstrated the feasibility of SUB/AKR vaccines for the control of VBD.

**Key words:** akirin, subolesin, tick, mosquito, fly, mite, lice, vaccine.

**INTRODUCTION** - Diseases transmitted by arthropod vectors greatly impact human and animal health, accounting for over 20% of all emerging infectious diseases recorded between 1940 and 2004 (Jones et al., 2008). Vaccination is an environmentally friendly alternative for the control of vector infestations and pathogen infections that allows control of several VBD by targeting their common vector (de la Fuente and Kocan, 2003; de la Fuente et al., 2007; 2011; Sperança and Capurro, 2007; Karunamoorthi, 2011; Collier et al., 2012). Traditional control methods for arthropod vector infestations are based on the use of chemical pesticides with associated drawbacks such as selection of arthropod-resistant strains and contamination of both the environment and animal products (de la Fuente and Kocan, 2003). Vaccines have several advantages including (a) no contamination of the environment and animal products, (b) avoiding selection of pesticide resistant arthropod vectors, (c) targeting a broad but selective range of vector species, and (d) reducing vector capacity for pathogen transmission.

Subolesin (SUB) was discovered as a tick protective antigen in a mouse model of *Ixodes scapularis* infestations (Almazán et al., 2003) and recent results have suggested that SUB and its ortholog in insects, Akirin (AKR) are good candidate antigens for the control of VBD (de la Fuente et al., 2011).

**Identification of candidate vector protective antigens** - The limiting step in the development of vector vaccines is the identification of protective antigens (de la Fuente and Kocan, 2003). Particularly relevant towards this goal is the identification of protective antigens such as SUB/AKR that are conserved across vector species, thus providing the opportunity to develop a universal vaccine for the control of multiple arthropod infestations and their associated pathogens (de la Fuente et al., 2011).

In 1994, Elvin and Kemp proposed the conditions necessary and sufficient for an effective vector protective antigen. These conditions are still valid, with the addition of an effect on pathogen transmission: (a) host antibodies should be able to gain access to the vector antigen, (b) sufficient antibodies must gain access to the target antigen, (c) the formation of antibody-antigen complex should disrupt the normal function of the vector protein, (d) the antigen should share conserved structural/sequence motifs among vector species to protect against multiple vector infestations, and (e) the vaccine should affect vector infestations and vector capacity for transmitted pathogens.

**Host antibodies to SUB/AKR vaccines gain access to the vector antigen and affect its biological function** - SUB and AKR are

ortholog proteins in ticks and insects that affect the expression of signal transduction and innate immune response genes, as well as positive and negative transcriptional regulators (Goto et al., 2008; Macqueen and Johnston, 2009; Galindo et al., 2009; Mangold et al., 2009; de la Fuente et al., 2011; Nowak et al., 2012). These intermediate proteins interact with NF- $\kappa$ B and other regulatory proteins, bind DNA or remodel chromatin to regulate gene expression (Goto et al., 2008; Galindo et al., 2009; de la Fuente et al., 2011; Nowak et al., 2012). This broad function of SUB/AKR as transcription factors explains the profound effect of gene knockdown by RNAi on tick and insect physiology, as well as on development and gene expression in ticks. SUB and AKR are functionally important for arthropod innate immunity to pathogens and, at least in ticks, for other molecular pathways, including those required for tissue development and function and for pathogen infection and multiplication (de la Fuente et al., 2011).

The exact mechanisms by which SUB/AKR vaccines affect vector infestations, fertility and pathogen infection are unknown. Blood-sucking arthropods feeding on immunized hosts ingest antibodies specific for SUB/AKR that could reduce their levels and biological activity and/or interact with conserved epitopes in other proteins resulting in reduced feeding, developmental and reproductive performance (de la Fuente et al., 2011; Moreno-Cid et al., 2010).

**SUB/AKR share conserved structural/sequence motifs among vector species to protect against multiple vector infestations** - SUB/AKR share common structural and protective epitopes in different arthropod vector species, suggesting that these antigens could be used for development of vaccines for control of multiple arthropod vector infestations and pathogen infections (Canales et al., 2009a; Prudencio et al., 2010; Moreno-Cid et al., 2013).

**SUB/AKR vaccines affect vector infestations and vector capacity for transmitted pathogens** - SUB/AKR vaccines have been effective for the control of arthropod infestations and pathogen infection in domestic (cattle and sheep), wild (deer) and laboratory (mice) mammals, birds (chicken) and fishes (salmon) (Canales et al., 2009b; Almazán et al., 2010; 2012; Moreno-Cid et al., 2013). SUB/AKR vaccines were effective for the control of hard (*Ixodes* spp., *Rhipicephalus* spp., *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*) and soft (*Ornithodoros* spp.) ticks, mosquitoes (*Aedes albopictus*), sand flies (*Phlebotomus perniciosus*), poultry red mites (*Dermanyssus gallinae*) and sea lice (*Caligus rogercresseyi*) infestations and tick infections with *Anaplasma phagocytophilum*, *A. marginale*, *Babesia bigemina* and *Borrelia burgdorferi*.

The ultimate goal of arthropod vector vaccines is the control of vector infestations and VBD. The effect of vector vaccines on VBD could be obtained by (a) reducing vector populations and thus the exposure of susceptible hosts to vector-borne pathogens, (b) reducing the arthropod vector capacity for pathogen transmission, and, preferably, (c) a combination of these factors.

The results obtained with SUB/AKR vaccines suggest that these antigens could reduce VBD by a dual effect on vector populations and vector capacity. However, some tick-borne pathogens such as tick-borne encephalitis virus (TBEV) are not controlled by SUB/AKR vaccines, probably due to differences in the role of these molecules during bacterial and viral infections (Havlíková et al., 2013).

**CONCLUSIONS** - SUB/AKR vaccines fulfilled the conditions proposed by Elvin and Kemp (1994) for effective vector protective antigens. These results demonstrated the feasibility of SUB/AKR vaccines for the control of VBD. However, further experiments are required to (a) characterize the mechanisms by which SUB/AKR vaccines affect vector infestations, fertility and pathogen infection and (b) demonstrate vaccine efficacy under field conditions.

**ACKNOWLEDGMENTS** - This research was supported by grants FAU2008-00014-00-00 and PEI109-0118-8907 to JF and the Walter R. Sitlington Endowed Chair for Food Animal Research to KMK. M. Villar was funded by the JAE-DOC program (CSIC-FSE), Spain. O. Merino is an Early Stage Researcher supported by the POSTICK ITN (Postgraduate training network for capacity building to control ticks and tick-borne diseases) within the FP7-PEOPLE – ITN programme (EU Grant No. 38511).

## References

- Almazán, C., K. M. Kocan, D.K. Bergman, J.C. García- García, E.F. Blouin and J. de la Fuente, 2003: Identification of protective antigens for the control of *Ixodes scapularis* infestations using cDNA expression library immunization. *Vaccine* 21, 1492-1501.
- Almazán, C., R. Lagunes, M. Villar, M. Canales, R. Rosario- Cruz, F. Jongejan and J. de la Fuente, 2010: Identification and characterization of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* candidate protective antigens for the control of cattle tick infestations. *Parasitol. Res.* 106, 471-479.
- Almazán, C., O. Moreno-Cantú, J.A. Moreno-Cid, R.C. Galindo, M. Canales, M. Villar, and J. de la Fuente, 2012: Control of tick infestations in cattle vaccinated with bacterial membranes containing surface-exposed tick protective antigens. *Vaccine* 30, 265-272.
- Canales, M., V. Naranjo, C. Almazán, R. Molina, S.A. Tsuruta, M.P.J. Szabó, R. Manzano-Roman, J.M. Pérez de la Lastra, K.M. Kocan, M.I. Jiménez, J. Lucientes, M. Villar and J. de la Fuente, 2009a: Conservation and immunogenicity of the mosquito ortholog of the tick protective antigen, subolesin. *Parasitol. Res.* 105, 97-111.
- Canales, M., C. Ballesteros, J.A. Moreno-Cid, A.M. Espinosa, M. Villar and J. de la Fuente, 2009b: Extractive bioconversion to produce the *Aedes albopictus* akirin in an aqueous two-phase system supporting *Pichia pastoris* growth and protein secretion. *Biochem. Eng. J.* 46, 105-114.
- Coller, B.A., D.E. Clements, T. Martyak, M. Yelmene, M. Thorne and D.E. Parks, 2012: Advances in flavivirus vaccine development. *IDrugs* 13, 880-884.7- de la Fuente, J. and K.M. Kocan, 2003: Advances in the identification and characterization of protective antigens for development of recombinant vaccines against tick infestations. *Expert Rev. Vaccines* 2, 583-593.
- de la Fuente, J., C. Almazán, M. Canales, J.M. Pérez de la Lastra, K.M. Kocan, P. Willadsen, 2007: A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Res. Rev.* 8, 23-28.
- de la Fuente, J., J.A. Moreno-Cid, M. Canales, M. Villar, J.M. Pérez de la Lastra, K.M. Kocan, R.C. Galindo, C. Almazán and E.F. Blouin, 2011: Targeting arthropod subolesin/akirin for the development of a universal vaccine for control of vector infestations and pathogen transmission. *Vet. Parasitol.* 181, 17-22.
- Elvin, C.M. and D.H. Kemp, 1994: Generic approaches to obtaining efficacious antigens from vector arthropods. *Int. J. Parasitol.* 24, 67-79.
- Galindo, R.C., E. Doncel-Pérez, Z. Zivkovic, V. Naranjo, C. Gortazar, A.J. Mangold, M.P. Martín-Hernando, K.M. Kocan, and J. de la Fuente, 2009: Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 612-617.
- Goto, A., K. Matsushita, V. Gesellchen, L. El Chamy, D. Kutenkeuler, O. Takeuchi, J.A. Hoffmann, S. Akira, M. Boutros, J.M. Reichhart, 2008: Akirins are highly conserved nuclear proteins required for NF-kappaB-dependent gene expression in drosophila and mice. *Nat. Immunol.* 9, 97-104.
- Havliková, S., Li ková, M., Ayllón, N., Roller, L., Kazimírová, M., Slovák, M., Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra, J.M., Klempa, B., de la Fuente, J. 2013. Immunization with recombinant subolesin does not reduce tick infection with tick-borne encephalitis virus nor protect mice against disease. *Vaccine* 31: 1582-1589.
- Jones K.E., N.G. Patel, M.A. Levy, A. Storeygard, D. Balk, J.L. Gittleman and P. Daszac, 2008: Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990-994.
- Karunamoorthi, K., 2011: Vector control: a cornerstone in the malaria elimination campaign. *Clin. Microbiol. Infect.* 17, 1608-1616.
- Macqueen, D.J. and I.A. Johnston, 2009: Evolution of the multifaceted eukaryotic akirin gene family. *BMC Evol. Biol.* 9, 34.
- Mangold, A.J., R.C. Galindo and J. de la Fuente, 2009: Response to the commentary of D. Macqueen on: R.C. Galindo, E. Doncel-Pérez, Z. Zivkovic, V. Naranjo, C. Gortazar, A.J. Mangold, et al., 2009: Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates [Dev. Comp. Immunol. 33, 612-617]. *Dev. Comp. Immunol.* 33, 878-879.
- Moreno-Cid, J. A., M. Jiménez, S. Cornelie, R. Molina, P. Alarcón, M-N Lacroix, R. Pinal, S. Delacour, J. Lucientes, M. Canales, J.M. Pérez de la Lastra, M. Villar and J. de la Fuente, 2010: Characterization of *Aedes albopictus* akirin for the control of mosquito and sand fly infestations. *Vaccine* 29, 77-82.
- Moreno-Cid, J.A., Pérez de la Lastra J.M., Villar M., Jiménez M., Pinal R., Estrada-Peña A., Alarcón P., Delacour S., Oropeza V., Ruiz I., Molina R., Lucientes J., Prudencio C.R., Galindo R.C., Almazán C., Nijhof A.M., Mangold A.J.,
- Gortázar C. and de la Fuente J., 2013: Control of multiple arthropod vector infestations with subolesin/akirin vaccines. *Vaccine* 31, 1187-1196..
- Nowak, S.J., H. Aihara, K. Gonzalez, Y. Nibu, M.K. Baylies, 2012: Akirin links Twist-regulated transcription with the Brahma chromatin remodeling complex during embryogenesis. *PLoS Genet.* 8(3), e1002547.
- Prudencio, C.R., J.M. Pérez de la Lastra, M. Canales, M. Villar, J. de la Fuente, 2010: Mapping protective epitopes in the tick and mosquito subolesin ortholog proteins. *Vaccine* 28, 5398-5406.
- Sperança, M.A. and M.L. Capurro, 2007: Perspectives in the control of infectious diseases by transgenic mosquitoes in the post-genomic era— a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102, 425-433.

# Parassitosi degli ovini e dei caprini e Regolamento di Polizia Veterinaria 320/54: criticità applicative con particolare riguardo all'Echinococcosi Cistica



G. GARIPPA

Settore Parassitologia e Malattie Parassitarie - Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari

**Parole chiave:** parassiti, Echinococcosi cistica ovini, caprini, legislazione.

Il Regolamento di Polizia Veterinaria 320/54 (RPV) si occupa delle parassitosi degli ovini e dei caprini all'Articolo 1 (distomatosi dei ruminanti, strongilosi polmonare e intestinale dei ruminanti, e rogne degli... ovini e dei caprini). Attualmente appare anacronistico che parassitosi quali le distomatosi epatiche, le strongilosi gastroenterici e broncopolmonari siano oggetto di attenzione in un Regolamento di Polizia Veterinaria. Discorso completamente differente merita invece l'Echinococcosi Cistica o idatidiosi in considerazione del fatto che si tratta di una zoonosi e della sua notevole diffusione negli animali e nell'uomo nel territorio nazionale. All'elenco di cui all'Articolo 1 del RPV è stata aggiunta, a seguito dell'O.M. 21.4.1964, l'idatidiosi (echinococcosi), anche se la stessa riporta (Art. 2) che i casi di idatidiosi non sono soggetti a denuncia nei modi stabiliti dal RPV.

Peraltro sempre lo stesso articolo dispone che "i veterinari addetti all'ispezione delle carni devono riportare su apposito registro i casi di idatidiosi riscontrati e i dati raccolti nel predetto registro devono essere trasmessi annualmente al Veterinario Provinciale". Nei restanti articoli (3-6) vengono riportate le disposizioni finalizzate al controllo della parassitosi negli ospiti definitivi in base alla situazione epidemiologica (trattamento obbligatorio dei cani). Per quanto riguarda la malattia nell'uomo dal 1991, a seguito del D.M. 15.12.1990 "Sistema informativo delle malattie infettive e diffuse", l'echinococcosi non è più obbligatoriamente denunciabile. Infatti essa non viene specificatamente contemplata e può essere inclusa nella Classe V (Malattie infettive e diffuse notificate all'Unità Sanitaria Locale e non comprese nelle classi precedenti, zoonosi indicate dal RPV) per le quali "...Le Unità Sanitarie Locali comunicheranno annualmente il riepilogo di tali malattie alla Regione e questa al Ministero...". Tuttavia il D.M. 14.1.2008 del Min. del Lavoro e della Previdenza Sociale ("Elenco delle malattie per le quali è obbligatoria la denuncia") ... include l'Echinococcosi tra le "malattie la cui origine lavorativa è di elevata probabilità" (Lista 1). Il D.Lvo. 4.4.2006 n. 191 "Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici" contempla fra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza "l'Echinococcosi e relativi agenti zoonotici (All. 1).

La decisione 200/96/CE modificata dalla Dec 2009/321/CE, relativa alle malattie trasmissibili da inserire progressivamente nella rete comunitaria, stabilisce un elenco di malattie trasmissibili e di problemi sanitari speciali oggetto di sorveglianza epidemiologica, ha come finalità di raccogliere e coordinare le informazioni ottenute dalle reti di sorveglianza esistenti negli Stati membri in materia di salute pubblica.

Nell'All. I 1. (Malattie trasmissibili e problemi sanitari speciali da integrare progressivamente nell'ambito della rete comunitaria di cui all'articolo 1), il punto 1.1. riporta "Per le malattie trasmissibili e i problemi sanitari speciali elencati in questo allegato, la sorveglianza epidemiologica nell'ambito della rete comunitaria è da eseguirsi mediante la raccolta e l'analisi standardizzate di dati, secondo modalità da determinarsi per ciascuna malattia trasmissibile e ciascun problema sanitario speciale, nel momento in cui vengono create reti di sorveglianza dedicate", dove al punto 2.5.3 Zoonosi (diverse da quelle di cui al punto 2.4) è compresa l'Echinococcosi. Esistono poi in Italia norme o piani regionali che affrontano specificamente il problema. In Sardegna ad esempio la LR 23 giugno 1950 n. 29 (Provvedimenti di lotta contro l'echinococcosi, la distomatosi, la strongilosi, la tubercolosi bovina e la rabbia) prevede all'Art 2 che "La profilassi dell'echinococcosi sarà eseguita con quattro trattamenti annuali antielmintici di tutti i cani. L'introduzione di cani nel territorio della Regione è subordinata all'esecuzione del trattamento". La Legge Regionale n. 35 del 1/8/96 "Integrazioni e modifiche alla legge regionale 18 maggio 1994, n. 21", recante: "Norme per la protezione degli animali e istituzione dell'anagrafe canina" all'Art.10 (Profilassi della echinococcosi e della leishmaniosi) dispone che:

1. Tutti i cani devono essere sottoposti a trattamento periodico contro la tenia echinococco secondo le cadenze previste dal piano regionale di eradicazione della echinococcosi,....

3. I trattamenti ed i prelievi sono effettuati gratuitamente dai servizi veterinari delle Unità sanitarie locali, nonché dai veterinari liberi professionisti con spese a carico del proprietario o detentore del cane.

Il quadro normativo è in grado, almeno relativamente alla parte veterinaria, di disporre di un flusso di dati annualmente aggiornato che consenta ai differenti livelli istituzionali (regione ministero) di disporre un quadro chiaro della situazione epidemiologica aggiornato nel tempo e finalizzato alla sorveglianza epidemiologica dell'EC. Tale flusso di dati, consente infine all'European Food Safety Authority (EFSA), e all'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) di stilare i rapporti che sono alla base dei provvedimenti legislativi dell'Unione Europea. Sta di fatto che esistono notevoli discrepanze fra dati ufficiali che indicano basse prevalenze e quanto rilevato da indagini scientifiche e riportato in letteratura che evidenzia una maggiore diffusione e prevalenza della parassitosi come è possibile rilevare dalla seguente tabella.

ITALIA					
Dati ufficiali EFSA-ECDC (2010) – Prevalenza complessiva					
	OVINI	4,5%	BOVINI	0,2	
Dati di ricerca (2006-09) - Prevalenza-Range					
	Nord	Centro	Sud	Sicilia	Sardegna
OVINI	0,1-0,5% (a)	20-80%	4-36%	58%	75%
BOVINI	0,02-0,7% (b)	7-15%	3-15% (c)	11-67%	41,5 (44)%

(a) In alcune aree, pecore adulte 25 - 45%.  
 (b) In alcune aree >1 (e si sospettano anche > 5!).  
 (c) Bufali (Campania) 10,5.

Quanto esposto evidenzia, come sottolineato anche dall'EFSA nel - Italy 2010 - Report on trend and sources of zoonoses, che "La mancanza di dati ufficiali e lo scarso numero di report negli animali e nell'uomo non permettono di avere un quadro completo e adeguato sulla diffusione della EC in Italia. Attualmente i dati epidemiologici più affidabili si basano su dati di ricerca" e che "Al fine di disporre di adeguati dati ufficiali sull'EC, i Servizi Veterinari devono migliorare l'attuale attività di sorveglianza". "Deve essere istituito un Registro Nazionale per l'EC, informatizzato e collegato alla rete, sulla base del Registro Europeo per l'Echinococcosi Alveolare.

Inoltre "L'analisi delle relazioni regionali sull'EC negli animali (2010), soprattutto per quanto riguarda casi riscontrati al momento della macellazione [ispezione ai sensi del reg. (CE) n 854/2004 (CE, 2004)], evidenzia che i dati di alcune regioni sono carenti e l'armonizzazione delle informazioni è insufficiente. Pertanto, i dati ufficiali sono attualmente insufficienti. I Servizi veterinari devono compilare correttamente i report dei casi positivi. Inoltre, una quota delle cisti presenti al momento della macellazione deve essere campionata per determinarne la fertilità. La fertilità e i dati relativi agli animali positivi (specie, categoria e provenienza) devono essere registrati, e campioni di cisti devono essere inviati al Laboratorio Nazionale di Riferenza (NRL) per la genotipizzazione, al fine di disporre di più preciso quadro epidemiologico dell'echinococcosi animali a livello regionale e nazionale.

## Parasites of sheep and goats and Veterinary Official Regulation 320/54: critical applications with particular emphasis on Cystic Echinococcosis

**Key words:** Parasites, Cystic Echinococcosis, sheep, goats, legislation.

## Bibliografia

- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; EFSA Journal 2012; 10 (3): 256-269.
- European Food Safety Authority Italy - The Report referred to in Article 9 of Directive 2003/99/EC. Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in Humans, Foodstuffs, Animals and Feedingstuffs, including information on foodborne outbreaks, antimicrobial resistance in zoonotic agents and some pathogenic microbiological agents. Zoonoses Monitoring 2010: 513-527.

# Condizionalità: aspetti di sanità pubblica veterinaria



**L. ARCURI**

ASP di Palermo - Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria - Servizio di Igiene degli Allevamenti e delle produzioni zootecniche

**Parole chiave:** condizionalità, controlli ufficiali, allevamenti ovini e caprini

**INTRODUZIONE** - La "condizionalità" è il criterio in base al quale vengono erogati gli aiuti economici comunitari al comparto agro-zootecnico e rappresenta l'insieme delle norme e delle regole che le aziende agricole devono rispettare per poter accedere al regime del pagamento unico. Le varie norme e regole sono raggruppate per aree di competenza e vengono sinteticamente classificate in Criteri di Gestione Obbligatorie (CGO) o ATTI.

- Ambiente Atti: A1, A2, A3, A4, A5
- Sanità Pubblica, Salute delle Piante e degli Animali Atti: A6, A7, A8, A8bis, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B15
- Igiene e Benessere Animale Atti: C16, C17, C18

Con la attuale Politica Agricola Comunitaria (PAC), ma anche con la nuova PAC 2014-2020, tutti gli agricoltori-allevatori che percepiscono aiuti comunitari sono obbligati al rispetto della "condizionalità" e tale impegno viene assunto con la presentazione della domanda per ricevere il cosiddetto pagamento PAC. Come è evidente molte delle norme citate rientrano nell'ambito delle attività di controllo routinario della Sanità Pubblica Veterinaria (SPV), ed in particolare, per il settore ovino e caprino i seguenti Atti:

- Atto A8 - anagrafe ovi-caprina;
- Atto B10 - utilizzo illecito di sostanze ad azione ormonale (D.Lgs 158/2006) - Piano Nazionale Residui
- Atto B11 - regolamento CE n. 178/02 e relativo "pacchetto igiene" Reg. CE nn. 852/04, 853/04, 183/05 - Controlli Ufficiali condotti ai sensi del Reg. 882/04 sulle aziende di produzione primaria (allevamenti);
- Atto B12 - prevenzione, controllo ed eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili (Reg. CE n. 999/2001)
- Atto B13 - lotta contro l'afra epizootica (Direttiva 85/511/CEE)
- Atto B15 - lotta ed eradicazione della febbre catarrale degli ovini Blue tongue (Direttiva 2000/75/CE)
- Atto C18 - tutela del benessere animale in allevamento (D.Lgs 146/2001) - Piano Nazionale Benessere Animale
- Atto A4 - Protezione delle acque dall'inquinamento da nitrati, attraverso una più attenta gestione del bilancio dell'azoto proveniente dall'attività agricola (D.Lgs 152/2006) - tale normativa pur di non stretta competenza veterinaria interessa tutte le aziende zootecniche ed in particolare quelle intensive e semi-intensive per la corretta gestione dei reflui zootecnici.

Prima di passare all'esame delle maggiori criticità legate all'applicazione delle normative previste dagli ATTI di interesse veterinario è certamente utile fare il punto sulla situazione attuale e soprattutto sulle procedure operative che consentono la verifica del rispetto degli impegni di "condizionalità" da parte degli imprenditori agricolo-zootecnici. La gestione ed erogazione degli aiuti comunitari è effettuata dai cosiddetti Organismi Pagatori (OP) che hanno l'onere della verifica attraverso controlli diretti presso gli allevamenti, ma anche, e sempre di più in futuro, verifiche incrociate con le attività di controllo ufficiale svolte presso le aziende zootecniche dai Servizi Veterinari territoriali, nell'ambito delle attività di istituto. L'Ente che assolve a tale funzione è l'Agenzia per le Erogazioni in Agricoltura (AGEA), che opera presso le Regioni che non si sono dotate di OP propri regionali come il Piemonte (ARPEA), la Lombardia (Organismo Pagatore Regione Lombardia), il Veneto (AVEPA), l'Emilia Romagna (AGREA), la Toscana (ARTEA), la Calabria (ARCEA), la Provincia di Trento (APPAG) e la Provincia di Bolzano (OPPAB). Ad oggi lo scambio di informazioni tra SPV ed OP, tranne che per le materie incluse nell'Atto A8 - anagrafe zootecnica, avviene con comunicazioni annuali sull'esito dei controlli effettuati da parte delle ASL all'OP, ma è in corso d'implementazione il Sistema Informativo

Nazionale Veterinario per la Sicurezza Alimentare (SINVSA). Su tale sistema confluiranno tutte le informazioni sui controlli ufficiali svolti dai Servizi veterinari territoriali e pertanto sarà possibile uno scambio di informazioni più rapido ed efficiente con le banche dati degli OO.PP. Il punto di contatto "virtuale" tra i sistemi informatici è rappresentato dall'identificativo fiscale dell'imprenditore agricolo-zootecnico che nella qualità di "detentore degli animali" è registrato sulla Banca Dati Nazionale (BDN) dell'anagrafe animale nonché inserito automaticamente su SINVSA. Gli aspetti tecnici sopradescritti, sono stati anticipati di recente dall'Accordo Stato-Regioni del 10 maggio 2012 tra AGEA, Ministero delle Politiche Agricole e Ministero della Salute, che individua tempi, procedure e CGO oggetto di scambio di informazioni tra OO.PP. regionali, e Servizi Veterinari Regionali; tali aspetti operativi saranno formalizzati attraverso una convenzione da stipulare a livello regionale tra Assessorati alla Agricoltura, Assessorati alla Salute e OO.PP. regionali. L'eventuale accertamento da parte dell'OP di comportamenti dell'imprenditore agricolo-zootecnico difformi dalle norme di "condizionalità", ovvero i CGO, comporta delle penalizzazioni sulle somme ricevute o da ricevere a titolo di aiuto comunitario. Di seguito vengono descritti brevemente le maggiori criticità legate all'applicazione delle normative previste dagli ATTI di interesse veterinario ed in particolare:

**Atto A8 - ANAGRAFE OVI-CAPRINA** Il Regolamento CE n. 21/ 2004 e le successive note ministeriali di chiarimento definiscono che, con decorrenza 2009, la corretta identificazione degli ovini e caprini e gestione della documentazione corredo debba basarsi su:

- Tutti gli ovini e caprini di età superiore a sei mesi (riproduttori e animali da rimonta) devono essere identificati con marca auricolare o eventualmente tatuaggio e bolo endoruminale;
- Tutti gli ovini e caprini fino ad 12 mesi di età possono essere movimentati in uscita dall'allevamento, se destinati alla macellazione, con marca auricolare semplificata (codice aziendale - color salmone);
- Tutte le movimentazioni da e per l'allevamento ed eventuali casi di morte o furto/smarrimento degli animali devono essere registrati sul registro di stalla cartaceo o informatizzato (eventualmente può essere considerato valido quello informatico su BDN);
- I mod. 4 (fogli rosa), eventualmente vidimati dal Servizio Veterinario, devono scortare tutte le movimentazioni di animali in entrata ed in uscita ed essere conservati dall'allevatore per almeno 5 anni.

I Servizi veterinari territoriali sono tenuti ad effettuare controlli relativi alla corretta applicazione delle norme sull'anagrafe ovi-caprina in almeno il 3% degli allevamenti all'anno e a inserire l'esito di tali controlli sulla BDN dalla quale sarà poi possibile per l'AGEA trarre tutte le informazioni di verifica necessarie.

**Atto B10 - UTILIZZO ILLECITO DI SOSTANZE AD AZIONE ORMONALE** (D.LGS 158/2006) Al fine di accertare eventuali usi illeciti di farmaci o di sostanze ad azione ormonale ed antiormonale (sincronizzazione dei calori) sugli animali produttori di alimenti per l'uomo il Ministero della Salute elabora annualmente il Piano Nazionale Residui sulla base degli esiti dei piani precedenti e dei censimenti delle attività di allevamento (produzione primaria) e di trasformazione primaria (macelli, caseifici, ecc). In attuazione di detta pianificazione i Servizi Veterinari territoriali eseguono i campionamenti previsti presso allevamenti, macelli e caseifici per verificare l'assenza di residui negli animali e nei loro prodotti che possano far ipotizzare trattamenti illeciti.

**Atto B11 - REGOLAMENTO CE N. 178/02 RINTRACCIABILITÀ E SICUREZZA ALIMENTARE** Il complesso di norme costituito dal reg. CE n. 178/02 e dai successivi regolamenti in materia di sicurezza alimentare da esso derivati, denominato abitualmente "pacchetto igiene", costituisce certamente il CGO più complesso per l'ampiezza del campo di applicazione in quanto coinvolge una serie di attività di cui spesso lo stesso allevatore non percepisce l'importanza, non solo ai fini del rispetto delle

norme sanitarie, ma anche per le possibili conseguenze economiche derivanti dal principio di "condizionalità". Per una migliore comprensione della "rivoluzione culturale" che il così detto "pacchetto igiene" ha comportato per le aziende zootecniche e per i Servizi Veterinari europei, è bene soffermarsi sui principi fondamentali inseriti in detto regolamento con il quale è stata anche istituita l'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) con sede a Parma.

- La sicurezza sanitaria di tutti gli alimenti destinati all'uomo (di origine animale o vegetale) può essere assicurata solo attraverso il controllo di tutti gli elementi che entrano a far parte della sua filiera produttiva secondo lo slogan ormai in uso "dai campi alla tavola". Il risvolto pratico di questo principio è che gli allevatori, cosiddetti "produttori primari", nonché i produttori agricoli di alimenti per gli animali, si trovano quasi sempre all'inizio di tali filiere produttive e pertanto pienamente inclusi nel concetto di sicurezza alimentare, rientrando a pieno titolo nella definizione di Operatore del Settore Alimentare (OSA) o del Settore Mangimi (OSM) a seconda dei casi;
- Per assicurare il conseguimento dei fini di sicurezza alimentare in filiere che spesso, anche per la globalizzazione di alcuni mercati, attraversano più continenti, è necessario che l'OSA assicuri la rintracciabilità dei propri prodotti; ovvero deve essere sempre possibile risalire dal prodotto finito a tutti i componenti della filiera che hanno contribuito alla fabbricazione dell'alimento, e viceversa.
- Per la prima volta viene sancito in modo chiaro ed inequivocabile che il produttore dell'alimento o del mangime e comunque tutti gli OSA o OSM sono i primi responsabili della sicurezza del prodotto e della conformità dello stesso alle disposizioni di legge vigenti. In conseguenza di questo principio, così detto di "responsabilità", gli operatori devono essere in grado dimostrare alla Autorità Competente (A.C.), attraverso procedure ed evidenze dei controlli effettuati, di operare sempre per il conseguimento della sicurezza alimentare e della conformità alla normativa.

I principi di sicurezza fissati dal Reg. CE n. 178/02, in particolare artt. 14 e 15, sono stati esplicitati da altri regolamenti comunitari, direttamente ed immediatamente applicabili in tutti gli Stati dell'Unione; quelli di maggior interesse per il settore ovino e caprino sono il Reg. CE n. 852/04 - requisiti generali d'igiene delle aziende di produzione primaria (gli allevamenti), il Reg. CE n. 853/04 con l'allegato II, Sezione IX interamente dedicato alla produzione di latte ed il Reg. CE n. 183/05 che tratta di tutta la filiera di produzione, commercializzazione e somministrazione degli alimenti per animali, ovvero mangimi, foraggi, e pascoli ove si alimentano gli animali. In particolare il Reg. CE n. 852/04 prevede l'obbligo per l'allevatore di comunicare alla A.C., ovvero la ASL, le sedi della propria attività e la tipologia di produzione; tale adempimento è di norma soddisfatto con la registrazione in anagrafe zootecnica dell'allevamento e dalla indicazione del "orientamento produttivo" (latte, carne o misto). Inoltre l'allevatore, in qualità di OSA, dovrà attenersi ai requisiti generali dell'Allegato I, con particolare riferimento al paragrafo II, punto 4, che tratta di igiene delle strutture di ricovero, di igiene e stato sanitario degli animali, lotta agli animali infestanti e letame.

Il punto più controverso è però costituito dai requisiti dell'art 4, paragrafo 3 "gli allevatori se necessario adottano... le procedure necessarie a raggiungere gli obiettivi..." ovvero la sicurezza alimentare attraverso l'adozione di procedure ispirate ai principi dell'HACCP.

La maggior parte delle nostre aziende, legate al territorio per l'approvvigionamento alimentare, con consistenze inferiori a 500 capi e non oltre 4-5 addetti, spesso familiari del titolare compresi uno o due operai stagionali e soprattutto con pratiche zootecniche che si ripetono pressoché costanti nel tempo, riesce a soddisfare il requisito normativo con una semplice registrazione degli eventi che riguardino soprattutto i requisiti dell'allegato I, ovvero l'alimentazione degli animali, i controlli sanitari, gli interventi di profilassi e terapeutici, gli interventi di manutenzione, igienizzazione e di lotta agli infestanti, la gestione dei reflui zootecnici. Tali registrazioni, unitamente alla verifica diretta delle attività produttive, sono spesso sufficienti al Veterinario addetto al controllo ufficiale, per avere un quadro chiaro della gestione dei rischi all'interno dell'allevamento. Considerata la maggiore complessità della attività di produzione latte e il correlato maggiore "rischio intrinseco" dell'alimento latte, gli allevamenti che producono latte, oltre ad essere iscritti in uno specifico elenco della BDN, dovranno attenersi al Reg. CE n. 853/04 che all'Allegato II, Sezione IX tratta i requisiti strutturali e soprattutto gestionali delle fasi di produzione, mungitura e conservazione del latte. Nell'allegato in particolare sono individuati i parametri igienico-sanitari, carica batterica totale (CBT) ed assenza di residui di sostanze inibenti (traccia di trattamenti con antibiotici), che consentono la libera commercializzazione del latte. Particolarmente importante e qualificante risulta questo aspetto non sempre adeguatamente percepito anche da parte degli allevatori. La normativa infatti attribuisce chiaramente

te all'allevatore la responsabilità di produrre un latte conforme ai limiti di CBT e di sostanze inibenti. Tali accertamenti, obbligatori anche per il latte destinato ai caseifici aziendali, possono essere svolti, su delega dell'allevatore, dall'acquirente del latte. Deve essere comunque chiaramente rilevabile dalla documentazione in azienda quale OSA (produttore o acquirente) dovrà effettuare gli accertamenti periodici sul latte e chi ne valuterà l'esito sulla base del calcolo della "media geometrica", ed infine chi dovrà comunicare all'A.C. eventuali non conformità.

Ai fini del soddisfacimento dei requisiti, è indispensabile che tutto ciò sia rilevabile dalla documentazione in possesso dell'allevatore.

**Atto B12** - prevenzione, controllo ed eradicazione di alcune encefalopatie spongiformi trasmissibili (Reg. CE n. 999/2001).

**Atto B13** - lotta contro l'afta epizootica (Direttiva 85/511/CEE).

**Atto B15** - lotta ed eradicazione della febbre catarrale degli ovini Blue tongue (Direttiva 2000/75/CE).

Per questi CGO gli adempimenti dell'allevatore si riducono in sostanza ad assicurare, come già previsto dal Regolamento di Polizia Veterinaria del 1956, la notifica al Servizio Veterinario territoriale di tutti i casi di morte o di sospetta malattia che si verificano nell'allevamento, nonché sottoporre gli animali ai controlli di monitoraggio previsti dai piani comunitari e nazionali per il controllo delle malattie specifiche riportate nei singoli Atti.

**Atti C18** - TUTELA DEL BENESSERE ANIMALE IN ALLEVAMENTO (D.LGS 146/2001). Le verifiche di conformità alle vigenti disposizioni in questo settore, spesso molto attenzionate dall'opinione pubblica, vengono svolte nell'ambito del Piano Nazionale Benessere Animale dai Servizi veterinari territoriali nella misura del 15% annuo degli allevamenti di consistenza superiore a 50 capi ovini o caprini. I controlli, sulla base di check-list unificate, sono volti essenzialmente ad accertare che le condizioni di allevamento, i ricoveri, la gestione degli animali con particolare riferimento alla alimentazione, abbeverata e cure, siano condotte in modo da non arrecare danni o peggiori sofferenze agli animali.

**CONCLUSIONI** - Una valutazione complessiva degli effetti del sistema delle "condizionalità" sul settore agricolo e zootecnico esula dagli obiettivi di questa relazione, è però certo che l'intendimento del legislatore è quello di penalizzare i produttori che non si adeguano alle norme comunitarie di settore. Tale considerazione acquista una particolare rilevanza per il settore dell'allevamento ovino e caprino se consideriamo che oggi le aziende traggono dagli aiuti comunitari una percentuale rilevante del proprio bilancio annuale e che quindi, a fronte di penalizzazioni o anche soltanto ritardi dei pagamenti comunitari, possono scaturire crisi di liquidità dell'impresa con seri rischi di fallimento. Nel prossimo futuro, grazie anche alla diffusione dei collegamenti informatici, assisteremo verosimilmente ad un miglioramento della qualità dei controlli e della rapidità delle verifiche, con un complessivo incremento dell'efficienza della erogazione degli aiuti comunitari, sia nel senso di più rapide liquidazioni delle somme, che di un maggior numero di penalizzazioni.

A tal proposito vanno considerati due aspetti di potenziale criticità, ovvero:

- i controlli veterinari sul territorio devono assicurare la massima uniformità di valutazione - in tal senso il Ministero della Salute e le Regioni, anche in ottemperanza Reg. CE n. 882/04, hanno attivato da circa tre anni una intensa attività di formazione del personale delle ASL e soprattutto di *audit* interni sulla organizzazione, capacità operative e conformità al Reg. CE n. 882/04 dei Servizi Veterinari territoriali;
- il sistema di penalizzazioni sugli aiuti comunitari concessi agli operatori deve essere strutturato secondo criteri trasparenti e di progressività rispetto sia alla gravità delle inadeguatezze o non conformità riscontrate dai Servizi veterinari, nonché ai tempi di ripristino delle condizioni di conformità attuati dall'OSA.

È comunque indubbio che il concreto rischio di penalizzazioni economiche sul fronte degli aiuti comunitari costituirà un forte stimolo per il settore ovi-caprino che porterà ad una ulteriore selezione degli allevamenti, ma anche, soprattutto per il settore latte, ad un miglioramento delle condizioni dello standard igienico-sanitario: premessa indispensabile per una valorizzazione commerciale dei prodotti in un contesto di tutela ambientale, benessere animale e sostenibilità delle produzioni.

## ■ Cross-compliance: veterinary public health issues

**Key words:** cross-compliance, public controls, sheep and goat farm.



**Sessione poster**

# Artrite-Encefalite Caprina (CAE) in allevamenti da latte nel territorio siciliano



S. AGNELLO<sup>1</sup>, G. PURPARI<sup>1</sup>, C. LO GIUDICE<sup>3</sup>, F. CAMPO<sup>1</sup>, G. CHIARACANE<sup>1</sup>,  
A. CONIGLIO<sup>1</sup>, A. STANCANELLI<sup>1</sup>, F. FELIZIANI<sup>2</sup>, S. DARA<sup>1</sup>, A. GUERCIO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Centro di Referenza Nazionale per lo studio dei Retrovirus, Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche

<sup>3</sup> Medico Veterinario libero professionista

**Parole chiave:** artrite-encefalite caprina, *Lentivirus*, Sicilia.

**INTRODUZIONE** - All'interno della famiglia *Retroviridae* si collocano gli Small Ruminant Lentiviruses (SRLVs) responsabili dell'Artrite - Encefalite Caprina (CAE) e della Visna Maedi degli ovini. Gli SRLVs sono un gruppo eterogeneo di virus di cui sono noti 5 genotipi (A-E). Nel gruppo A sono stati individuati 11 sottotipi (A1-A11), nel gruppo B 3 sottotipi (B1-B3) e nel gruppo E 2 sottotipi (E1-E2) (Grego et al. 2007; Giammarioli et al., 2011; Olech et al., 2012). Il virus si diffonde principalmente attraverso colostro e latte, in minor misura tramite sangue, saliva, e secrezioni respiratorie e genitali. L'infezione è per lo più asintomatica e pertanto tende ad essere sottostimata. Negli animali giovani si osserva una sintomatologia riferibile ad encefalite; nei soggetti adulti si presenta generalmente sotto forma di artrite e/o mastite, sinovite, borsite e più raramente polmonite (O.I.E., 2008). La CAE è stata segnalata più volte ed è maggiormente presente nei Paesi industrializzati (Bandeira et al., 2009; Nord et al., 1998; Gufler et al., 2007). In Sicilia attualmente rappresenta uno dei maggiori problemi dell'allevamento caprino, soprattutto nelle razze lattifere, determinando gravi danni economici. Recenti studi di prevalenza stimano la percentuale di distribuzione dell'infezione intorno al 60,6-63,3% (Feliziani et al., 2010).

**MATERIALI E METODI** - Dal 2009 al 2011 è stato condotto uno studio in allevamenti caprini ad indirizzo produttivo di latte, ubicati in un'area geografica della regione siciliana, comprendente le provincie di Agrigento, Caltanissetta, Enna e Catania. In totale sono state coinvolte 12 aziende (Fig. 1), alcune con sospetto clinico, che differivano per razze allevate (Camosciata delle Alpi, Girgentana, Maltese, Saanen), consistenza e tipologia di allevamento. Sono stati effettuati 1.576 prelievi ematici ed analizzati mediante una ELISA indiretta del commercio. Nelle aziende sieropositive sono stati, inoltre, prelevati campioni di latte, sui quali è stata eseguita estrazione del genoma virale, amplificazione genica e sequenziamento per l'identificazione del genotipo virale circolante, secondo protocolli accettati (Grego et al., 2007; Giammarioli et al., 2011).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I dati emersi dai controlli sierologici dell'intero gregge di ogni azienda hanno confermato il sospetto clinico e permesso di stabilire il relativo grado di prevalenza (Tab. 1). I risultati ottenuti mostrano l'elevata diffusione dell'infezione da *Lentivirus* nella popolazione caprina del nostro territorio; risultano, infatti, positive l'83,3% delle aziende saggiate ed il 50,2% dei capi, anche se differente è la pressione esercitata sulle diverse razze. Fra le razze autoctone (Girgentana 14%, Maltese

**Tabella 1** - Sieroprevalenza per CAEV.

Allevamenti	N° Totale Capi	N° Capi Positivi	% Infezione
1	525	486	92,6
2	171	46	27
3	195	184	94,4
4	230	33	14,3
5	155	0	0
6	121	6	5
7	41	4	9,8
8	7	0	0
9	22	3	13,6
10	28	2	7,1
11	46	18	39,1
12	35	9	25,7
<b>Totale</b>	<b>1.576</b>	<b>791</b>	<b>50,2</b>

8,6%) la prevalenza dell'infezione è relativamente bassa (10,9%) e la malattia viene segnalata con minore frequenza, probabilmente a causa del contatto con animali d'importazione. Quanto osservato potrebbe essere attribuito ad una maggiore resistenza di natura genetica. Un andamento decisamente differente è stato rilevato nelle razze cosmopolite (Camosciata delle Alpi, Saanen), con elevata prevalenza (80,4%) della CAE ed evidenti sintomi clinici (interessamento delle articolazioni, prevalentemente quelle carpiche, con difficoltà alla deambulazione; progressivo dimagrimento, fino alla cachessia; mastiti frequenti, con esiti sclerosanti e comparsa di asimmetrie mammarie; problemi respiratori negli adulti e rare forme nervose nei capretti). Gli animali con questa sintomatologia costituiscono, tuttavia, solo il 5-10% dei casi. Frequente la presenza concomitante negli animali affetti da CAE, sia in razze autoctone che non, di malattie sistemiche quali: Paratubercolosi, Micoplasmosi da *M. mycoides subsp. capri*, "Malattia degli Ascessi" da *C. pseudotuberculosis* e *S. aureus subsp. anaerobius*, Pasteurellosi. Dall'analisi filogenetica effettuata sui campioni di latte positivi, si evidenzia unicamente il genotipo virale B, sottotipo 1, largamente diffuso in Italia ed in Europa (Giammarioli et al., 2011).

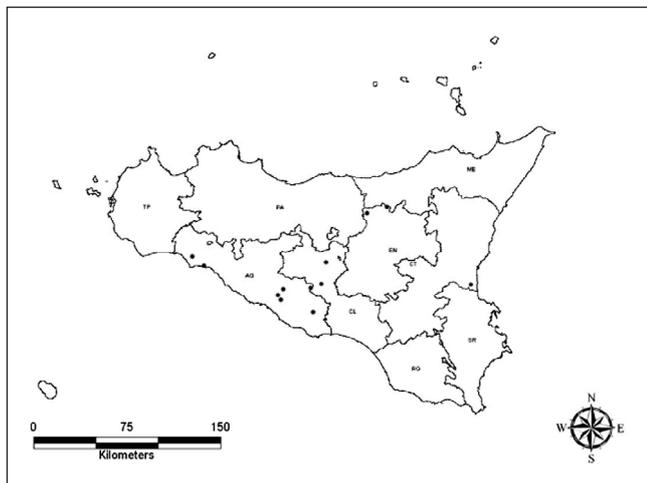
**CONCLUSIONE** - Questo studio conferma la diffusione endemica della CAE nel nostro territorio. Negli allevamenti a bassa prevalenza si possono ipotizzare programmi di controllo dell'infezione. Poiché non esistono, ad oggi, prospettive per la profilassi vaccinale, gli unici interventi possibili sono esclusivamente di tipo igienico-sanitario, con individuazione degli animali infetti e loro progressivo allontanamento dal gregge. La prevenzione neonatale è indispensabile per ottenere la qualifica di azienda indenne.

## ■ Caprine Arthritis-Encephalitis in Sicilian dairy herds

**Key words:** Caprine Arthritis-Encephalitis, *Lentivirus*, Sicily.

## Bibliografia

- Bandeira D.A. et al. (2009), *The Vet. J.*; 180: 399-401.  
 Feliziani F. et al. (2010), *Large Animal Review*; 16: 2-3.  
 Grego E. et al. (2007), *J. Gen. Virol.* 88(12): 3423-3427.  
 Giammarioli M. et al. (2011), *Virus Genes*; 43(3): 380-384.  
 Gufler H. et al. (2007), *Small Ruminant Research*; 73: 169-173.  
 Nord K. et al. (1998), *Small Ruminant Research*; 28: 115-121.  
 Olech M. et al. (2012), *Virus Research*; 163: 528-536.  
 O.I.E. Manual (2008), Sixth Edition, Volume II, Part 2, Section 2.7, Chapter 2.7.3/4.



**Figura 1** - Distribuzione geografica delle aziende.

# Descrizione di un caso di intossicazione cronica da ossalati di calcio in ovini, rilievi anatomopatologici e istologici



R. PULEIO, G.R. LORIA, A. TAMBURELLO, P. ZANGHÌ, I. VAZZANA, S. MIGNACCA, V. DI MARCO LO PRESTI

Istituto Zooprofilattico sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** ossalati, insufficienza renale cronica, pecore.

**INTRODUZIONE** - I depositi renali di ossalati di calcio negli ovi-caprini possono riconoscere nell'eziopatogenesi un'alimentazione ricca in ossalati e acido ossalico. In Sicilia è ormai nota la presenza di piante appartenenti alla famiglia delle Oxalidaceae (*Oxalis corniculata*, *latifolia*, *articulata*, *pes-caprae*, *purpurea* e *purpurata*), e delle Polygonaceae, cui appartiene il genere *Rumex*, con 8 specie segnalate a livello regionale (*R. acetosella*, *R. acetosa*, *R. sanguineus*, *R. crispus*, *R. bucephalophorus*, *R. intermedius* e le endemiche *R. aetnensis* e *R. nebroides*).

Un'abbondante ingestione di questi vegetali può provocare nefrotossicosi acuta seguita da insufficienza renale e aumentato rischio di mortalità. Tra le diagnosi differenziali va considerata un'altra possibile fonte d'intossicazione, rappresentata dall'ingestione di micotossine responsabili della contaminazione di mangimi e prodotte da miceti appartenenti alle specie *Aspergillus niger* e *Penicillium oxalicum*. In questo report viene descritto un caso di intossicazione cronica da ossalati avvenuto in un allevamento ovino.

**MATERIALI E METODI** - Nella primavera del 2011 veniva segnalata in un gregge al pascolo nella zona di Agrigento una episodica mortalità di ovini autoctoni adulti. L'allevatore riferiva che nel corso della stagione e di quella precedente, occasionalmente alcuni soggetti, mostravano segni di debolezza, anemia, presenza di edema nelle regioni declivi del collo e nella regione sottomandibolare. All'esame clinico, l'indice di body condition score (BCS) dei soggetti era particolarmente scadente e si osservava altresì un aumento del diametro trasverso della porzione ventrale dell'addome, con caratteristico aspetto "a botte". Tale reperto, unitamente alla reazione positiva alla prova di "succussione", era indicativo della presenza di ascite. Gli animali si presentavano letargici, anche se continuavano ad alimentarsi autonomamente e ruminavano. Le mucose apparenti si presentavano pallide e le indagini di laboratorio (esame ematochimico completo) indicavano una condizione di anemia arigerativa, microcitica associata a insufficienza renale (creatinina >4mg/dl e azotemia > 280 mg/dl).

La necropsopia veniva effettuata su due capi. Uno di questi mostrava un abbondante versamento nelle cavità sierose (pleurica, pericardica e peritoneale) che sottoposto ad indagini di laboratorio indicava la natura di trasudato modificato. L'esame anatomopatologico dei reni riferiva per entrambi un aspetto irregolare della superficie, che appariva rugosa, pallida (rene grinzoso) e di consistenza aumentata. Durante l'esame necroscopico si prelevavano porzioni di tessuto per l'esame istologico ed immunohistochimico, fissate in formalina tamponata al 10% e successivamente incluse in paraffina secondo le procedure convenzionali. Le sezioni ottenute al microtomo (di circa 4-5µ di spessore) venivano colorate con Ematossilina-Eosina.



Figure 1,2 - Macroscopia del rene.

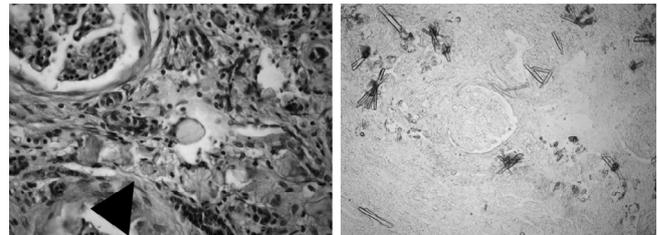


Figura 3 - EE 40x.

Figura 4 - Cristalli di ossalato di calcio.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Istologicamente si osservava a carico dei reni un'alterazione dell'architettura tissutale per la presenza di dilatazioni sia a carico dei capillari glomerulari che delle strutture tubulari, interessate da fenomeni degenerativi a diversi stadi di evoluzione quali, l'ispessimento della capsula di Bowman, la fibrosi periglomerulare fino ad arrivare alla glomerulo sclerosi con glomeruli ipocellulari e sclerolalini. In alcuni tubuli erano presenti delle strutture disposte a raggiera (Fig. 3) che venivano messe a fuoco con difficoltà per il loro spessore e che tendevano a occludere il lume.

La conformazione di tali strutture e le relative indagini istochimiche (Fig. 4) su sezioni paraffinate trattate con acido solforico (con formazione di solfato di calcio) permettevano di chiarire l'eziopatogenesi del quadro nefrosico sospettato: un accumulo cronico di ossalati di calcio. I cristalli di ossalato determinavano un'ostruzione a carico dei tubuli con relativa insufficienza renale oligurica.

La cronicizzazione del processo patologico favoriva l'alternarsi di processi rigenerativi con processi di flogosi interstiziale cronica che portava al decesso gli animali con lesioni di maggior gravità. Le indagini effettuate sui pascoli non hanno permesso di individuare il vegetale coinvolto, mentre le indagini condotte sul mangime hanno escluso una contaminazione da micotossine.

## Chronic oxalate intoxication: histopathology and histochemistry

**Key words:** Oxalate poisoning, nephrosis, sheep.

## Bibliografia

- Allison MJ, Littledike ET, James LF.(1977), Changes in ruminal oxalate degradation rates associated with adaptation to oxalate ingestion. J. Anim. Sci.; 45(5):1173-9.
- Angus KW, Hodgson JC, Hosie BD, Low JC, Mitchell GB, Dyson DA, Holliman A. (1989), Acute nephropathy in young lambs. Vet Rec. 1989 Jan 7;124(1):9-14.
- Aslani MR, Movassaghi AR, Najarnezhad V, Pirouz HJ, Bami MH.(2011), Acute oxalate intoxication associated to ingestion of eshnan (*Seidlitzia rosmarinus*) in sheep. Trop. Anim. Health Prod. 43(6):1065-8.
- Botha CJ, Truter M, Bredell T, Lange L, Mülders MS.(2009), Putative *Aspergillus niger* induced oxalate nephrosis in sheep. J.S.Afr.Vet.Ass; 80(1):50-3.
- García y Santos C, Pereira R, Etcheberry G, Goyen JM, Pérez W, Capelli A, Alonso E, Ruiz-Díaz A, Riet-Correa F.(2012). Enzootic calcosinosis caused by *Nierembergia rivularis* in sheep. J. Vet. Diagn. Invest. 24(2):423-6.

# Presenza di *Brucella* spp. in formaggi tipici siciliani e implicazioni di sanità pubblica



C. CARDAMONE, V. ALIO, S. REALE, C. PIRAINO, G.R. LORIA, A.M. DI NOTO

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** *Brucella* spp., formaggi.

**INTRODUZIONE** - In Italia ed in particolare nelle regioni del Sud (Sicilia, Calabria, Campania e Puglia) la Brucellosi continua a rappresentare uno dei più rilevanti problemi di sanità pubblica. Nel 2009 sono stati notificati n. 167 casi di brucellosi umana di cui il 50,9% in Sicilia. Nel 2006 il Ministero della Salute emanava l'O.M. del 14/11/06 con la quale adottava in queste regioni misure straordinarie di eradicazione della brucellosi; tra le disposizioni, l'art. 16 dell'O.M. prevede che il Servizio Veterinario locale effettui controlli mensili su campioni di latte e di prodotti lattiero-caseari nei caseifici. Il consumo di latte crudo e formaggi freschi ottenuti da latte non sottoposto a trattamento termico rappresentano infatti la principale fonte di infezione per la popolazione. Scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la presenza di *Brucella* spp. in campioni di latte crudo e formaggi tipici siciliani ottenuti da latte crudo e valutare il ruolo svolto da questi nella trasmissione della malattia all'uomo.

**MATERIALI E METODI** - Nel periodo gennaio 2011- maggio 2012 sono stati analizzati complessivamente n. 284 campioni di cui n. 114 di latte ovino di massa, n. 19 di tuma, n. 109 di primo sale, n. 13 di pecorino, n. 8 di provola e n. 21 di ricotta. I campioni sono stati prelevati presso caseifici della provincia di Trapani (n. 235), Messina (n. 14), Palermo (n.7) ed Agrigento (n.28) dai servizi veterinari delle Aziende Sanitarie Provinciali (ASP). I campioni di formaggio sono stati sottoposti alla determinazione del pH, acqua libera (Aw) e *Brucella* spp. La ricerca di *Brucella* spp. è stata condotta su 10 ml di latte e su 50 g di formaggio secondo la metodica O.I.E (*Manual of Diagnostic Test and Vaccines for Terrestrial Animals* Ed. 2008/Vers.2009). Le brodocolture dei formaggi risultati positivi sono state sottoposte a *Real Time PCR* sviluppata su *Rotor gene* (Qiagen). È stata preparata una curva di taratura a partire da colture pure del ceppo *Brucella melitensis* ATCC D78. Per l'individuazione del DNA target, con l'ausilio del software *Primer express* (Applied Biosystems), sono stati disegnati una coppia di primers e una sonda taqman necessari all'amplificazione di un frammento di DNA di *Brucella* spp. L'amplificato ricade in una piccola sequenza del gene per l'RNA 16S e risulta lungo 62 bp.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - n. 4 formaggi di Primo sale (1,4%), prodotti presso caseifici della provincia di Trapani (Marsala e Mazara del Vallo), sono risultati positivi per *Brucella* spp., mentre tutti i campioni di latte esaminati sono risultati negativi. Quest'ultimo dato potrebbe verosimilmente essere attribuito alla bassa concentrazione di *Brucella* spp. eventualmente presente in alcuni dei campioni esaminati. Infatti la miscelazione di latte proveniente da differenti animali (latte di massa) comporterebbe una diluizione del microrganismo patogeno presente nel latte di alcuni capi infetti sfuggiti ai controlli veterinari. I formaggi freschi ottenuti da latte crudo infetto, invece, possono contenere elevate concentrazioni di Brucelle in quanto durante la lavorazione il microrganismo presente nel latte viene inglobato nel coagulo e concentrato nel formaggio. Bisogna comunque sottolineare che i campioni di latte esaminati verosimilmente non erano riferibili a quelli utilizzati nella produzione del formaggio che è risultato essere contaminato da *Brucella* spp. I ceppi di *Brucella* spp. isolati sono stati identificati come *B. melitensis* biovar 3 che, come riportato da alcuni autori (Marianelli C. et al., 2007), è il biotipo più frequentemente isolato in Sicilia. *B. melitensis* riveste un significativo ruolo epidemiologico in quanto rappresenta la specie più virulenta essendo infatti responsabile delle forme acute più gravi nell'uomo. *B. melitensis* è stato responsabile del 99% di casi di brucellosi umana verificatisi in Italia tra il '70 e '90 (De Massis, et al., 2005). I valori di pH dei campioni risultati positivi variavano nell'intervallo: 5,5 - 5,43 mentre il valore di Aw, nei 4 formaggi, era di 0,96. Tali valori permettono la sopravvivenza della *Brucella* spp. per diverse settimane; *Brucella* spp. infatti sopravvive più di 4 settimane a pH superiori o uguali a 5 mentre viene inattivata in meno di 4 ore a pH compresi fra 3,0 - 3,5 (Corbel, 2006). Neanche la salatura è in grado di distruggerla, si è visto, infatti, che la *B. melitensis* sopravvive almeno 10 settimane in salamoia al 10% (Koulikovskii et al., 1984). È inoltre da sottolineare che gli isolamenti di *Brucella* spp. sono stati ottenuti in formaggi prodotti nel mese di Febbraio, Marzo e Giugno, a conferma di quanto riportato in letteratura, riguardo l'anda-

mento stagionale dei casi di brucellosi umana. Questo periodo, infatti, coincide con la stagione dei parti negli allevamenti ovi-caprini estensivi della maggior parte dei paesi europei (EFSA, 2009) e rappresenta la fase di maggiore rischio riguardo l'eliminazione di brucelle, nel caso di allevamenti infetti. In riferimento al metodo di analisi è da evidenziare come il metodo microbiologico sia un metodo che prevede tempi di analisi piuttosto lunghi (fino a 7 settimane) e la sua sensibilità dipende dalla vitalità e dal numero di microrganismi presenti nel campione; inoltre la presenza di una flora contaminante può rendere l'isolamento di *Brucella* spp. piuttosto difficoltoso. Il metodo risulta essere un metodo specifico e l'eventuale positività con altri metodi di screening, necessita la conferma con il metodo microbiologico. Per quanto riguarda le indagini biomolecolari sono stati calcolati per i campioni analizzati, livelli di contaminazione compresi tra 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> batteri per ml di brodo. Nei nostri test si è ravvisato l'effetto livellante sulla concentrazione, dato dalla coltura. La quantificazione ha permesso di evidenziare la vitalità delle brucelle nel corso del periodo d'incubazione, ma non di aggiungere informazioni sul livello di contaminazione iniziale dell'alimento.

**CONCLUSIONI** - Dati di letteratura hanno evidenziato come alcuni prodotti lattiero caseari possano rappresentare fonte di infezione per l'uomo, ma pochi sono i dati bibliografici relativi alla contaminazione di tali prodotti in Italia ed in particolare in Sicilia. I risultati ottenuti confermano come, tra i formaggi tipici siciliani, il *Primo sale* possa rappresentare un potenziale rischio per il consumatore in quanto la tradizionale tecnica di produzione e le caratteristiche del prodotto (pH e Aw) permettono alle brucelle di rimanere vive e vitali anche per lungo tempo. L'utilizzo di latte crudo non contaminato rappresenta, quindi, un requisito igienico-sanitario obbligatorio, così come previsto dal Regolamento 853/2004 che stabilisce che il latte destinato alla produzione di formaggi deve provenire da allevamenti indenni o ufficialmente indenni da brucellosi o se provenienti da animali negativi di allevamenti infetti deve essere sottoposto a trattamento termico. Le positività da noi riscontrate nei campioni di Primo sale lasciano quindi ipotizzare il non rigoroso rispetto dei parametri di trattamento termico del latte impiegato per la produzione dei formaggi. Inoltre, è da sottolineare come l'utilizzo di latte potenzialmente contaminato possa rappresentare una fonte di contaminazione secondaria dei formaggi durante le fasi di produzione e commercializzazione. A tal proposito è quindi estremamente importante una corretta gestione del rischio attraverso lo sviluppo di attenti piani HACCP e la rigorosa verifica punti critici di controllo.

## ■ Occurrence of *Brucella* spp. in typical Sicilian cheeses and its public health implication

**Key words:** *Brucella* spp., cheese.

## Bibliografia

1. Corbel MJ. (2006), Brucellosis in humans and animals; Geneva (Switzerland): World Health Organisation.
2. De massis F, Di Girolamo A., Petrini A., Pizzigallo E., Giovannini A. (2005), Correlation between animal and human brucellosis in Italy during the period 1997-2002; Clin microbiol infect 11, 632-636.
3. European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; EFSA Journal 2011; 9(3):2090. [378pp.] doi:10.2903/j.efsa.2011.2090. Available online: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
4. Koulikovskii A, Mantovani A, Toti L. (1984) Brucellosis in the sphere of infections of food origin. Ann. Ist. Sup. Sanita. 20(4), 353-362
5. Marianelli C., Graziani C., Santangelo C., Xibilia M. T., Imbriani A., Amato R., Neri D., Cuccia M., Rinnone S., Di Marco V., Ciuchini F. (2007), Molecular epidemiological and antibiotic susceptibility characterization of *Brucella* isolates from humans in Sicily, Italy; J Clin Microbiol. 45(9), 2923-2928.

# Caratterizzazione nutrizionale della carne di agnelli appartenenti alla popolazione "Rocche del Crasto". Risultati preliminari



A. DI ROSA<sup>1</sup>, S. SCIANÒ<sup>2</sup>, M.E. FURFARO<sup>3</sup>, G. SPARTÀ<sup>4</sup>, V. PRUITI<sup>4</sup>, A. ZUMBO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Morfologia, Biochimica, Fisiologia e Produzioni Animali, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario Annunziata, 98168 Messina

<sup>2</sup> Libero Professionista

<sup>3</sup> Consorzio di Ricerca Filiera Carni, Polo Universitario Annunziata, 98168 Messina

<sup>4</sup> Assessorato alle risorse Agricole e Alimentari - Regione Siciliana

**Parole chiave:** biodiversità, agnelli "Rocche del Crasto", qualità della carne.

**INTRODUZIONE** - La conservazione e la valorizzazione delle razze e delle popolazioni autoctone, rappresentano oggi un importante obiettivo per il mantenimento della biodiversità locale. Pertanto negli ultimi decenni, si è reso opportuno mettere in atto delle strategie di difesa e differenziazione di prodotti di qualità, frutto di un "ambiente di produzione", che deve possedere delle proprietà sensoriali riconoscibili che lo contraddistinguano dagli altri. In quest'ottica è nato il progetto di ricerca dal titolo: "Biodiversità Ovis Rocche del Crasto" condotto dall'Assessorato Regionale delle Risorse Agricole e Alimentari della Regione Sicilia; all'interno del progetto, volto a studiare gli animali appartenenti alla popolazione "Rocche del Crasto", allevate nel territorio nebroideo e che rappresentano una variante del tipo genetico "Pinzirita", sono state valutate le caratteristiche della carcassa e la qualità della carne di agnelli di entrambi i sessi macellati a 180 giorni.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata condotta nel comune di Alcara Li Fusi (ME). Sono stati utilizzati 50 agnelli (25 maschi e 25 femmine) appartenenti alla popolazione "Rocche del Crasto", di 30 giorni di età. Gli animali sono stati alimentati al pascolo con integrazione di mangime concentrato formulato per le varie fasi di accrescimento. Gli agnelli, settimanalmente, sono stati individualmente pesati. Al 180° giorno della prova gli agnelli, previa pesatura, sono stati macellati. Le carcasse divise in mezzene sono state pesate, refrigerate (4°C) e su ciascuna mezzena, a livello del muscolo *Longissimus dorsi* (LD) è stato rilevato il valore del pH a 45 minuti e a 24 ore dalla macellazione. Dopo 24 ore di refrigerazione è stato effettuato il prelievo del taglio campione (ASP, 1991) per la determinazione di grasso, parte magra ed osso. Per le determinazioni fisiche (ASP, 1996), sul muscolo LD è stato rilevato: pH, calo peso a caldo (*Cooking loss*), tenerezza (WBSF) e colore secondo il sistema CIE (1986) ( $L^*$ ,  $a^*$ ,  $b^*$ ). Le analisi chimiche sono state effettuate secondo quanto indicato dalle metodiche AOAC (2005): umidità (950.46), proteine grezze (PG) (981.10), lipidi grezzi (LG) (991.36), ceneri (920.153). Per la determinazione del profilo acido, è stato utilizzato un gascromatografo equipaggiato con un detector FID

**Tabella 1** - Rilievi post mortem secondo il sesso (media±d.s.,P). PVM Peso vivo alla macellazione; PCC Peso carcassa a caldo; LC Lunghezza carcassa; PC Profondità carcassa.

Rilievi	Maschi	Femmine	P
PVM (kg)	31,50±0,71	31,75±3,89	ns
PCC (kg)	16,80±0,71	16,65±3,89	ns
resa	52,81±3,98	53,18±4,29	ns
pH <sub>45</sub> LD	6,7±0,4	6,8±0,14	ns
pH <sub>24</sub> LD	5,5±0,42	5,6±0,11	ns
LC(cm)	60±0,04	57±0,02	<0,0001
PC (cm)	19±1,41	18±0,04	ns
IC	0,28±0,03	0,27±0,02	ns
peso spalla (kg)	1,45±0,07	1,8±0,92	ns
peso coscia (kg)	2,85±0,92	2,45±0,42	ns
taglio campione (kg)	0,60±262,34	0,45±74,25	ns
grasso (%)	20,49±6,84	23,96±12,87	ns
muscolo (%)	55,01±28,13	53,41±9,99	ns
ossa (%)	24,50±3,34	22,62±3,25	ns

**Tabella 2** - Composizione chimica, fisica, acidica e indici di qualità nel muscolo LD (media ± d.s., P). M maschi, F femmine.

Parametri	M	F	P
umidità (%)	74,44±2,14	73,05±0,38	ns
PG (%)	22,38±0,85	23,06±0,45	ns
LG (%)	2,08±1,38	2,71±0,12	ns
ceneri (%)	1,10±0,07	1,18±0,09	ns
$L^*$	40,18±1,51	39,54±2,94	ns
$a^*$	12,01±11,64	11,64±0,22	ns
$b^*$	7,42±0,92	8,67±1,00	ns
calo peso (%)	31,86±1,05	32,35±1,39	ns
Tenezza (kgF*cm <sup>-2</sup> )	2,49±0,26	2,75±0,07	ns
SFA	50,62±2,32	51,97±1,87	ns
MUFA	43,49±3,32	42,36±2,46	ns
PUFA n-3	0,58±0,09	0,66±0,32	ns
PUFA n-6	5,31±1,10	5,01±0,27	ns
PUFA/SFA	0,12±0,01	0,11±0,01	ns
n-6/n-3	9,15±0,04	7,59±0,06	ns
IA	0,76±0,07	0,83±0,10	ns
IT	1,92±0,19	2,00±0,07	ns

(Flame Ionization Detector). I risultati sono stati espressi in percentuale sul totale degli acidi grassi identificati. Sulla base degli acidi grassi identificati, sono stati calcolati gli indici di qualità aterogenico (IA) e trombogenico (IT) utilizzando le equazioni proposte da Ulbricht e Southgate, (1991). Tutti i dati sono stati sottoposti ad analisi della varianza, valutando l'effetto del sesso sulla performance e sulla qualità della carne e del grasso (SAS, 2001).

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - I risultati sono mostrati nelle tabelle 1 e 2. Quanto emerso concorre a caratterizzare la qualità della carne derivata da una popolazione ancora da studiare.

Lavoro eseguito con finanziamento Regione Siciliana- U.O. SOAT Castel-Umberto (ME).

## Meat quality of "Rocche del Crasto" lambs. Preliminary results

**Key words:** biodiversity, Rocche del Crasto lambs, meat quality.

## Bibliografia

- A.O.A.C., (2005). Official Methods of Analysis, 18th ed. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA, USA.
- ASP - Associazione Scientifica di Produzione Animale (1991). Metodologie relative alla macellazione degli animali di interesse zootecnico ed alla valutazione e dissezione della loro carcassa. ISMEA, Roma:39-45.
- ASP - Associazione Scientifica di Produzione Animale (1996). Metodiche per la Determinazione delle Caratteristiche Qualitative della Carne. University of Perugia, Perugia: 69-70.
- CIE - Commission International d'Éclairage (1986). Colorimetry, 2nd ed. Publication CIE 15.2, Vienna.
- SAS (2001). User's Guide: Statistics. Version 8.2, Cary, USA.
- Ulbricht, T.L.V., Southgate, D.A.T. (1991). Lancet 338: 985-992.

# Relazioni tra BCS, misurazioni somatiche e composizione corporea in pecore Sarde



G. GAIAS, M.G. SERRA, O. BOAVENTURA NETO, A. CANNAS

Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari, Italia

**Parole chiave:** pecore da latte, composizione corporea, *body condition score*, misure somatiche.

**INTRODUZIONE** - Il metodo del *body condition score* (BCS) è di gran lunga il metodo in vivo più utilizzato per stimare le riserve corporee. Negli ovini la scala più usata è quella di Russel et al. (1969), originariamente sviluppato per razze da carne e lana. Esso può anche essere accompagnato o sostituito da misurazioni somatiche (Ronchi et al., 1993; Afolayan et al., 2006). La relazione fra BCS e composizione corporea richiede però di essere validata con la misurazione post-mortem della composizione chimica degli animali. Nel caso degli ovini, queste misurazioni sono state condotte prevalentemente su razze da carne o da lana, con pochi dati disponibili per le razze da latte (Cannas e Boe, 2003). Questo studio è stato quindi condotto per valutare l'accuratezza del metodo del BCS nella stima della composizione corporea in pecore da latte.

**MATERIALI E METODI** - Per lo studio sono state scelte, sulla base del BCS, 24 pecore di razza Sarda, quattro per ogni classe di BCS da 2 a 3.25 (scala da 0-5 Russel et al., 1969). Alle pecore, che avevano un peso vivo (PV) compreso tra 29 e 55 kg, è stata misurata, con un bastone di *Lydtin*, la larghezza toracica (LT) dietro le scapole. Alla macellazione la carcassa e tutti i componenti viscerali sono stati separati, congelati e finemente tritati. Sui campioni prelevati sono state condotte le analisi chimiche per la determinazione di sostanza secca, grasso, proteina grezza e ceneri. Post-mortem è stato misurato lo spessore del grasso della coda (GC) alla 1<sup>a</sup> vertebra coccigea, quantificato il peso del grasso renale (GR) e condotta l'analisi chimica dei lipidi e delle proteine corporee totali. La relazione fra BCS e le altre variabili misurate è stata studiata con l'analisi delle correlazioni e con regressioni lineari e curvilinee.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La concentrazione di grasso corporeo è aumentata, mentre quella di proteina è diminuita, passando da BCS 2.0 a BCS 3.0, dopo di che i valori si sono stabilizzati (Tabella 1). La relazione tra percentuale di grasso corporeo e BCS ha avuto un andamento curvilineo, con saturazione a BCS 3 ( $R^2=0.76$  e  $0.96$  per dati individuali e medie di gruppo, rispettivamente). Anche le altre variabili misurate hanno avuto una relazione curvilinea con la percentuale di grasso corporeo, con saturazione ai valori più alti delle stesse variabili. In particolare, la relazione tra la percentuale di grasso corporeo e LT ha mostrato un andamento curvilineo, con ampia variazione ( $R^2 = 0.34$ ) considerando i dati individuali ed invece elevata associazione considerando la media per classe di BCS ( $R^2 = 0.94$ ; Fig. 1). La relazione tra percentuale di grasso corporeo e kg di GR ha mostrato un andamento curvilineo, con un'associazione più elevata, soprattutto con i dati individuali, rispetto alla precedente ( $R^2 = 0.83$  e  $0.99$  per dati individuali e medie di gruppo, rispettivamente). Un andamento molto simile è stato osservato tra la percentuale di grasso corporeo e GC (mm) ( $R^2 0.84$  e  $0.99$ ) (Fig. 2). La forte associazione osservata tra GC e la percentuale di grasso corporeo suggerisce di usare lo spessore della coda in vivo per stimare le fluttuazioni di composizione corporea, così come suggerito in altri studi (ad es. Negussie et al., 2000 e Ermias et al., 2003).

**CONCLUSIONI** - In conclusione, dallo studio emerge che LT e GC hanno un'elevata associazione con la composizione in grasso e potrebbero essere associate al BCS per migliorare la stima delle riserve corporee in pecore di razza Sarda. Il fatto che la percentuale di grasso e proteina corporee non variasse con valori di BCS superiori a 3 suggerisce che i criteri utilizzati per definire il punteggio BCS possano non essere adatti a descrivere le variazioni di riserve corporee in pecore Sarde con elevato stato di ingrassamento.

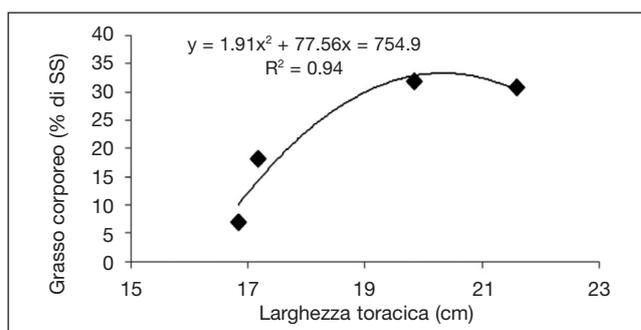
## Relationships among BCS, body composition, and somatic measures in mature Sarda dairy ewes

**Key words:** dairy sheep, body composition, body condition score, somatic measures.

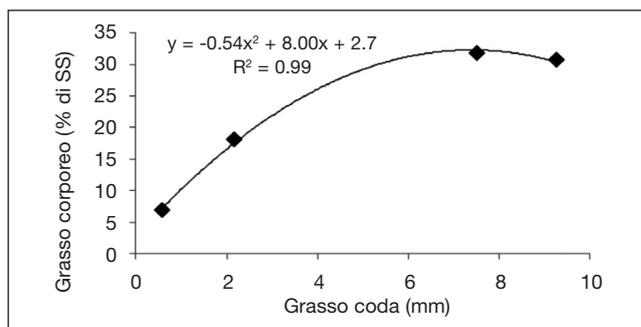
**Tabella 1** - Composizione chimica del corpo vuoto (carcassa + testa + componenti viscerali) in pecore Sarde divise per classi di BCS.

Variabili	Body condition score			
	2.00	2.50	3.00	3.25
Acqua (% CV)	72.23 <sup>A</sup>	62.11 <sup>B</sup>	51.42 <sup>C</sup>	51.14 <sup>C</sup>
Proteina grezza (% CV)	16.06 <sup>A</sup>	15.26 <sup>A</sup>	12.89 <sup>B</sup>	12.32 <sup>B</sup>
Grasso (% CV)	6.90 <sup>c</sup>	18.12 <sup>b</sup>	31.81 <sup>a</sup>	30.75 <sup>a</sup>
Generi (% CV)	5.37 <sup>A</sup>	5.28 <sup>A</sup>	4.25 <sup>AB</sup>	3.84 <sup>B</sup>

CV: Corpo vuoto. <sup>A,B,C</sup> Medie tra le righe con apici diversi differiscono significativamente ( $P<0.01$ ). <sup>a,b,c</sup> Medie tra le righe con apici diversi differiscono significativamente ( $P<0.05$ ).



**Figura 1** - Relazione tra % di grasso e larghezza toracica (LT).



**Figura 2** - Relazione tra % di grasso e grasso coda (mm).

## Bibliografia

- Afolayan R.A., Adeyinka I.A., Lakpini C.A.M. (2006). The estimation of live weight from body measurements in Yankasa sheep. *Czech J. Anim. Sci.* 51, (8): 343-348.
- Cannas A., Boe F. (2003). Prediction of the relationship between body weight and body condition score in sheep. *Ital. J. Anim. Sci.*, 2 (Suppl. 1), 527-529.
- Ermias E., Rege J.E.O. (2003). Characteristics of live animal allometric measurements associated with body fat in fat-tailed sheep. *Liv. Prod. Sci.* 81:271-281.
- Negussie, E., Rottman, O.J., Pirchner, F., Rege, J.E.O., (2000). Allometric growth coefficients and partitioning of fat depots in indigenous Ethiopian Menz and Horro sheep breeds. In: Merkel, R.C., Abebe, G., Goetsch, A.L. (Eds.), *Workshop proceedings. Langston University, OK, The Opportunities and Challenges of Enhancing Goat Production in East Africa*. E (Kika) de la Garza Institute for Goat Research, Langston, OK, pp. 151-163.
- Ronchi B., Bernabucci U., Bertoni G. (1993). Valutazione comparata del metodo body condition score (BCS) nelle razze ovine Sarda e Lacaune. *Proc. XLVII Congress S.I.S.VET (Italy)* 88: 1985-1989.
- Russel, A. J. E., Doney, J. M., Gunn, R. G. 1969. Subjective assessment of fat in live sheep. *J. Agric. Sci., Cambridge* 72, 451-454.

# Profilo acidico di latte e liquido ruminale di pecore alimentate con piante aromatiche



M.G. MANCA<sup>1</sup>, R. BOE<sup>1</sup>, R. MANCA<sup>1</sup>, M. DECANDIA<sup>2</sup>, M. ACCIARO<sup>2</sup>, A. CANNAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari, Italia

<sup>2</sup> Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali, Agris Sardegna, Olmedo, Italia

**Parole chiave:** pianta aromatica, acidi grassi, latte, liquido ruminale

**INTRODUZIONE** - Gli estratti vegetali delle piante aromatiche contengono metaboliti secondari, come gli oli essenziali, che hanno proprietà antimicrobiche e potrebbero modulare l'attività dei batteri ruminali. In alcuni studi l'utilizzo di oli essenziali ha modificato il processo di bio-idrogenazione ruminale (BH) degli acidi grassi (AG), determinando un aumento di AG del latte potenzialmente benefici per la salute umana (Benchaar et al., 2006, Patra, 2011). L'obiettivo di questo lavoro era di valutare l'effetto della somministrazione, di tre piante aromatiche sul profilo acidico del liquido ruminale e del latte di pecore in lattazione.

**MATERIALI E METODI** - Ventiquattro pecore Sarde in lattazione sono state suddivise in 3 gruppi omogenei. A ciascuno è stata assegnata una pianta aromatica (*Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*), da testare con 3 diversi dosaggi (sulla SS: 200 g/d; 125 g/d; 50 g/d) ed un controllo (0 g/d), secondo uno schema a quadrato latino 4 x 4 con due repliche per trattamento e rotazioni ogni due settimane. I quadrati latini sono stati condotti in parallelo. Campioni individuali di latte (prelevati mediante dei lattometri) e liquido ruminale (prelevati mediante sonde esofagee scartando i primi 50cc di campione), sono stati raccolti ogni due settimane e sono stati analizzati per la determinazione del profilo acidico del latte (Nudda et al., 2005) e del liquido ruminale (Kramer et al., 1997). I dati sono stati sottoposti ad ANOVA utilizzando la specie botanica, la dose e il periodo di campionamento come fattori fissi.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La specie botanica somministrata ha influenzato significativamente tutti i gruppi di AG del latte presi in considerazione (Tab. 1), eccetto gli AG trans (TFA). L'effetto della dose utilizzata è stato, invece, particolarmente evidente solo per gli AG ramificati (BCFA), per gli AG polinsaturi della serie omega 3 (PUFA n-3) e per la somma degli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA). In tutti i casi in cui l'effetto dose era significativo, c'è stato, rispetto al gruppo di controllo, un effetto proporzionale alla dose utilizzata. La somministrazione di piante aromatiche sembra, quindi, rallentare il processo di BH di C18:2 n-6 e C18:3 n-3 in maniera proporzionale alla dose utilizzata, come risulta da un accumulo di prodotti intermedi quali il C18:1 t11, che è aumentato (P<0,001) da 0,72 g/100g di FAME nel gruppo controllo a 0,94 g/100g di FAME nel gruppo che riceveva la dose più elevata. Anche l'aumento (P<0,001) del c9, t11 CLA da 0,50 g/100g di FAME nel controllo a 0,62 g/100g di FAME nel gruppo a cui veniva somministrata la dose maggiore suggerisce un rallentamento del processo di BH, poiché il CLA a livello ruminale è un prodotto intermedio di tale processo. L'effetto del periodo di rilievo è risultato statisticamente significativo per tutti i gruppi di AG considerati. La composizione acidica del liquido ruminale (Tab. 2) è stata influenzata significativamente dalla specie botanica, dal periodo di campionamento e dalla dose utilizzata solo per quanto riguarda i contenuti dei BCFA e dei PUFA n-3. Anche i risultati a livello ruminale suggeriscono un effetto proporzionale alla dose utilizzata, come dimostra l'aumento dei BCFA, che sono considerati indicatori della funzionalità ruminale, da 6,44 g/100g di FAME nel controllo a 7,18 g/100g di FAME nel gruppo con la dose maggiore.

**CONCLUSIONI** - I risultati di questo studio evidenziano una possibile alterazione dell'attività dei microrganismi ruminali a seguito della somministrazione di piante aromatiche. La specie botanica somministrata ha influenzato fortemente la composizione acidica del latte, anche se le concentrazioni di AG con effetti benefici sulla salute umana (in particolare CLA) sono risultate mediamente basse in tutti i gruppi.

**Tabella 1** - Effetto di pianta, dose e periodo sul profilo acidico (g/100 g di FAME) del latte.

PIANTA	Acidi Grassi (g/100g di FAME)						
	SFA	MUFA	BCFA	TFA	PUFA n3	PUFA n6	CLA totali
Melissa	77,45 <sup>a</sup>	18,15 <sup>b</sup>	2,71	1,26	0,89 <sup>b</sup>	2,06 <sup>b</sup>	0,86 <sup>b</sup>
Ocimum	76,42 <sup>ab</sup>	18,94 <sup>ab</sup>	2,68	1,11	0,98 <sup>b</sup>	2,11 <sup>b</sup>	0,84 <sup>b</sup>
Thymus	75,79 <sup>b</sup>	19,17 <sup>a</sup>	2,72	1,18	1,04 <sup>a</sup>	2,42 <sup>a</sup>	0,93 <sup>a</sup>
Fattore	P <						
pianta	0,001	0,03	0,04	NS	0,001	0,001	0,021
dose	NS	NS	0,001	NS	0,001	NS	0,001
periodo	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001

a,b nella stessa colonna = P<0,05.

**Tabella 2** - Effetto di pianta, dose e periodo sul profilo acidico (g/100g di FAME) del liquido ruminale.

PIANTA	Acidi Grassi (g/100g di FAME)					
	SFA	MUFA	BCFA	TFA	PUFA n3	PUFA n6
Melissa	74,10	14,62	7,25 <sup>a</sup>	4,32	1,63 <sup>b</sup>	8,30
Ocimum	74,47	14,07	6,92 <sup>ab</sup>	4,03	2,02 <sup>a</sup>	7,97
Thymus	75,38	13,59	6,49 <sup>b</sup>	4,19	1,68 <sup>b</sup>	8,05
Fattore	P <					
pianta	NS	NS	0,001	NS	0,001	NS
dose	NS	NS	0,04	NS	0,001	NS
periodo	NS	NS	0,05	NS	0,001	NS

a,b nella stessa colonna = P<0,05.

Ringraziamenti: ricerca finanziata dal progetto UE TECHeese (Coordinatrice prof. M.I. Berruga; project 243638).

## ■ Fatty acid composition of milk and rumen fluid of Sarda sheep fed aromatic plants

**Key words:** aromatic plant, fatty acids, milk, rumen fluid.

## Bibliografia

- Benchaar C., Petit H.V., Berthiaume R., Whyte T.D., Chouinard P.Y. 2006. J. Dairy Sci.; (89):4352-4364.
- Kramer J.K.G., Fellner V., Dugan M.E.R., Sauer F.D., Mossoba M.M., Yurawecz M.P. 1997. Lipids; (32):1219-1228.
- Nudda A., McGuire M.A., Battacone G., Pulina G. 2005. J. Dairy Sci.; (88):1311-1319. Patra A.K., 2011. Asian J. Anim. Vet. Adv.; (6):416-428.

# Efficacia di Toltrazuril e Diclazuril nel controllo della eimeriosi degli agnelli



M. DIAFERIA<sup>1</sup>, F. VERONESI<sup>1</sup>, G. MORGANTI<sup>1</sup>, L. NISOLI<sup>2</sup>, D. PIERGILI FIORETTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Sezione di Parassitologia, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Bayer Sanità Animale, Milano

**Parole chiave:** eimeriosi, agnelli, Toltrazuril, Diclazuril.

**INTRODUZIONE** - La coccidiosi ovina è una patologia sostenuta da protozoi del genere *Eimeria* spp. e costituisce un rilevante problema sanitario ed economico soprattutto nei giovani animali (Ambrosi, 1995). Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare, in condizioni di campo, l'efficacia del trattamento a base di Toltrazuril (Baycox ovino®; Bayer Animal Health) e di Diclazuril (Vecoxan®; Janssen-Cilag) verso le infezioni naturali causate da coccidi del genere *Eimeria* che infettano gli ovini.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto tra Ottobre e Dicembre 2011 e n. 170 agnelle da rimonta di razza Sarda di età compresa tra i 20-34 giorni sono state incluse nel disegno sperimentale; al momento del reclutamento nessun animale aveva ricevuto alcun trattamento a base di anticoccidici e/o coccidiostatici, né aveva mostrato alcun segno clinico riconducibile a coccidiosi. Gli animali selezionati sono stati assegnati casualmente a 3 gruppi costituiti rispettivamente da 50, 50 e 70 animali: Gruppo TOLT- trattamento ( $T_0$ ) con un'unica dose di sospensione orale di Baycox® ovino (Toltrazuril, Bayer Animal Health) al dosaggio di 20 mg/kg; Gruppo DICL- trattamento metafilattico ( $T_0$ ) con un'unica dose di sospensione orale di Vecoxan® (Diclazuril, Janssen-Cilag) al dosaggio di 1 mg/kg; Gruppo C- somministrazione di un volume corrispondente di H<sub>2</sub>O. Indagini copromicroscopiche quali-quantitative (Ambrosi, 1995) e l'identificazione di specie su chiave morfometrica (Levine, 1961) sono state effettuate su campioni individuali di feci, raccolte dall'ampolla rettale a partire dal giorno del trattamento ( $T_0$ ) e in seguito a cadenza settimanale per le 9 settimane successive ( $T_1, T_2, \dots, T_9$ ). Ogni settimana, inoltre, in corrispondenza dei controlli stabiliti dal protocollo sperimentale, è stato attribuito, a ciascun campione di feci prelevato, uno score basato sulla consistenza secondo il seguente criterio: 0= feci di normale pastosità; 1= feci soffici e non conformate; 2= feci acquose; 3= feci emorragiche, mucose e presenza di brandelli di epitelio intestinale e coaguli fibrinosi- emorragici. È stata calcolata la media geometrica (MG) relativa all'emissione di opg di ciascun gruppo sperimentale ad ogni prelievo condotto ed è stata confrontata mediante ANOVA con quella degli altri gruppi di prova. L'efficacia dei trattamenti è stata valutata calcolando le percentuali (%) di riduzione dell'escrezione oocistica (Faecal Oocyst Count reduction, FOCCR). Sulla base dei risultati delle coproculture sono stati calcolati prevalenza ed indice di predominanza di ciascuna specie coccidica, in relazione ai diversi tempi della prova. Infine, per l'analisi di variabili qualitative quali l'indice di morbilità (Faecal score 2/3 associato ad escrezione oocistica) è stata valutata la frequenza (percentuale di animali che presentavano sintomi clinici) in funzione del gruppo di appartenenza ed è stata confrontata tramite analisi inferenziale.

**RISULTATI** - Gli animali del gruppo C hanno mostrato un'escrezione oocistica piuttosto costante durante tutto il corso della prova (escrezione media: 144,62 opg; range min-max: 21,38-229,20 opg). Il picco di massima escrezione, associato peraltro a sintomatologia clinica, è stato osservato al tempo ( $T_2$ ) ed è stato seguito da tassi di escrezione fluttuanti che non sono scesi mai sotto i 125 opg. *E. ovinoidalis*, specie maggiormente rappresentata sia in termini di prevalenza che di predominanza durante le prime 3 settimane di prova, ha poi subito una graduale riduzione a favore di *Eimeria* spp. *E. ahsata* ed *E. crandallis* hanno subito delle variazioni di prevalenza e predominanza meno evidenti rispet-

to ad *E. ovinoidalis* durante il corso della prova. A partire dal primo controllo-post trattamento ( $T_1$ ) gli animali del gruppo TOLT hanno mostrato un opg media nettamente inferiore a quello del gruppo C (5,78 opg versus 144,62 opg) ( $p < 0,05$ ) corrispondente ad una FOCCR del 97,7%. Il picco di massima efficacia (99,23%) è stato osservato al tempo  $T_2$ , l'efficacia media del farmaco si è mantenuta comunque estremamente elevata (>90%) per tutto l'arco della prova. A partire dal tempo  $T_2$  si è assistito ad una completa scomparsa delle specie *E. ahsata*, *E. ovinoidalis* e *E. crandallis*, mentre le uniche specie persistentemente presenti sono risultate quelle inserite nel gruppo "*Eimeria* spp.". Per quanto riguarda il trattamento a base di Diclazuril, al tempo  $T_1$ , il tasso medio di opg degli animali trattati è risultato nettamente inferiore a quello del gruppo C (10,36 opg versus 164,58 opg) ( $p < 0,05$ ) con una FOCCR pari al 93,7% (picco di massima efficacia); l'azione del farmaco si è resa ancora significativamente evidente fino al tempo  $T_3$  (FOCCR: 33,52%). Ad esclusione delle prime 2 settimane post-trattamento, gli agnelli trattati con Diclazuril hanno presentato un'intensa e persistente emissione oocistica, con valori medi di 97,54 opg, nettamente superiori a quelli registrati negli animali trattati con Toltrazuril ( $p < 0,05$ ). Inoltre, a differenza del gruppo trattato con Toltrazuril, *E. ahsata* ed *E. crandallis* hanno mostrato degli indici di prevalenza e predominanza piuttosto costanti durante tutto il corso della prova, mentre la specie *E. ovinoidalis* ha subito una drastica riduzione post trattamento a favore delle specie "*Eimeria* spp.", la cui prevalenza e predominanza è andata aumentando durante tutto il corso della prova. Gli agnelli del gruppo C hanno mostrato nel corso della prova la più alta percentuale di manifestazioni cliniche riconducibili a coccidiosi (23,49%), significativamente superiore a quella osservata negli animali appartenenti al gruppo TOLT (0,6%) e DICL (15,70%) ( $p < 0,05$ ).

**CONCLUSIONI** - I risultati ottenuti nel presente field trial consentono di affermare che il trattamento a base di Toltrazuril, effettuato in animali entro il primo mese e mezzo di vita e compatibilmente con l'anamnesi aziendale, è in grado di eliminare precocemente ed in maniera persistente le specie di *Eimeria* ritenute maggiormente patogene (*E. ahsata*, *E. ovinoidalis*, *E. crandallis*) comportando un generale miglioramento delle condizioni di salute degli agnelli. Il prodotto infatti ha mostrato un'elevatissima e persistente efficacia nei 2 mesi successivi al trattamento ed ha determinato un differente decorso del parassitismo rispetto sia al gruppo non trattato, sia a quello trattato con Diclazuril in termini di: a) percentuale di agnelli positivi per coccidi; b) intensità delle infestazioni osservate (media opg escrete); c) frequenza e gravità delle turbe enteriche; d) drastico abbattimento delle specie coccidiche ritenute a più alta patogenicità.

## ■ Efficacy of Toltrazuril and Diclazuril in the control of eimeriosis in lambs

**Key words:** eimeriosis, lambs, toltrazuril, diclazuril.

## Bibliografia

- Ambrosi M. (1995), Parassitologia zootecnica; Edagricole, Bologna.  
Levine N D. (1961), Protozoan Parasites of Domestic Animals and of Man; 2. ed. Minneapolis, Burgess.

# Integrazione della dieta di pecore con *Rosmarinus officinalis*: effetti sulla capacità antiossidante del latte



R. BRANCIARI<sup>1</sup>, D. MIRAGLIA<sup>1</sup>, M. TRABALZA MARINUCCI<sup>2</sup>, D. RANUCCI<sup>1</sup>, G. ACUTI<sup>2</sup>, L. MOSCATI<sup>3</sup>, A. VALIANI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Biopatologiche e Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università degli Studi di Perugia

<sup>2</sup> Dipartimento di Patologia, Diagnostica e Clinica Veterinaria, Università degli Studi di Perugia

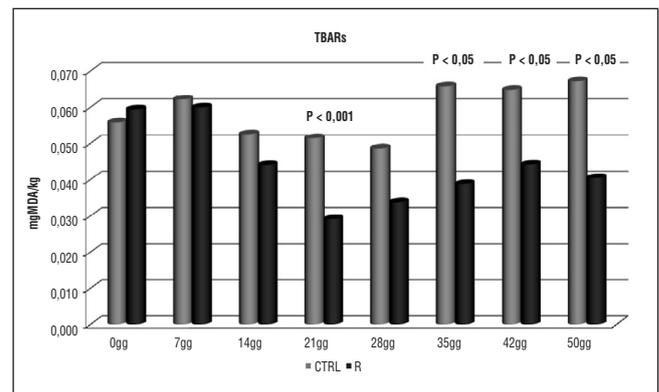
<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche

**Parole chiave:** *Rosmarinus officinalis*, antiossidanti, latte di pecora.

**INTRODUZIONE** - Negli ultimi anni sono state intraprese numerose ricerche per migliorare la qualità del latte e dei prodotti lattiero caseari anche attraverso il possibile impiego di estratti naturali somministrati come integrazione alla dieta degli animali in produzione zootecnica (Branciarì et al., 2012). È stato infatti osservato che alcuni fitoderivati sono in grado di modificare le caratteristiche fisiche, nutrizionali ed organolettiche dei prodotti di origine animale (Galobart et al., 2001; Jordan et al., 2010). Tra le essenze vegetali che sembrano possedere tali proprietà si annovera il *Rosmarinus officinalis*. I suoi composti bioattivi (fenoli, diterpeni, ecc.), presenti principalmente nelle foglie, possiedono una potente attività antiossidante espletata attraverso un effetto "scavengers" sulle specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Aruoma et al., 1992). I componenti principalmente responsabili dell'azione antiossidante (90%) sono l'acido carnosico ed il carnosolo (Aruoma et al., 1992). Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'integrazione alimentare con rosmarino sulla stabilità ossidativa ed il potere antiossidante del latte ovino.

**MATERIALI E METODI** - La prova è stata svolta in un allevamento di pecore di razza sarda, situato in una zona collinare del comune di Perugia, con una consistenza numerica di circa 300 capi in lattazione. Nel gregge sono stati scelti 24 capi che sono andati a costituire il gruppo trattato (R), mentre la restante parte di animali è andata a formare il gruppo controllo (CTRL). Nonostante la diversa numerosità dei due gruppi sperimentali, gli animali R sono stati selezionati perché mediamente non differissero dagli altri per età, ordine di parto e body condition score. Tutti gli animali hanno avuto libero accesso al medesimo pascolo polifita nelle ore centrali della giornata e ad un fieno di erba medica al rientro in stalla. Entrambi i gruppi hanno ricevuto un mangime pellettato del commercio (PG: 18,4%; NDF: 29,7%) in ragione di 400 g/capo/die, somministrato in due pasti giornalieri al momento della mungitura. Nel caso del gruppo R, il mangime era integrato da foglie di rosmarino essiccate e macinate (2,5% sul tal quale). Gli animali sono stati munti due volte al giorno mediante mungitrice meccanica ed il latte raccolto in due tank distinti. La sperimentazione ha avuto una durata di 50 giorni ed è stata preceduta da un periodo di adattamento alla dieta pari a 2 settimane. A cadenza settimanale, da entrambi i gruppi sperimentali, sono stati raccolti campioni di latte di massa. I campioni, trasportati in laboratorio in condizioni di refrigerazione (4 °C), dopo essere stati suddivisi in aliquote di volume pari a 150 ml sono stati stoccati in congelatore a -80 °C. La determinazione della stabilità ossidativa del latte è stata valutata mediante il metodo TBARS (sostanze reagenti con l'acido tiobarbiturico), secondo quanto descritto da Menéndez-Carreno et al., (2008). La quantificazione è stata effettuata attraverso la costruzione di una curva standard con l'1,1,3,3-tetrametoxipropene (Sigma Aldrich, St. Louis). La capacità antiossidante del latte è stata valutata mediante OXY-Adsorbent test (Diacron, Italy) previo trattamento dei campioni secondo quanto descritto da Zulueta et al., (2009). Attraverso l'OXY- Adsorbent test è stata stimata la capacità della matrice latte di opporsi all'azione ossidante esercitata da una soluzione di acido ipocloroso (HClO).

**RISULTATI E DISCUSSIONI** - La somministrazione di *Rosmarinus officinalis* ha influenzato significativamente il marker dello status ossidativo considerato. I TBARS hanno fatto registrare differenze tra gruppo CTRL ed R, con valori inferiori in quest'ultimo gruppo. In partico-



**Figura 1** - Valori di TBARS nel latte dei gruppi controllo (CTRL) e trattato (R).

lare, tali differenze sono risultate significative a partire dal 21° giorno dall'inizio della prova (Fig. 1).

Per quanto riguarda la capacità antiossidante del latte, anch'essa è risultata influenzata ( $P < 0,001$ ) dal trattamento alimentare (101 vs. 45  $\mu\text{mol HClO/ml}$  rispettivamente nei gruppi R e CTRL).

**CONCLUSIONI** - L'integrazione alimentare con *Rosmarinus officinalis* ha prodotto un miglioramento della stabilità ossidativa del latte confermata da un aumento del potere antiossidante e un decremento dei valori di TBARS. Ulteriori ricerche sono necessarie per definire il meccanismo d'azione di questo fitoderivato ed in particolare la biodisponibilità dei suoi principi attivi nel tratto gastroenterico e la loro possibilità di superare la barriera ematomammaria.

Ricerca finanziata dal Ministero della Salute, Ricerca corrente IZS UM 004/09RC

## ■ Dietary supplementation with *Rosmarinus officinalis* in dairy sheep: effect on milk antioxidant activity.

**Key words:** *Rosmarinus officinalis*, antioxidant, ewe milk.

## Bibliografia

- Aruoma O. I., Halliwell B., Aeschbach R. and Löliger J. (1992) - Xenobiotica. 22,257-68.
- Galobart J., Barroeta A.C., Baucells M.D., Codony R., Ternes W. (2001) - Poultry Sci. 80: 460-467.
- Jordan M.J., Inmaculada Monino M., Martinez C., Lafuente A., Sotomayor J.A. (2010) J.Agric.Food Chem., 58, 8265-8270.
- Zulueta A., Maurizi A., Frigola A., Esteve M.J., Coli R., Burini G. (2009) - International Dairy Journal, 19, 380-385.
- Menendez-Carreno M, Ansorena D, Astiasaran I. (2008) - J.Agric.Food Chem., 56, 9997-10002.
- Branciarì R., Valiani A., Trabalza Marinucci M., Miraglia D., Ranucci D., Esposto S., Mugghetti L. (2012) - Small Rum. Res., 106, p. S43-S48.

# Valutazione del ritmo giornaliero dell'attività locomotoria totale in pecore e capre sottoposte a differente fotoperiodo



V. MONTEVERDE<sup>1</sup>, S. VULLO<sup>1</sup>, I. VAZZANA<sup>1</sup>, S. CASELLA<sup>2</sup>, D. CRUCITTI<sup>1</sup>, T. OREFICE<sup>1</sup>, C. RUSSO<sup>1</sup>, G. PICCIONE<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, Laboratorio di Cronofisiologia Veterinaria e Complessità Biologica, Università degli Studi di Messina, Messina

**Parole chiave:** attività locomotoria, ciclo luce/buio, piccoli ruminanti, ritmo giornaliero.

**INTRODUZIONE** - Tutti gli organismi viventi presentano, nelle loro variabili fisiologiche, oscillazioni controllate da un orologio biologico localizzato nella regione soprachiasmatica dell'ipotalamo (Weinert and Waterhouse, 2007). Negli organismi animali, il ciclo luce/buio (L/B) è il sincronizzatore (Zeitgeber) più potente, anche se, in alcune specie, la sincronizzazione dei ritmi può essere determinata da stimoli cosiddetti non-fotici (Malek et al., 2004). Probabilmente, però, i ritmi circadiani si sono evoluti come fenomeni di adattamento degli organismi viventi a prevedibili cambiamenti ambientali associati al ciclo L/B (Pittendrigh, 1993). L'alternanza luce/buio con periodicità giornaliera è stata correlata all'attività locomotoria in vari animali da laboratorio (Refinetti, 2006) e in alcuni animali domestici (Bertolucci et al., 2008; Piccione et al., 2007; Piccione et al., 2008a, 2008b, 2008c). Poiché è stato dimostrato che l'attività giornaliera è peculiare a ciascuna specie, ci è sembrato particolarmente interessante studiare e confrontare il ritmo dell'attività locomotoria totale, in relazione a due diverse condizioni di fotoperiodo controllato, nella pecora e nella capra, per meglio definire il pattern attività/riposo, ritenuto oggi un potenziale indice di valutazione del benessere negli animali da reddito.

**MATERIALI E METODI** - L'indagine è stata condotta su 6 pecore di razza Comisana di 4 anni di età, peso medio di 48,0±1,5 kg, e su 6 capre di razza Maltese Comisana di 4 anni di età, peso medio di 46,0±1,0 kg. Su tutti gli animali, clinicamente sani e non gravidi, sono stati effettuati, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Palermo, accertamenti sanitari volti a escludere alcune patologie (Paratuberculosis, Brucellosi, Chlamydiosi, Leptospirosi, Febbre Q, Yersinia, Neosporosi, Toxoplasmosi, Visna-Maedi, Border diseases, Blutongue), e uno screening di esami e funzionalità d'organo. Sia le pecore che le capre sono state stabulate in box singoli di 12 m<sup>2</sup>. I rilievi termometrici sono stati effettuati durante tutta la sperimentazione mediante un termometro (Gemini, Chichester, West Sussex, UK). Tutti gli animali sono stati esposti a 2 differenti programmi luce di 10 giorni ciascuno: 12/12 L/B (la luce veniva accesa alle ore 08:00 e spenta alle ore 20:00) e 12/12 B/L (la luce veniva accesa alle ore 20:00 e spenta alle ore 08:00). La luce era uniformemente diffusa all'interno del box da lampade fluorescenti (FH HE/860 Lumilux T5, Osram GmbH) poste al centro, a una altezza di 2,5 metri. Per tutto il periodo della sperimentazione gli animali avevano libero accesso all'acqua e al fieno. Per la registrazione dell'attività locomotoria totale, pecore e capre sono state equipaggiate, per mezzo di un collare, di attografi Actiwatch-Mini® (Cambridge Neurotechnology Ltd, UK). L'analisi statistica è stata effettuata sui valori medi ottenuti dai 60 punti tempo registrati nell'arco di 1 ora. Sui 24 punti tempo ottenuti nell'arco delle 24 ore abbiamo applicato un modello statistico trigonometrico per descrivere analiticamente il fenomeno periodico, attraverso l'individuazione dei principali parametri che lo caratterizzano: Mesor, espresso nell'unità convenzionale Ampiezza, espressa nella stessa unità del Mesor, Acrofase, calcolata con il metodo del singolo Cosinor (Nelson et al., 1979) ed espressa in ore, con l'intervallo di confidenza al 95%, e Robustezza espressa come valore percentuale del massimo punteggio ottenuto con il periodogramma statistico  $\chi^2$  per dati ideali comparabili e periodicità di 24 ore. Sui parametri ritmici otte-

**Tabella 1** - Parametri ritmici dell'attività locomotoria registrati durante i periodi sperimentali nella pecora e nella capra.

Parametri	Animali	Periodi sperimentali	
		12/12 L/B	12/12 B/L
Mesor	Pecore	1619±123,6	4582±376,9
	Capre	596,3±140,0	520,1±135,1
Ampiezza	Pecore	1517±193,4	4270±371,1
	Capre	418,7±61,7	370,5±64,7
Acrofase	Pecore	12,2±0,2	2,09±0,1
	Capre	13,6±2,2	1,38±0,2
Robustezza	Pecore	44,9±11,3	49,84±2,5
	Capre	30,1±4,0	21,9±3,7

nuti per singolo giorno all'interno di ciascun periodo è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute al fine di valutare l'effetto statisticamente significativo ( $P < 0.05$ ) del tempo sul ritmo giornaliero dell'attività locomotoria totale.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati mostrano l'esistenza di un evidente ritmo circadiano dell'attività locomotoria totale sia nella pecora di razza Comisana che nella capra di razza Maltese. Dai dati ottenuti emerge che l'attività locomotoria delle pecore e delle capre è concentrata principalmente nelle ore di luce. Pertanto, quando il ciclo L/B viene invertito anche il ritmo dell'attività locomotoria totale risulta invertito, anche se alcuni giorni sono necessari per l'adattamento dei soggetti al nuovo fotoperiodo. I valori di Mesor, Ampiezza, Acrofase e Robustezza, ottenuti nella capra e nella pecora, sono riportati in Tabella 1.

**CONCLUSIONI** - In entrambe le specie studiate, la persistenza del ritmo circadiano dell'attività locomotoria totale evidenziato in condizioni di luce costante è attribuibile all'esistenza di un pacemaker endogeno influenzato dal regime di illuminazione (Refinetti, 2006). Pertanto, i risultati ottenuti identificano oggettivamente sia la pecora che la capra come animali ad attività "diurna" con un robusto ritmo giornaliero di attività locomotoria totale significativamente sincronizzato dal fotoperiodo la cui manipolazione può ricadere indirettamente sulle performance produttive della Specie.

*Si Ringraziano:* 1) Dr Calcedonio Miceli e il Dr Civiletti Antonino - ASP 6 Palermo Extraurbana. 2) Sig. Cipollina Gioacchino - Area Diagnostica Sierologica - IZS Palermo. 3) Tutto il Personale dell'U.O.S.I.S. - IZS Palermo.

■ Evaluation of the daily rhythm of total locomotor activity in sheep and goats during different photoperiod

Bibliografia presente c.o. gli Autori

# Influenza del microclima sui livelli ematici di alcune proteine della fase acuta nella pecora comisana



I. VAZZANA<sup>1</sup>, S. DARA<sup>1</sup>, G. PICCIONE<sup>2</sup>, S. CASELLA<sup>2</sup>, F. ARCURI<sup>1</sup>, T. OREFICE<sup>1</sup>, V. MONTEVERDE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, Laboratorio di Cronofisiologia Veterinaria e Complessità Biologica, Università degli Studi di Messina, Messina

**Parole chiave:** aptoglobina, fibrinogeno, siero amiloide A, stress termico, pecora.

**INTRODUZIONE** - Le proteine della fase acuta sono un gruppo di glicoproteine di origine epatica, le cui concentrazioni ematiche variano in modo aspecifico in conseguenza a un danno tissutale di vario tipo, riconducibile a fattori interni o esterni quali infezioni, infiammazioni o fattori stressanti (Nazifi et al., 2010; Murata et al., 2004). La loro funzione è, pertanto, quella di promuovere la produzione di immunoglobuline e di riparare i tessuti, prevenendo ulteriori danni (Kent, 1992). Poiché è stato ampiamente dimostrato che le produzioni zootecniche sono strettamente correlate al grado di benessere degli animali, risulta necessario identificare biomarkers che forniscano un indice obiettivo del loro stato di benessere. Pertanto, la valutazione dei livelli ematici delle proteine della fase acuta in condizioni quali quelli di stress termico risultano utili per il monitoraggio dello stato di salute dell'animale (Giannetto et al., 2011; Petersen et al., 2004). Alla luce di questo ci è sembrato interessante studiare le variazioni di alcune proteine della fase acuta in relazione al microclima nella pecora, al fine di ridurre gli effetti degli stressors ambientali.

**MATERIALI E METODI** - Per l'indagine sono state utilizzate 20 pecore di razza Comisana clinicamente sane e provenienti da allevamenti ufficialmente indenni. Su tutti gli animali clinicamente sani (5 anni di età, peso medio di 50,0±1,8 kg) oggetto dello studio, è stato effettuato dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Palermo, uno screening di laboratorio per la diagnosi delle principali malattie endemiche ovine (Brucellosi, Chlamydiosi, Leptosirosi, Febbre Q, Yersinia, Neosporosi, Toxoplasmosi, Visna-Maedi, Border diseases, Blutongue), e uno screening di esami e funzionalità d'organo. Per tutta la durata dell'indagine sono stati effettuati rilievi termogrometrici mediante un data logger (Gemini, Chichester, West Sussex, UK), posizionato all'interno della stalla, ed è stato calcolato l'indice termogrometrico (THI). Prelievi di sangue sono stati effettuati, mediante venopuntura della giugulare esterna, per mezzo di provette Vacutainer (Terumo, Japan) sia contenenti sodio citrato al 3,8% (1 parte di citrato e 9 parti di sangue) sia prive di anticoagulante al fine di misurare le concentrazioni di Fibrinogeno (Fb), Aptoglobina (Hp) e Siero Amiloide A (SAA). Il primo prelievo è stato effettuato nel mese di gennaio 2011 e il secondo nel mese di luglio 2011. I prelievi sono stati effettuati alle ore 07:00 e alle ore 15:00. La concentrazione del Fb è stata determinata sul plasma mediante un coagulometro (Clot 2S, SEAC, Italia), la concentrazioni di Hp, mediante immunodiffusione radiale, e di SAA, mediante spettrofotometria UV. Su tutti i parametri studiati è stata applicata l'analisi della varianza (ANOVA) a due vie per misure ripetute, per valutare l'effetto del tempo (ora del prelievo) e del periodo sperimentale (gennaio e luglio). Valori di P<0,05 sono stati considerati statisticamente significativi. Tutti i dati sono stati analizzati con il software STATISTICA 7.5 (StastSoft Inc.).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Dall'analisi dei risultati ottenuti, relativamente al tempo di campionamento è emersa una variazione dei livelli di Fb, Hp e SAA, con valori significativamente più elevati (P<0.05) durante i prelievi effettuati nelle ore pomeridiane (14:00) rispetto ai prelievi effettuati nelle ore antimeridiane (07:00). Nelle diverse condizioni microclimatiche (temperatura ambientale e umidità relativa) registrate durante il mese di gennaio e di luglio, solo le concentrazioni sieriche della siero amiloide A sono aumentate significativamente (P<0.05) nel periodo più caldo e meno umido.

**Tabella 1** - Valori medi ed errore standard (ES) di Fibrinogeno (Fb), Aptoglobina (Hp) e Siero Amiloide A (SAA), espressi nella loro unità di misura convenzionale, rilevati alle ore 07:00 e alle ore 15:00 durante i due diversi periodi sperimentali, in 20 pecore di razza Comisana.

Parametri	Periodo I			
	07:00		15:00	
	Media	ES	Media	ES
Fb (g/L)	3,42	0,11	3,91	0,12
Hp (g/L)	0,38	0,01	0,45	0,02
SAA (mg/mL)	2,03	0,05	2,40	0,12
Parametri	Periodo II			
	07:00		15:00	
	Media	ES	Media	ES
Fb (g/L)	3,38	0,09	3,72	0,07
Hp (g/L)	0,37	0,03	0,49	0,03
SAA (mg/mL)	2,01	0,04	3,12	0,04

**CONCLUSIONI** - Sulla base dei risultati ottenuti possiamo affermare che le proteine della fase acuta da noi studiate nella pecora Comisana potrebbero rappresentare dei potenziali indicatori nel monitoraggio delle condizioni di management della pecora, al fine di ridurre gli effetti degli stressors ambientali. In particolare, i livelli della siero amiloide A potrebbero essere utilizzati come indice di stress nella pecora, contribuendo al miglioramento delle condizioni di management in questa Specie.

*Si ringraziano: 1) Dr Giovanni Roppolo e il Dr De Paola Achille - ASP 6 Palermo Extraurbana. 2) Sig. Cipollina Gioacchino - Area Diagnostica Sierologica - IZS Palermo. 3) Tutto il Personale dell'U.O.S.I.S. - IZS Palermo.*

## ■ Influence of microclimate on blood levels of some acute phase proteins in comisana sheep

**Key words:** haptoglobin, fibrinogen, serum amyloid A, sheep.

## Bibliografia

- Giannetto C., Giudice E., Casella S., Fazio F., Alberghina D., Piccione G. (2011) Stress termico e livelli ematici delle proteine della fase acuta nella bovina. *Large Anim Rev*, 17:3-6.
- Kent J.E. (1992) Acute phase proteins: their use in veterinary diagnosis. *Br Vet J*, 148:279-282.
- Murata H., Shimada N., Yoshioka M. (2004) Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis: an overview. *Vet J*, 168:28-40.
- Nazifi S., Razavi S.M., Reiszadeh M., Esmailnezhad Z., Ansari-Lari M.A. (2010) Diagnostic values of acute phase proteins in Iranian indigenous cattle infected with *Theileria annulata*. *Vet a Arhiv*, 80: 205-214.
- Petersen H.H., Nielsen J.P., Heegaard P.M.H. (2004) Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Vet Res*, 35:163-187.

# Monitoraggio di alcuni parametri dello stress ossidativo durante differenti periodi produttivi in allevamenti ovini



V. MONTEVERDE<sup>1</sup>, G. VESCO<sup>1</sup>, I. VAZZANA<sup>1</sup>, A. CANDELA<sup>1</sup>, C. RUSSO<sup>1</sup>, G. PICCIONE<sup>2</sup>, S. CASELLA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri", Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Sperimentali e Biotecnologie Applicate, Laboratorio di Cronofisiologia Veterinaria e Complessità Biologica, Università degli Studi di Messina, Messina

**Parole chiave:** fasi produttive, pecora, radicali liberi, stress ossidativo.

**INTRODUZIONE** - Lo stress ossidativo è una particolare condizione indotta da un'accentuazione in senso pro-ossidante dell'equilibrio dinamico fra i processi ossidativi e riduttivi che avvengono in ogni cellula con la produzione di numerose specie di radicali (Sies et al. 1991). Gli antiossidanti, composti in grado di proteggere sostanze chimiche e materiale biologico dai danni provocati dall'ossidazione indotta da radicali, possono inibire enzimi pro-ossidanti che producono radicali o chelare ioni di metalli di transizione che catalizzano la formazione di radicali, oppure possono agire nella fase di propagazione della reazione a catena neutralizzando i radicali che si formano in questo stadio (Hong-Yu Zhang et al., 2006). Poiché è stato dimostrato che negli allevamenti i diversi periodi produttivi, e le differenti fasi di transizione, sono caratterizzate da repentine e intense variazioni dell'equilibrio metabolico, endocrino e immunitario (Piccione et al., 2010; Reynolds et al., 2003), ci è sembrato particolarmente interessante monitorare le concentrazioni di alcuni parametri dello stress ossidativo durante le diverse fasi produttive nella pecora, al fine di ottimizzare la performance produttiva e le condizioni di benessere di questa Specie.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio è stato condotto su 6 pecore di razza Comisana di 3 anni di età e peso medio di 46,0±2,0 kg. Su tutti gli animali sono stati effettuati, dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Palermo, accertamenti sanitari volti a escludere alcune patologie (Paratubercolosi, Brucellosi, Chlamydiosi, Leptospirosi, Febbre Q, Yersinia, Neosporosi, Toxoplasmosi, Visna-Maedi, Border diseases, Blutongue), e uno screening di esami e funzionalità d'organo. L'indagine è stata condotta in Sicilia a una altitudine di 300 metri (38° 7' N; 13° 22' E). Tutti gli animali venivano alimentati due volte al giorno con fieno (2 kg), paglia di grano (1 kg), concentrato (0,5 kg) e acqua *ad libitum*. Su tutti i soggetti sono stati effettuati prelievi di sangue nei seguenti periodi produttivi: pre-gravidanza, durante la gravidanza (dopo 100 giorni e dopo 140 giorni), dopo il parto (10, 30 e 200 giorni post-partum) e durante l'asciutta. I campioni di sangue, ottenuti dalla venopuntura della giugulare, sono stati centrifugati per 15 minuti a 1500 rpm e sul siero ottenuto sono stati determinati i seguenti parametri: radicali liberi (dROMs), barriere antiossidanti (Oxy-ads) e tiolo antiossianante (SHp). Tutti i parametri sono stati determinati mediante spettrofotometria UV (Slim, SEAC, Firenze, Italy). Sui dati ottenuti, risulta normalmente distribuiti, è stata effettuata l'analisi della varianza (ANOVA) per misure ripetute, mediante software STATISTICA 7.5 (StatSoft Inc.).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati ottenuti hanno evidenziato che il diverso momento produttivo influenza i parametri dello stress ossidativo da noi considerati. In particolare, è stato evidenziato un aumento graduale e significativo ( $P < 0.05$ ) dei livelli di dROMs, Oxy-ads e SHp dall'inizio della gravidanza fino al post-partum (10 giorni), e una diminuzione degli stessi dal trentesimo giorno dopo il parto per tutto il periodo della lattazione e fino all'asciutta. I valori medi ottenuti in ogni periodo sperimentale sono riportati in Tabella 1.

**CONCLUSIONI** - La risposta dell'organismo allo stress indotto da un bilancio energetico negativo in seguito alla lattazione favorisce la lipomobilizzazione e la gluconeogenesi che, in termini di bilancio ossidativo, si

**Tabella 1** - Valori medi±deviazione standard dei parametri dello stress ossidativo studiati ottenuti durante i diversi periodi produttivi nella pecora Comisana.

Periodi produttivi	Parametri		
	dROMs	Oxy-ads	SHp
Pre-gravidanza	24.5±6.2	1967.0±192.3	119.3±15.9
Gravidanza (100 giorni)	93.3±1.6 <sup>a</sup>	3859.0±41.5 <sup>a</sup>	180.0±1.7 <sup>a</sup>
Gravidanza (140 giorni)	95.9±1.3 <sup>a</sup>	3939.0±25.4 <sup>a</sup>	183.5±2.2 <sup>a</sup>
Post-partum (10 giorni)	95.0±1.9 <sup>a</sup>	3954.0±82.3 <sup>a</sup>	187.3±3.7 <sup>a</sup>
Post-partum (30 giorni)	71.0±4.3 <sup>acd</sup>	2911.0±87.7 <sup>e</sup>	127.0±2.4 <sup>bcd</sup>
Post-partum (200 giorni)	90.9±1.9 <sup>a</sup>	3174.0±81.8 <sup>e</sup>	144.5±2.6 <sup>e</sup>
Asciutta	55.0±4.6 <sup>e</sup>	2306.0±204.9 <sup>e</sup>	136.8±6.5 <sup>e</sup>

Significatività: <sup>a</sup> vs pre-gravidanza; <sup>b</sup> vs Gravidanza (100 giorni); <sup>c</sup> vs Gravidanza (140 giorni); <sup>d</sup> vs Post-partum (10 giorni); <sup>e</sup> vs tutte le altre condizioni.

traduce in eccesso di radicali liberi (Piccione et al., 2006; Piccione et al., 2010). Pertanto, i nostri risultati evidenziano una risposta compensativa dell'organismo allo stress ossidativo che si verifica durante i differenti periodi produttivi, sottolineando l'importanza del monitoraggio di tali parametri, agenti aterogeni di recente acquisizione, la cui valutazione clinica non può prescindere dalla precisa conoscenza dei loro livelli.

Si ringraziano: 1) Dr Salvatore Caruso e il Dr De Paola Achille - ASP 6 Palermo Extraurbana. 2) Sig. Cipollina Gioacchino - Area Diagnostica Sierologica - IZS Palermo. 3) Tutto il Personale dell'U.O.S.I.S. - IZS Palermo.

## Monitoring of some oxidative stress parameters during different productive periods in sheep

### Bibliografia

- Zhang H.Y., Yang D.P., Tang G.Y., 2006. Multipotent antioxidants: from screening to design Drug Discov. Today 11, 749-754.
- Reynolds C.K., Aikman P.C., Lupoli B., Humphries D.J., Beaver D.E., 2003. Splanchnic metabolism of dairy cows during the transition from late gestation through early lactation. J. Dairy Sci. 86, 1201-1217.
- Piccione G., Borruso M., Fazio F., Grasso F., Caola G., 2006. Oxidative stress evaluation during milking period in the ewes. J. Appl. Anim. Res. 29, 109-112.
- Piccione G., Giannetto C., Fazio F., Assenza A., Caola G., 2010. Influence of reproductive status on the daily rhythms of oxidative stress markers in Ovis aries. Centr. Eur. J. Biol. 384-390.
- Sies H. 1991. Oxidative stress. Academic Press Ltd., Orlando, FL.

# Analisi della situazione sociale, strutturale e produttiva di un campione di allevamenti della Sardegna orientale



A. COCCOLLONE, L. GODDI, E. BANDINO, P. CABRAS, S. CAPPAL, S. ROLESU, M. MULAS

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi" - Sassari

**Parole chiave:** agricoltura multifunzionale, pecora, capra, Sardegna.

**INTRODUZIONE** - La zootecnia delle aree svantaggiate ha profondamente modificato i propri equilibri economici, sociali e culturali. Per questo, nel corso del 2010, in occasione di un progetto finanziato dall'IZS della Sardegna, è stata effettuata un'indagine sulla situazione socio-economica e produttiva di un campione di aziende zootecniche, ubicate nelle province di Nuoro, Ogliastra e Olbia-Tempio.

Coi dati raccolti ci si è proposti di valutare se, nel territorio oggetto dello studio, sono presenti aziende utilizzabili come modello di sviluppo territoriale integrato e sostenibile in aree svantaggiate. Le numerose informazioni raccolte potranno essere poi utilizzate al fine di creare strumenti utili al miglioramento della gestione aziendale e fruibili a livello regionale.

**MATERIALI E METODI** - Al progetto hanno aderito, su base volontaria, 67 aziende produttrici di latte di cui 39 site in provincia di Nuoro, 17 in Ogliastra e 11 in provincia di Olbia-Tempio. In 45 di queste sono allevati ovini, in 19 caprini e in 3 ovini e caprini.

La raccolta dei dati è stata effettuata da veterinari direttamente in azienda utilizzando una scheda-questionario, appositamente predisposta, articolata in modo da acquisire tre ordini di informazioni: "Socio-Economiche" (età, stato civile, sesso del conduttore e livello di istruzione); "Generali sull'azienda" (estensione, ubicazione, altitudine media, dimensioni aziendali, strutture); "Produttive" (indirizzo produttivo, tipologia di allevamento, numero di capi).

**RISULTATI** - La conduzione aziendale è prevalentemente in carico a soggetti di sesso maschile (91,04%) il 40% dei quali ha meno di 40 anni, mentre l'età media è compresa tra 41 e 55 anni (50,76%). Solo il 10,44% degli intervistati è in possesso di un titolo di studio più elevato rispetto alla licenza di scuola media inferiore. Le dimensioni aziendali variano tra i 20 e i 240 Ha; il 45% degli allevamenti ha una dimensione compresa tra 51 e 100 Ha. Le aziende site interamente su terreni comunali sono 11. In 39 delle 67 aziende esaminate (58,21%), il conduttore si avvale, per la manodopera, di personale spesso legato al suo nucleo familiare da relazioni di parentela.

Alcune delle aziende oggetto del nostro studio hanno messo in atto processi di diversificazione multifunzionale, attraverso lo sviluppo di attività aggiuntive quali agriturismo (7 aziende) e minicaseifici (14 aziende) ed in 8 casi col passaggio al regime biologico. La pratica del sistema biologico ha determinato un incremento del reddito esclusivamente per le 6 aziende che hanno associato alla produzione del latte anche la sua trasformazione attraverso minicaseifici, la vendita diretta e/o il consumo in agriturismo. Altro dato importante da valutare è che la maggior parte degli allevatori ha effettuato investimenti, prevalentemente di tipo strutturale, negli ultimi 5 anni.

Gli allevamenti ovini sono sempre costituiti da un numero di capi maggiore rispetto a quelli caprini. Non sono stati registrati allevamenti ovini con meno di 100 animali né allevamenti caprini con più di 400; in 28 aziende sono presenti animali iscritti al libro genealogico. Negli allevamenti misti (ovini-caprini) gli ovini rappresentano la specie prevalen-

te. In 52 aziende sono presenti anche suini, bovini ed equini, e in 3 allevamenti è praticata l'apicoltura.

Nel 57% degli allevamenti la mungitura è di tipo meccanico, nel 36% di tipo manuale e nel 7% sia meccanica che manuale. Su 17 allevamenti caprini, solo 4 utilizzano la mungitrice; negli allevamenti in cui sono presenti sia ovini che caprini si pratica la mungitura meccanica per i primi e quella manuale per i secondi. Il sistema di refrigerazione del latte è presente in 38 delle aziende in cui la mungitura viene effettuata con sistema meccanico e in 5 aziende dove è praticata la mungitura manuale. Relativamente all'aspetto della qualità igienico sanitaria delle acque si è osservato che nel 63% delle aziende (42) non è presente il cloratore, di queste, 11 utilizzano l'acqua di rete mentre le restanti 31 utilizzano acqua proveniente da pozzi artesiani o da falde superficiali. Di queste ultime solo 6 effettuano dei controlli periodici per verificarne le caratteristiche microbiologiche; lo stesso controllo viene invece effettuato da 18 aziende delle 25 che possiedono un cloratore.

È rilevante evidenziare che in 7 aziende, pur essendo presente un impianto di mungitura meccanica, viene praticata la mungitura manuale.

**CONCLUSIONI** - Aspetti come il mancato utilizzo di strutture presenti in azienda da una parte, o la forte sensibilità nei confronti di problematiche igienico sanitarie dall'altra dimostrano come ci siano notevoli differenze nella sensibilità e nel coinvolgimento professionale dell'allevatore. Coinvolgimento particolarmente marcato, ed esteso al nucleo familiare, quando vengono messe in atto strategie di diversificazione delle produzioni aziendali quali trasformazione e/o, vendita diretta dei prodotti e attività agrituristica. Anche il valore aggiunto che dovrebbe essere connesso all'adesione al regime biologico viene identificato, da alcuni allevatori, come tale solo in situazioni di multifunzionalità aziendale. Viste la realtà produttiva e le caratteristiche delle aziende la diversificazione delle produzioni, la multifunzionalità, così come le tecniche di allevamento a ridotto impatto ambientale e in condizioni estensive, andrebbero incentivate poiché possono offrire notevoli vantaggi in termini di riduzione dei costi e di protezione ambientale, grazie alla continua presenza degli operatori sul territorio.

## ■ Analysis of the socio-economic and health status of a sample of farms in Eastern Sardinia

**Key words:** small ruminant, multifunctional agriculture, Sardinia.

## Bibliografia

Imprese agricole e sviluppo locale. "un percorso di analisi territoriale". di francesca alfano e domenico cersosimo <http://www.gruppo2013.it/working-paper/documents/impresa%20agricole%20e%20sviluppo%20locale.pdf>.

Le performance delle aziende agrarie con e senza agriturismo: un confronto con i dati rica luigi mastronardi, vincenzo giaccio [http://agrire.gioiropa.univpm.it/stampaarticolo.php?tipo=0&id\\_articolo=819](http://agrire.gioiropa.univpm.it/stampaarticolo.php?tipo=0&id_articolo=819).

# Influenza della durata dell'asciutta sulla risposta immunitaria di ovini di razza Sarda



P. BONELLI<sup>1</sup>, P. NICOLUSSI<sup>1</sup>, R. RE<sup>1</sup>, G. PILO<sup>1</sup>, S. FRESI<sup>1</sup>, L. PAIS<sup>1</sup>, S. SERRA<sup>1</sup>, C. CARZEDDA<sup>2</sup>, A. MAZZA<sup>2</sup>, S.P.G. RASSU<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

<sup>2</sup> Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari

**Parole chiave:** asciutta, sottopopolazioni leucocitarie, IgG, pecora Sarda.

**INTRODUZIONE** - L'allevamento ovino in Sardegna è caratterizzato da una forte stagionalità riproduttiva, con la concentrazione degli accoppiamenti a fine primavera e dei parti a fine autunno. Ne deriva che anche la produzione è stagionale e concentrata nel periodo dicembre-luglio, con una durata della lattazione di 245-265 giorni, compreso il periodo di allattamento dell'agnello, cui si associa un periodo improduttivo (luglio-ottobre) di circa 90-120 giorni. Come per tutti gli animali destinati alla produzione di latte, anche per gli ovini l'asciutta rappresenta un periodo critico in quanto è essenziale per garantire un corretto turn-over delle cellule epiteliali mammarie (Bernier-Dodier et al., 2011) e per il raggiungimento di buoni livelli produttivi nella lattazione successiva (Capuco et al., 1997; Bachman and Schairer, 2003). Tuttavia, tenuto conto della crisi economica che sta attraversando già da qualche anno l'allevamento ovino da latte, in particolare quello sardo, è stato ipotizzato che l'allungamento della durata della lattazione, con conseguente riduzione del periodo improduttivo, potesse rappresentare un'interessante strategia gestionale per incrementare la redditività delle aziende ovine da latte. A tale scopo si è voluto studiare l'effetto della riduzione della durata del periodo di asciutta sulla capacità di risposta immunitaria di pecore e agnelli di razza Sarda.

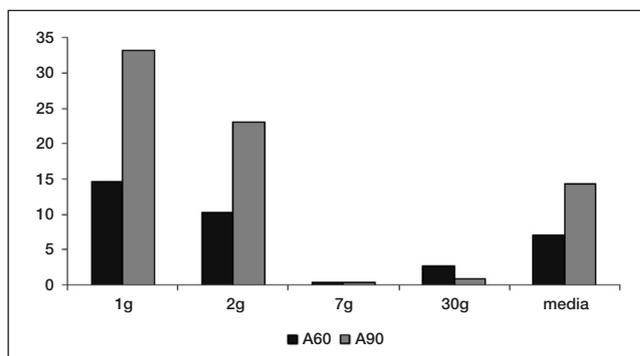
**MATERIALI E METODI** - Sono stati costituiti due gruppi di 8 pecore primipare sui quali è stata indotta l'asciutta in tempi differenti: 60 giorni (A60) e 90 giorni prima del parto (A90). Alla nascita, 6 agnelli per gruppo sono stati inclusi nel medesimo trattamento sperimentale. A distanza di 1, 2, 7 e 30 giorni dal parto, sono stati raccolti campioni individuali di sangue dalle pecore e dagli agnelli e di latte dalle sole pecore. Sui campioni di sangue sono stati eseguiti l'esame emocromocitometrico (ADVIA 2120, Siemens) e l'identificazione delle sottopopolazioni linfocitarie. È stata predisposta una marcatura a tre colori per la determinazione dei linfociti T helper (CD4+), T citotossici (CD8+) e linfociti T  $\gamma\delta$  (WC1) in citometria a flusso (FACSCalibur, BD). I campioni di latte sono stati analizzati per il dosaggio immunoenzimatico delle IgG totali con un kit ELISA commerciale (Alpha Diagnostic). I dati ottenuti sono stati analizzati mediante GLM il cui modello prevedeva come fattori fissi la durata dell'asciutta, il tempo di campionamento e le loro interazioni.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - L'esame emocromocitometrico ha evidenziato nelle pecore del gruppo A60, rispetto a quelle del gruppo A90, valori significativamente inferiori di leucociti totali (9,9 vs 13,1 cellule  $\times 10^6/\mu\text{L}$ ;  $P=0,001$ ) e di eosinofili (2,3% vs 4,1%;  $P=0,002$ ) e valori significativamente superiori di linfociti (51,1% vs 47,7%;  $P=0,009$ ). Per quanto riguarda gli agnelli quelli del gruppo A60 mostravano valori superiori di monociti (3,4% vs 2,1%;  $P=0,006$ ) e valori inferiori di globuli rossi ( $8 \times 10^6/\mu\text{L}$  vs  $9 \times 10^6/\mu\text{L}$ ;  $P=0,001$ ), emoglobina (9,6g/dL vs 11,2g/dL;  $P=0,000$ ) ed ematocrito (29,9 vs 35,1;  $P=0,000$ ). Relativamente alle sottopopolazioni linfocitarie, riportate nella tabella 1, non sono state osservate differenze significative fra i due gruppi di pecore, al contrario degli agnelli per i quali percentuali significativamente inferiori di CD4<sup>+</sup> (44,56% vs 50,07%;  $P=0,042$ ) e di WC1<sup>+</sup> (7,07% vs 9,65%;  $P=0,039$ ) sono state osservate nel gruppo A60 rispetto al gruppo A90. In tutti i casi i valori rilevati all'esame emocromocitometrico e relativi alle sottopopolazioni linfocitarie rientravano nei range di normalità della specie ovina. Le IgG del latte (Fig. 1), inferiori nel gruppo A60 ma non in misura significativa, hanno mostrato un andamento decrescente dal 1° al 30° giorno, dovuto alle normali modificazioni fisiologiche della composizione del secreto mammario nel postpartum.

**CONCLUSIONI** - La riduzione a 60 giorni della durata dell'asciutta non sembra influenzare negativamente la risposta immunitaria delle pecore e degli agnelli. Ciò implica la possibilità di prolungare la lattazione fino al 2° mese prima del parto con conseguenti benefici economici. Ulteriori studi

**Tabella 1** - Sottopopolazioni linfocitarie (%) nel sangue di pecore e agnelli appartenenti ai due gruppi sperimentali.

	Gruppo		Significatività (P)		
	A60	A90	Gruppo (G)	Tempo (T)	GxT
<b>pecore</b>					
CD4+	30,13±0,96	32,09±0,96	0,154	0,059	0,399
CD8+	24,58±0,84	23,23±0,84	0,262	0,004	0,059
WC1+	4,09±0,36	4,33±0,36	0,649	0,307	0,280
<b>agnelli</b>					
CD4+	44,56±1,86	50,07±1,86	0,042	0,104	0,638
CD8+	15,12±0,97	14,89±0,97	0,868	0,118	0,189
WC1+	7,07±0,85	9,65±0,85	0,039	0,861	0,067



**Figura 1** - IgG totali (mg/mL) riscontrate nel latte delle pecore appartenenti ai due gruppi sperimentali.

si rendono comunque necessari per definire meglio la durata minima dell'asciutta tale da non compromettere lo stato sanitario degli animali.

Ricerca condotta con finanziamento OIGA (MiPAAF) E PRIN 2008.

## ■ Effects of dry period length on immune response of Sarda breed ewes

**Key words:** dry period, leukocytes subsets, IgG, Sarda breed ewe.

## Bibliografia

- Capuco, A. V., R. M. Akers, and J. J. Smith. 1997. Mammary growth in Holstein cows during the dry period: Quantification of nucleic acids and histology. *J. Dairy Sci.* 80:477-487.
- Bachman, K. C., and M. L. Schairer. 2003. Invited review: Bovine studies on optimal lengths of dry periods. *J. Dairy Sci.* 86:3027-3037.
- Bernier-Dodier, P., C. L. Girard, B. G. Talbot, and P. Lacasse. 2011. Effect of dry period management on mammary gland function and its endocrine regulation in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 94:4922-36.

# Risposta citochinica locale e sistemica in corso di mastite da *Streptococcus uberis*



G. GALLERI<sup>1</sup>, P. BONELLI<sup>2</sup>, P. NICOLUSSI<sup>2</sup>, G. SCHIANCHI<sup>2</sup>, S. UZZAU<sup>2</sup>, G. MAROGNA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Porto Conte Ricerche srl, Alghero (SS)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari

**Parole chiave:** *S. uberis*, mastite, interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), interleuchina-4 (IL-4).

**INTRODUZIONE** - Le mastiti infettive rappresentano una tra le maggiori problematiche sanitarie ed economiche dell'allevamento ovino da latte. Tra le infezioni mammarie causate da batteri ambientali, la prevalenza di *S. uberis* appare elevata nell'allevamento bovino. Recentemente lo *S. uberis* è stato segnalato in Sardegna come l'agente patogeno più frequentemente isolato dal latte ovino mastitico. In letteratura esistono scarsi studi sul ruolo eziopatogenetico di tale batterio nella pecora. L'obiettivo del presente studio è stato quello di determinare la produzione di citochine, a livello mammario e sistemico, in pecore infettate sperimentalmente per via intramammaria con *S. uberis*.

**MATERIALI E METODI** - La prova è stata condotta su 4 pecore primipare di razza sarda sieronegative per *S. uberis* durante la prima metà della lattazione. L'emimammella sinistra di ciascuna pecora veniva infettata per via intracanalicolare con  $1 \times 10^6$  UFC e, dopo 6 giorni, con  $2 \times 10^7$  UFC di *S. uberis*, mentre le emimammelle destre, non inoculate, costituivano il controllo. Sono stati utilizzati due ceppi di campo isolati da casi clinici di mastite conclamati e identificati con PCR.

È stato effettuato un campionamento di sangue e di latte di un'emimammella a partire dal primo giorno del primo inoculo (G0), a tre giorni dallo stesso (G3) e a tre (G3/2) e sei giorni (G6/2) dal secondo inoculo. Contemporaneamente sono stati eseguiti controlli per la valutazione clinica della mastite. L'esame batteriologico è stato eseguito su campioni di latte prelevati quotidianamente. È stato predisposto presso i laboratori di immunologia di Porto Conte Ricerche un test ELISA per la determinazione delle citochine IFN- $\gamma$  e IL-4 dal plasma e dal latte di pecora allo scopo di esaminare i campioni prelevati nel corso della sperimentazione. I dati sono stati espressi come media  $\pm$  errore standard e sono stati elaborati tramite l'analisi della varianza (one-way ANOVA).

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - In seguito all'infezione sperimentale effettuata con  $1 \times 10^6$  UFC non si sono riscontrati segni clinici di mastite al G3, contrariamente a quanto si è rilevato dopo il secondo inoculo ( $2 \times 10^7$  UFC) al G3/2. La mammella si presentava calda e arrossata, alla palpazione profonda si apprezzava un indurimento generalizzato, l'aspetto macroscopico del secreto appariva sieroso con presenza di flocculi. Gli esami batteriologici hanno consentito di isolare il microrganismo a partire dal giorno successivo al secondo inoculo.

La scelta dell'infezione sperimentale in due tempi e a due differenti concentrazioni di agente patogeno è stata compiuta con l'obiettivo di esacerbare la risposta immunitaria rendendola in tal modo più facilmente osservabile e interpretabile. È stato rilevato un incremento progressivo dell'IFN- $\gamma$  nel plasma statisticamente significativo al G3/2 ( $162,5 \pm 52,6$  pg/mL;  $p=0,015$ ) e al G6/2 ( $230 \pm 94$  pg/mL;  $p=0,03$ ) rispetto al G0 ( $14,5 \pm 6,27$  pg/mL). Contrariamente a quanto osservato nel plasma, l'IFN- $\gamma$  nel latte ha presentato un andamento discontinuo. Infatti, rispetto al G0 ( $28,5 \pm 1,5$  pg/mL) si è evidenziato un iniziale incremento al G3 ( $65 \pm 2,9$  pg/mL;  $p=0,0008$ ) che si riduceva al G3/2 ( $28 \pm 1,54$ ;  $p=0,14$ ) per poi aumentare nuovamente al G6/2 ( $53,9 \pm 9$  pg/mL;  $p=0,009$ ) in concomitanza con le manifestazioni cliniche. L'andamento dell'IL-4 nel plasma era sovrapponibile a quanto osservato per l'IFN- $\gamma$ . Infatti, si è riscontrato un incremento graduale nel tempo che al G6/2 ( $12,3 \pm 1,3$  pg/mL) è risultato significativo ( $p=0,05$ ) rispetto al G0 ( $6 \pm 1,3$  pg/mL). Analogamente a quanto visto nel plasma, anche nel latte si è evidenziato un aumento dell'IL4 al G6/2 ( $12,3 \pm 2$  pg/mL) statisticamente significativo ( $p=0,02$ ) rispetto al G0 ( $4,4 \pm 1,6$  pg/mL).

Informazioni più dettagliate sull'innesco e l'evoluzione della risposta immunitaria acquisita in seguito all'infezione sperimentale con *S. uberis* sarebbero certamente derivate da un'analisi estesa ad un maggior numero di campioni. Dai dati in nostro possesso si evince come possa essere ipotizzata una polarizzazione della risposta immunitaria in senso Th2 (umorale) testimoniata da un aumento progressivo di IL-4 rilevabile sia a livello sistemico che mammario. Il temporaneo incremento di IFN- $\gamma$  nel latte, imputabile ad una produzione aspecifica da parte delle cellule dell'epitelio mammario, potrebbe essere interpretata come una risposta pro-infiammatoria che contestualmente determina un richiamo di leucociti in mammella (dati non mostrati). La diminuzione dei livelli di IFN- $\gamma$  nel latte dopo il primo inoculo potrebbe presumibilmente essere ricondotta all'effetto inibitorio della risposta immunitaria di tipo Th2 su quella Th1.

**CONCLUSIONI** - I risultati del presente studio fanno ipotizzare che l'infezione da *S. uberis* stimoli una risposta immunitaria di tipo Th2. Ulteriori studi si rendono comunque necessari per suffragare tale ipotesi e meglio chiarire il ruolo dell'IFN- $\gamma$  in corso di infezione mammaria da *S. uberis*. Per definire ulteriormente i meccanismi di difesa immunitaria che la mammella ovina è in grado di contrapporre all'insorgenza delle mastiti da batteri ambientali sarebbe auspicabile un approfondimento sulle dinamiche delle citochine espresse in fase acuta (IL-8, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) nel corso delle prime fasi dell'infiammazione.

## Local and systemic cytokines response during mastitis caused by *S. uberis*

**Key words:** *S. uberis*, mastitis, interferon- $\gamma$ , interleukin-4.

## Bibliografia

- Bergonier D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X., (2003). Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research* 34, 689-716.
- Contreras A., Sierra D., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J., Gonzalo C., (2007). Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research* 68, 145-153.
- Phuektes L.H., Mansel P.D., Rodney S.D., Hooper N.D., Dick J.S., Browning G.F., (2001). Molecular epidemiology of *Streptococcus uberis* isolates from dairy cows with mastitis. *J. Clin. Microbiol.* 39, 1460-1466.
- Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G., (2010). Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Rum. Res.* 88, 119-125.
- Bannermann D.D., Paape M.J., Goff J.P., Rimura K., Lippolis J.D., Hope J.C., (2004). Innate immune response to intramammary infection with *Serratia marcescens* and *Streptococcus uberis*. *Veterinary Research* 35, 681-700.
- Rambeaud M., Almeida R.A., Pighetti G.M., Oliver S.P. (2003). Dynamics of leukocytes and cytokines during experimentally induced *Streptococcus uberis* mastitis. *Vet. Immunol. Immunopath.* 96-193-205.
- Pedersen L.H., Aalbæk B., Røntved C.M., Ingvarstsen K.L., Sorensen N.S., Heegard P.M.H., Jensen H.E., (2003). Early pathogenesis and inflammatory response in experimental bovine mastitis due to *Streptococcus uberis*. *J. Comp Path.* 128, 156-164.
- Winter P., Colditz I.G., (2002). Immunological response of the lactating ovine udder following experimental challenge with *Staphylococcus epidermidis*. *Vet. Immunol. Immunopath.* 89, 57-65.

# Intossicazione in ovini da errata alimentazione: case report



D. VICARI<sup>1</sup>, V. CURRÒ<sup>1</sup>, A. DI GRIGOLI<sup>2</sup>, C. PANEPINTO<sup>3</sup>, V. RANDAZZO<sup>1</sup>,  
A. D'ORAZI<sup>1</sup>, A. GRECO<sup>1</sup>, D. VARGETTO<sup>1</sup>, R. PULEIO<sup>1</sup>, G. CHIARENZA<sup>1</sup>,  
S. CARACAPPA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Dipartimento DEMETRA, Settore di Produzioni Animali Università degli Studi di Palermo

<sup>3</sup> ASP 1 Agrigento

**Parole chiave:** ovino, intossicazione, alimentazione.

**INTRODUZIONE** - Nonostante il cambio generazionale e la evoluzione dell'allevamento tradizionale in uno più moderno ed attento al benessere degli animali, non è raro trovarsi di fronte a grossolani errori di conduzione aziendale con il risultato della insorgenza negli stessi animali di patologie anche piuttosto gravi. È il caso della somministrazione con la razione di mangimi destinati a grossi animali ed utilizzati con successo nell'alimentazione degli stessi, ad animali di specie diversa con l'aspettativa di risultati altrettanto vantaggiosi. Il presente lavoro riporta le risultanze di un episodio registrato in un allevamento della provincia di Agrigento nell'inverno 2011.

**MATERIALI E METODI** - La nostra esperienza riguarda un gruppo di animali di specie ovina già svezzati appartenenti ad un effettivo di circa 500 soggetti tra ovini di razza Valle del Belice e caprini di razza derivata di Siria nonché bovini ad indirizzo produzione di carne. Gli ovini erano allevati in regime di stabulazione fissa a causa della stagione invernale particolarmente rigida e della conseguente mancanza di pascolo. L'azienda si trova in alta collina a circa 950 metri sul livello del mare nella provincia di Agrigento. Nel periodo di febbraio 2011 iniziano in allevamento problemi clinici che portano nel gregge alla morte di diversi soggetti. Questi ultimi tutti giovani di età compresa tra 5 e 7 mesi venivano a morte senza segni clinici particolarmente evidenti. In un primo momento tali episodi erano stati attribuiti a gastroenterotossemia, ma essendo nel breve periodo venuti a morte oltre venti soggetti alcune carcasse sono state sottoposte ad esame autoptico. Contestualmente su animali in vita appartenenti allo stesso nucleo sono stati effettuati, con criteri random, prelievi ematici per la determinazione dei principali indicatori emato-clinici al fine di potere trarre elementi utili alla valutazione dei parametri generali.

**RISULTATI E CONCLUSIONI** - Il quadro macroscopico era caratterizzato da ittero diffuso con lesioni epatiche gravi a carattere steatosico, congestione a carico dell'intestino, congestione ed edema dei reni con fatti autolitici (rene molle). Dagli organi prelevati in sede autoptica gli esami batteriologici hanno portato all'isolamento di clostridium perfringens ed il riscontro istologico nel fegato ha rivelato di necrosi centro lobulare diffusa con presenza di vacuoli eosinofili citoplasmatici. Il quadro riguardante la milza era quello di una splenite congestiva emorragica con marcata iperemia dei seni venosi, e regressione dei follicoli linfatici. Per il rene che non presentava architettura d'organo conservata non è stato possibile proseguire con le indagini istologiche; macroscopicamente il quadro era quello di un "rene molle". L'allevamento ufficialmente indenne da brucellosi non evidenziava segni evidenti di

patologie di origine infettiva. Le risultanze delle indagini ematocliniche hanno svelato nella quasi totalità dei soggetti esaminati un quadro epato renale fortemente alterato con livelli particolarmente elevati di urea, LDH, CK, anisocitosi, anemia normocitica e normocromica e marcata trombocitemia, marcata ipoalbuminemia, ipolipidemia e valori sierici notevolmente aumentati di gamma-GT, GOT e bilirubina totale, nonché creatininemia.

**DISCUSSIONE** - Nel corso del rilievo anamnestico all'allevatore venivano richieste indicazioni circa il tipo di alimentazione cui gli animali erano sottoposti. Agli agnelli nati a settembre 2011, dal mese novembre per lo svezzamento veniva utilizzato un mangime del commercio formulato per l'ingrasso dei vitelli; lo stesso allevatore lo somministrava indistintamente ai bovini, agli ovini ed ai caprini della sua azienda con modalità ad libitum e con disponibilità di fieno polifita.

Il peso iniziale degli agnelli a 40-50 gg era circa 8-12 kg e a patologia conclamata era di 40-50 kg (età circa 5 mesi). Si può stimare una ingestione iniziale di circa 0,550 sino ad un massimo di 2 kg. Da quanto l'allevatore riferisce si può desumere che gli agnelli abbiano avuto un incremento ponderale di circa 350 g/d valore sicuramente un po' oltre la media. Ipotizzando tale crescita si può ipotizzare, dalle tabelle dell'INRA, un fabbisogno crescente in funzione del peso che aumenta da 25 a 40 kg di peso vivo da 1 a 1,60 UFC e da 95 a 150 g/d di PD o 120-200 g PG. Considerando un'ingestione crescente da circa 0,5 kg a 1,5 kg tq, si può supporre una ingestione (presupponendo che il mangime abbia un valore nutritivo di 1,4 ufc/SS) che va da 0,7 a 2,1 UFC e da 90 a 270 g di PG. Alla luce di quanto detto, i livelli di ingestione, a nostro avviso, sono sicuramente elevati ma a questi non possono essere gli unici responsabili della sintomatologia e delle morti degli animali. La formulazione del mangime somministrato, prevedeva un quantitativo di rame (solfato rameico, pentaidrato) di 20 mg/kg e una quantità di zinco (solfato di zinco, monoidrato) di 180 mg/kg quantità che contrastano con le normali esigenze nutrizionali di agnelli in svezzamento. L'assunzione cronica di una quantità di oligoelementi segnatamente di Cu e Zn molto al di sopra del fabbisogno ha sicuramente determinato una tossicosi generalizzata con quadro istolesivo grave a livello dei parenchimi, in accordo con quanto disponibile in bibliografia.

*Ringraziamenti: si ringraziano G. Rubino, R. Calato, G. Verro e P. Bono per il supporto tecnico fornito.*

## ■ A toxic syndrome in ovine because of bad feed: a case report

**Key words:** ovine, toxic syndrome, feed.

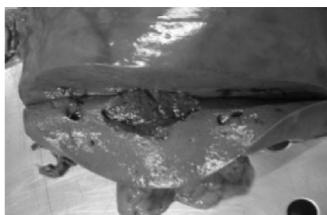


Figura 1 - Aspetto del fegato.



Figura 2 - Aspetto del rene.

## Bibliografia

- J.G. Allen et al.: Zinc toxicity in ruminants J. COMP. PATH. 1983. VOL. 93. SCALM'S Veterinary hematology sixth edition 2010 ed Wiley Blackwell.  
Zannetti G., Ubaldi A., Fusari A., Cristini L., Lazzarelli S.: Intossicazione iatrogena da rame nella pecora <http://www.ismea.it/flex/AppData/Redational.../20000118000100136.pdf>.  
B.J. Martin, Disko R.C., Chrisp C.E., Ringler D.H.: Copper poisoning in sheep. Lab. Animal Sci., 38,734, 1988.

# Ingestione e produzione di latte in pecore alimentate con piante aromatiche



R. MANCA<sup>1</sup>, M.G. SERRA<sup>1</sup>, O. BOAVENTURA NETO<sup>1</sup>, M. DECANDIA<sup>2</sup>, M. ACCIARO<sup>2</sup>, A. CANNAS<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari

<sup>2</sup> Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali, Agris Sardegna, Olmedo, Italia

**Parole chiave:** pianta aromatica, latte, ingestione, ovini.

**INTRODUZIONE** - Negli ultimi anni numerose ricerche hanno riguardato l'uso di piante aromatiche, o di loro estratti, con azione antimicrobica come alternativa alla somministrazione di antibiotici ad uso zootecnico, per modulare la microflora ruminale o per modificare la composizione del latte (Benchaar et al., 2008). In particolare, il progetto europeo Techeese si è posto come obiettivo principale quello di trasferire dalle piante aromatiche, utilizzate come ingredienti delle normali razioni alimentari, al latte sostanze antimicrobiche naturali per ridurre gli effetti di microrganismi indesiderati nei prodotti caseari ovini ottenuti con latte crudo. Nello specifico, l'obiettivo di questo lavoro era di studiare gli effetti di alcune specie di piante aromatiche con azione antimicrobica (*Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*) sull'ingestione e sulla produzione quanti-qualitativa di latte di pecore in lattazione.

**MATERIALI E METODI** - Ventiquattro pecore Sarde in lattazione sono state suddivise in 3 gruppi omogenei. A ciascuno è stata quindi assegnata una delle tre piante aromatiche (*Melissa officinalis*, *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris*) da testare, con 4 diversi dosaggi (0 g/d – controllo - 50, 125 e 200 g/d di piante aromatiche, somministrate miscelate con granelle spezzate di mais e pisello proteico) secondo uno schema a quadrato latino 4 x 4 con due repliche per trattamento (8 animali per ciascun trattamento) e rotazione ogni due settimane. I quadrati latini erano indipendenti fra loro ma condotti in parallelo. Le miscele contenenti le diverse dosi di piante aromatiche venivano somministrate individualmente durante le due mungiture giornaliere e lasciate a disposizione delle pecore per 20 minuti. Alla fine si raccoglievano e pesavano eventuali residui. Durante il resto della giornata le pecore erano alimentate in gruppo con fieno di medica, medica disidratata e polpe di bietola. La produzione totale di latte del gregge sperimentale è stata misurata giornalmente, mentre, in 3 occasioni durante ogni ciclo, si è misurata la produzione individuale del latte e si è provveduto al campionamento individuale del latte per la determinazione del contenuto in grasso, proteine, lattosio, urea e cellule somatiche. I dati di ingestione delle erbe aromatiche sono stati sottoposti ad ANOVA utilizzando la specie botanica come effetto fisso. I dati di produzione e composizione del latte sono stati sottoposti ad ANOVA con la specie botanica, la dose e il periodo di rilievo come fattori fissi.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati dell'esperimento hanno mostrato come col dosaggio più basso e quello intermedio tutte le piante aromatiche fossero ingerite completamente, mentre al dosaggio più elevato ci fosse uno scarto del 37% per la *Melissa officinalis*, del 10% per il *Thymus vulgaris* e del 6% per l'*Ocimum basilicum* (Tab. 1). La bassa ingestione della *Melissa officinalis* alle dosi maggiori di utilizzo potrebbe dipendere dal fatto di essere molto fibrosa, voluminosa e coriacea. Non è comunque da escludere un effetto diretto dei suoi composti secondari sulla sua appetibilità. Non ci sono state differenze significative di produzione di latte ( $P > 0.1$ ; Tabella 2). La percentuale di grasso era significativamente ( $P < 0.001$ ; Tabella 2) superiore con la *Melissa officinalis* rispetto al *Thymus vulgaris* ed all'*Ocimum basilicum*. La percentuale di proteine del latte era invece più alta per l'*Ocimum basilicum* rispetto al *Thymus vulgaris* ( $P < 0.023$ ; Tabella 2), con la *Melissa officinalis* in posizione intermedia. La concentrazione di lattosio è stata significativamente più elevata con la *Melissa officinalis* rispetto alle altre specie. Il numero di cellule somatiche era significativamente inferiore nella *Melissa officinalis* rispetto all'*Ocimum basilicum*, con il *Thymus vulgaris* in posizione intermedia. L'urea nel latte è risultata più elevata nel trattamento *Melissa officinalis* rispetto agli altri due, anche se le differenze osservate avevano un limitato significato biologico. I valori di urea riscontrati erano in linea con quelli tipici della specie ovina. Per quanto riguarda i fattori dose e periodo non ci sono state differenze significative, se non per l'urea nel latte (Tab. 2).

**Tabella 1** - Ingestione media (g/d di SS per capo) delle erbe aromatiche somministrate durante la mungitura.

Pianta	Dose 200 g/d		Dose 125 g/d		Dose 50 g/d	
	Media	D.S	Media	D.S	Media	D.S
Melissa	134 <sup>b</sup>	± 66,6	120	± 9,6	50	± 0,5
Ocimum	191 <sup>a</sup>	± 7,5	127	± 0,5	51	± 0,0
Thymus	177 <sup>a</sup>	± 21,7	120	± 4,9	49	± 0,3

<sup>a,b</sup> nella stessa colonna =  $P < 0,05$ .

**Tabella 2** - Produzione e composizione del latte. Confronto tra le specie di piante aromatiche.

Pianta	Latte (g/d)	Grasso (%)	Prot. (%)	Lattosio (%)	SCC*	Urea (mg/dl)
Melissa	1344	6,06 <sup>a</sup>	5,13 <sup>ab</sup>	4,57 <sup>a</sup>	211 <sup>b</sup>	42,8 <sup>a</sup>
Ocimum	1350	5,69 <sup>b</sup>	5,18 <sup>a</sup>	4,56 <sup>b</sup>	1009 <sup>a</sup>	40,5 <sup>b</sup>
Thymus	1420	5,59 <sup>b</sup>	4,95 <sup>b</sup>	4,47 <sup>b</sup>	817 <sup>ab</sup>	39,1 <sup>b</sup>
<b>Fattori:</b>		<b>P&lt;</b>				
pianta	NS	0,001	0,023	0,024	0,031	0,000
dose	NS	NS	NS	NS	NS	0,002
periodo	NS	NS	NS	NS	NS	0,000

<sup>a,b</sup> nella stessa colonna =  $P < 0,05$  \* Cellule somatiche, x 1000/ml.

**CONCLUSIONI** - La *Melissa officinalis* è stata la specie meno ingerita fra quelle studiate, in particolare ai dosaggi più elevati. La produzione di latte non si è differenziata a seguito dei trattamenti. La composizione del latte è stata invece fortemente influenzata dalle specie aromatiche utilizzate, anche se non vi erano differenze entro specie dovute ai dosaggi utilizzati. In particolare, nel complesso la *Melissa officinalis* ha determinato una migliore composizione del latte rispetto alle altre specie. La mancanza di effetti negativi sulla produzione di latte suggerisce che queste piante aromatiche potrebbero essere utilizzate senza detrimento in razioni per pecore da latte. Gli effetti osservati sulla composizione del latte meritano però maggiori approfondimenti, per individuare i meccanismi responsabili di queste modificazioni e gli effetti sulle caratteristiche dei formaggi, con particolare riguardo a possibili azioni antimicrobiche.

Ringraziamenti: ricerca finanziata dal progetto UE Techeese (Coordinatore Prof. M.I. Berruga; Project 243638).

## Intake and milk production of ewes fed aromatic plants

**Key words:** aromatic plant, milk, intake, sheep.

## Bibliografia

Benchaar C., Calsamiglia S., Chaves A.V., Fraser G.R., Colombatto D., McAllister T.A., Beauchemin K.A. 2008. A review of plant-derived essential oils in ruminant nutrition and production. *Animal Feed Science and Technology* 145, 209-228.

# Un caso di broncopolmonite necrotizzante da *Corynebacterium pseudotuberculosis*



E. BIASIBETTI<sup>1</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>2</sup>, D. VICARI<sup>2</sup>, P.R.D. ROCHA<sup>1</sup>, G. GUARNERI<sup>2</sup>, D. TASCA<sup>2</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>1</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** *Corynebacterium pseudotuberculosis*, agnello, polmone, patologia.

**INTRODUZIONE** - Il *C. pseudotuberculosis* è stato isolato in allevamenti di piccoli ruminanti in Europa, Australia, Nord e Sud America, Africa e Medio Oriente (Robins, 1991; Paton et al., 2005). La forma viscerale è caratterizzata da granulomi a livello linfonodale o in altri organi. Nella pecora le principali localizzazioni sono a livello del parenchima polmonare e dei linfonodi mediastinici. Altre lesioni sono state segnalate a livello di fegato, reni, mammella, e più raramente cuore, scroto, utero, cervello o midollo spinale (Valli and Parry, 1993).

Gli autori descrivono un caso di broncopolmonite pio-granulomatosa sostenuta da *C. pseudotuberculosis* in un agnello maschio di 2 settimane di età, di razza Valle del Belice sacrificato a causa di una grave compromissione polmonare e anoressia.

**MATERIALI E METODI** - Nel mese di settembre, in occasione dei parti estivi in un gregge di circa 300 pecore allevato nell'entroterra siciliano, veniva sottoposto a visita clinica un agnello in decubito costale da qualche giorno, con grave abbattimento del sensorio, dispnea, tachicardia e febbre. Considerata la grave compromissione generale e la mancata volontà da parte del proprietario di intraprendere alcuna terapia medica si è deciso di sacrificare l'animale.

Dopo il prelievo, campioni di polmone, fegato e rene sono stati fissati in formalina tamponata al 10%. I campioni immersi in formalina, una volta completata la fissazione sono stati ulteriormente dimensionati, orientati e, quindi, inclusi in paraffina in un processore automatico utilizzando un ciclo standard di 24 ore. I campioni di tessuto sono stati pertanto disidratati attraverso passaggi in una serie di alcoli a gradazione crescente (etanolo 50°, 75°, 95° ed assoluto) ed infine passati in xilolo per la completa disidratazione e la compenetrazione con la paraffina liquida. Con il microtomo si è proceduto quindi all'allestimento di fettine di 3-6 µm colorate con il metodo standard ematossilina-eosina e con la tecnica Ziehl-Neelsen.

**RISULTATI** - All'esame necroscopico si osservava a livello del polmone una grave flogosi necrotico-emorragica che interessava gran parte del polmone sinistro e le porzioni cranio-ventrali del polmone destro. Inoltre, era presente una grave epatizzazione dell'organo con notevole aumento della consistenza.

Istologicamente è presente a livello polmonare una diffusa e grave flogosi granulomatosa organizzata in piccoli focolai privi di centro necrotico costituiti prevalentemente da cellule mononucleate e numerose cellule giganti in periferia. Sono inoltre presenti foci colliquativi con infiltrazione di cellule polimorfonucleate. La colorazione Ziehl-Neelsen è risultata negativa. A livello epatico si evidenzia una degenerazione idropico-vacuolare multifocale soprattutto centro-lobulare, mentre nel rene è presente una steatosi tubulare a focolai associata a lieve nefrite interstiziale non purulenta.

L'esame batteriologico, effettuato a partire da parenchima polmonare, ha rilevato la presenza di *C. pseudotuberculosis*.

**DISCUSSIONE** - A memoria dell'allevatore, casi simili con grave compromissione polmonare risultano sporadici e raramente vengono osservate linfadeniti caseose ai linfonodi superficiali all'interno dell'allevamento. Le lesioni macroscopiche a livello polmonare caratteristiche di *C. pseudotuberculosis* sono descritte come pio-granulomi capsulati simili a quelli che interessano i linfonodi (Baird e Fontaine, 2007). Nel presente studio a livello polmonare è invece stato osservato un quadro macroscopico anomalo con lesioni flogistiche disseminate, di tipo necrotico-emorragico, non capsulate e prive del classico centro necrotico caseoso; si evidenziava, inoltre, un notevole aumento della consistenza. Un quadro simile, caratterizzato da broncopolmonite, viene segnalato come occasionale da Valli e Parry (1993). In associazione a questo tipo di flogosi broncopolmonare si possono osservare zone di pleurite, con conseguente sviluppo di aderenze fibrinose con la parete toracica, il pericardio o il diaframma (Stoops et al., 1984). I risultati istologici, che evidenziano una flogosi granulomatosa organizzata in piccoli focolai costituiti prevalentemente da cellule mononucleate e numerose cellule giganti in periferia, concordano con quelli riportati in letteratura benché comunemente le cellule multinucleate siano di raro riscontro.

Nonostante le lesioni possano essere correlate alla presenza del *Corynebacterium pseudotuberculosis* e l'esame batteriologico supporti questa diagnosi, è in corso un'ulteriore indagine di tipo biomolecolare per escludere una concomitante infezione da *Mycobacterium spp.*

**CONCLUSIONI** - Gli autori ritengono interessante uno studio più approfondito per valutare la reale prevalenza di queste lesioni atipiche. Nonostante, infatti, sia considerata una zoonosi minore il rischio di trasmissione dell'infezione all'uomo non va trascurato soprattutto per gli operatori del settore (allevatori, veterinari, laboratoristi) (Baird e Fontaine, 2007).

## ■ Necrotizing broncopneumonia by *Corynebacterium pseudotuberculosis* in a lamb

**Key words:** *C. pseudotuberculosis*, lamb, lung, pathology.

## Bibliografia

- Baird G.J. e Fontaine M.C. (2007), J. Comp. Pathol.; 137: 179-210.  
 Paton M.W., Collett M.G., Pepin M. and Bath G.F. (2005), *Corynebacterium pseudotuberculosis* infections. In: Infectious Diseases of Livestock, 3rd Edit., J.A.W. Coetzer and R.C. Tustin, Eds, Oxford University Press Southern Africa, CapeTown, 1917-1930.  
 Robins R. (1991), State Veterinary Journal; 1: 7-10.  
 Stoops S.G., Renshaw H.W. and Thilsted J.P. (1984), American Journal of Veterinary Research; 45: 557-561.  
 Valli V.E.O. and Parry B.W. (1993), Caseous lymphadenitis, In: Pathology of Domestic Animals, Vol. 3, 4th Edit., K.V.F. Jubb, P.C. Kennedy and N. Palmer, Eds, Academic Press, San Diego, 238-240.

# Otite ed ascessi otogenici causati da graminacee in ovini e caprini: clinica e patologia



S.A. MIGNACCA<sup>1</sup>, M. MUCCIARELLI<sup>2</sup>, M. FIASCONARO<sup>1</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>3</sup>,  
E. BIASIBETTI<sup>3</sup>, M. RUSSO<sup>1</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze della Vita e Biologia dei Sistemi, Università degli Studi di Torino

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

**Parole chiave:** ovini, caprini, otite, graminacea.

**INTRODUZIONE** - Gli autori descrivono alcuni episodi di otiti medie ed interne di tipo catarrale-emorragico e purulento, ascessi otogeni e conseguenti sindromi oto-encefaliche in un gregge ovino e caprino della provincia di Palermo. Le lesioni causate sono state attribuite all'introduzione di ariste di graminacee all'interno del condotto uditivo e complicate da batteri piogeni e larve di ditteri. Viene riportata la sintomatologia clinica ed il quadro anatomico-patologico.

**MATERIALI E METODI** - In un gregge costituito da circa 300 pecore di razza Pinzirita e 30 capre di razza Messinese allevate allo stato semi-brado a circa 500m s.l.m., il proprietario lamenta nel periodo che va da Aprile a Novembre episodi di otiti sia monolaterale che bilaterale, sintomatologia neurologica, deperimento e morte degli animali colpiti (circa 20-30 animali per anno). Al momento del sopralluogo in azienda è stata eseguita un'attenta anamnesi, una visita clinica degli animali colpiti, un esame anatomopatologico su due pecore con lesioni bilaterali venute a morte e tamponi auricolari da alcuni animali con lesioni sia acute che pregresse. Gli esami colturali sono stati indirizzati alla ricerca di agenti piogeni.

**RISULTATI** - Gli animali con sintomatologia acuta o sub-acuta mostravano scuotimento del capo e scolo auricolare mono o bilaterale di tipo catarrale-emorragico; nei casi cronici, invece, gli animali si presentavano disoressici, abbattuti, isolati dal gruppo e con scolo auricolare in alcuni casi purulento. Spesso si sovrapponevano complicazioni sostenute da miasi del genere *Lucilia* spp. Alcuni animali manifestavano sintomi vestibolari con deviazione del capo e disturbi dell'equilibrio.

L'esame anatomopatologico evidenziava una grave otite media ed interna complicata da miasi; a livello del condotto uditivo sono state reperite bilateralmente ariste di graminacee parzialmente inglobate in materiale ceruminoso ed essudato catarrale-emorragico e purulento. All'apertura del cranio, uno dei due animali presentava lesioni ascessuali a livello della base del cervelletto e del ponte e ascessi adesi alla teca ossea circondati da coaguli ematici.

L'esame batteriologico ha rilevato la presenza di *Staphylococcus aureus* e *S. intermedius*. La pianta causa delle otiti è stata identificata come *Dasyphyrum villosum*, una pianta erbacea annuale (L.) P. Candargy, non Borbás sin. *Haynaldia villosa* (L.) Schur), che il Pignatti (1982) segnala

comune in Liguria, versante tirrenico della Penisola, Sicilia, Sardegna e Isole Minori. Rara nell'Italia settentrionale dove per lo più è avventizia. Cresce negli incolti, nei pascoli aridi ("pratelli aridi mediterranei e praterie collinari a grano villosa"), macerie, bordi stradali, luoghi arenosi specialmente litoranei, da 0 a 1600 m s.l.m. È una specie allogama, dotata di ampia variabilità genetica, che sembra capace di ibridazione con il frumento duro.

**DISCUSSIONE** - Otiti medie ed esterne vengono descritte in diverse specie animali (Cornaglia, 2002). L'esame anamnestico, l'esame clinico e quello anatomico-patologico hanno permesso di svelare la natura della patologia. Purtroppo la massiccia ed estesa infestazione dei campi con la pianta non ne permetteva la bonifica dei pascoli, tuttavia, veniva consigliato al proprietario di allontanare gli animali dai pascoli quando le ariste giungevano a maturazione. I casi di sintomatologia vestibolare erano conseguenti alla flogosi a carico dell'orecchio interno, mentre la manifestazione neurologica, causata dagli ascessi otogeni, dipendeva dal coinvolgimento dell'ottavo nervo cranico e successivamente delle meningi basolaterali del midollo allungato all'uscita del nervo stesso (M. Vandavelde et. al, 2002).

**CONCLUSIONI** - La presenza sul territorio siciliano di piante infestanti responsabili di lesioni auricolari e di ascessi otogeni porta gli autori a suggerire un monitoraggio dei pascoli incolti e marginali.

## ■ Otitis and otogenic abscesses caused by gramineae in a flock of sheep and goats: the clinic and pathology

**Key words:** sheep, goat, otitis, gramineae.

## Bibliografia

- Cornaglia E., (2002), Organi di senso in: Trattato di anatomia patologica veterinaria. F. Guarda, G. Mandelli; Ed. UTET. Torino; 735-750.  
Pignatti S., (1982), Flora d'Italia (vol.III), Edagricole, Bologna.  
Vandavelde M., Fatzer R., Guarda F. (2002), Sistema nervoso in: Trattato di anatomia patologica veterinaria. Guarda F., Mandelli G.; Ed. UTET. Torino; 697-734.

# Intossicazione acuta da piante contenenti acido ossalico (*Oxalis pes-caprae*) in un gregge ovino: valutazioni cliniche ed anatomo-istopatologiche



C. STELLETTA<sup>1</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>2</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>2</sup>, V. ARONICA<sup>2</sup>, E. BIASIBETTI<sup>3</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>3</sup>, P. ZANGHÌ<sup>2</sup>, I. VAZZANA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

**Parole chiave:** ovini, rene, acido ossalico, nefrosi acuta.

**INTRODUZIONE** - L'intossicazione da ossalato negli ovini è stata associata a diverse varietà di specie vegetali. Le piante più importanti coinvolte nelle intossicazioni da ossalato nei ruminanti sono: *Halogeton glomeratus*, *Oxalis spp.*, *Rheum Rhaponticum*, *Rumex crispus*, *Portulaca oleracea*, *Chenopodium album*, *Bassia hyssopifolia*, *Sarcobatus vermiculatus*, *Amaranthus spp.*, *Salsola kali*, *Beta vulgaris* (Sargison e Angus 2007; Angus 2008, Aslani et al.2011).

Gli autori descrivono un episodio d'intossicazione da piante contenenti acido ossalico (*Oxalis pes-caprae*) in un gregge di pecore di razza Valle del Belice allevato nell'entroterra siciliano. Gli animali colpiti presentavano astenia e tremori muscolari.

**MATERIALI E METODI** - Gli animali (ca. 270) sono stati classificati in gruppi in base alla presenza della sintomatologia clinica e alla possibilità di accesso al pascolo infestato dalle piante tossiche. Su un totale di 26 soggetti (ca. 10%) sono stati effettuati prelievi di sangue per esami ematochimici.

I gruppi identificati sono stati i seguenti: soggetti giovani e maschi asintomatici e senza accesso al pascolo infestato (Gruppo A – 8 animali); soggetti femmine in asciutta sane con accesso al pascolo (Gruppo B – 5 animali); soggetti femmine in lattazione sane con accesso al pascolo (Gruppo C – 5 animali); soggetti femmine in asciutta con accesso al pascolo, clinicamente malate (Gruppo D - 4 animali) e trattate immediatamente dopo il sospetto diagnostico con calcio gluconato all'1% (Gruppo E, ovvero gruppo D dopo 24 ore dalla terapia).

Dall'unico soggetto (femmina in asciutta) ritrovato morto, in seguito all'esame autoptico campioni di rene e fegato sono stati posti in formalina tamponata al 10% e processati routinariamente per l'esame istologico.

**RISULTATI** - Gli esiti dell'esame di ematochimico hanno evidenziato il danno renale in quanto presentavano valori elevati di urea (figura 1) e di enzimi relativi al danno tissutale (LDH, GOT e GPT). Inoltre viene riportato un incremento significativo di magnesemia ( $2,05 \pm 0,11$ ,  $3,8 \pm 1,4$ ,  $4,06 \pm 1,69$ ,  $4,87 \pm 0,59$ ,  $6,3 \pm 1,17$  mg/dL per i gruppi A, B, C, D ed E rispettivamente) e una diminuzione della calcemia ( $10,6 \pm 1,07$ ,  $10,2 \pm 0,99$ ,  $11,3 \pm 0,45$ ,  $9,75 \pm 1,19$ ,  $10 \pm 1,59$  mg/dL per i gruppi A, B, C, D ed E rispettivamente) nel gruppo con sintomatologia clinica.

L'esame anatomo-patologico ha evidenziato reni diffusamente pallidi con strie biancastre disposte radialmente soprattutto nella midollare. Inoltre, è stata osservata congestione epatica e polmonare.

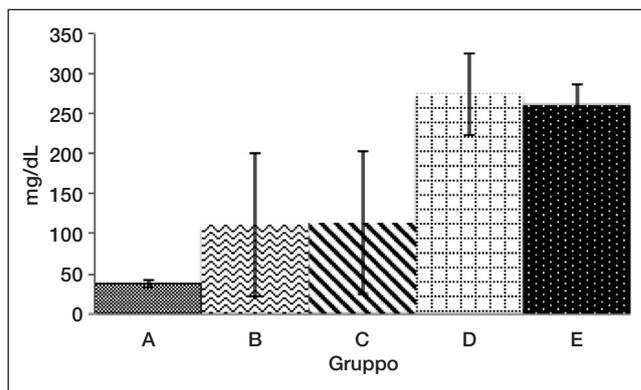
Istologicamente, il rene ha mostrato un quadro degenerativo caratterizzato da necrosi tubulare acuta prevalentemente nella corticale e marcata dilatazione delle capsule di Bowman con atrofia dei glomeruli e stasi di pre-urina.

A carico del fegato era apprezzabile un'epatite necrotizzante acuta multifocale di modesta gravità, mononucleata, periportale accompagnata da degenerazione idropica e vacuolare.

**DISCUSSIONE** - L'avvelenamento da acido ossalico è caratterizzato generalmente da lesioni gastro-intestinali e renali e da disturbi neuromuscolari. I risultati clinici e patologici concordano con le precedenti descrizioni di avvelenamento da ossalato nelle pecore.

La sintomatologia clinica in particolare è imputabile all'elevata azotemia e ipermagnesemia.

Non sono stati osservati precipitati di cristalli di ossalato di calcio intratubulari, reperti caratteristici riportati in letteratura (Jacob e Peet



**Figura 1** - Valori di uremia presenti nei diversi gruppi monitorati.

1989; Panciera et al. 1990; Aslani et al.2011). I reni di questi animali mostravano infatti un pallore diffuso ascrivibile ai processi necrotici tubulari come segnalato da Aslani (2011). I valori enzimatici e di azotemia nei soggetti con sintomatologia clinica erano superiori rispetto a quelli riportati per la specie (Di Mauro et al. 2008). Analogamente a quanto descritto da Aslani (2011) era presente una generale congestione dei tessuti sottocutanei, mucosa ruminale congesta ed emorragica, polmoni con edema ed emorragie e congestione del fegato con degenerazione vacuolare da lieve a moderata.

**CONCLUSIONI** - La presenza sul territorio siciliano di piante contenenti acido ossalico responsabili di intossicazioni suggerisce una particolare attenzione al management aziendale soprattutto in riferimento all'alimentazione al pascolo e all'adeguata e costante presenza di fonti di abbeveraggio.

## Acute poisoning associated to ingestion of *Oxalis pes-caprae* in sheep: clinical and histopathological investigations

**Key words:** sheep, kidney, oxalic acid, acute nephrosis.

## Bibliografia

- Angus K.W. (2008), Plant poisoning in Britain and Ireland. In: I. D. Aitken (eds), Diseases of Sheep, 4th edn, (Blackwell, Oxford), 405-423.
- Aslani M.R., Movassaghi A.R., Najrnezhad V., Pirouz H.J., Bami M.H. (2011), Tropical Animal Health Production; 3: 1065-8.
- Di Mauro C., Bonelli P., Nicolussi P., Rassu S.P.G., Cappio-Borlino A., Pulina G. The Veterinary Journal; 178: 278-281.
- Jacob R.H., Peet R.L. (1989), Australian Veterinary Journal; 66: 91-92.
- Panciera R.J., Martin T., Burrows G.E., Taylor D.S., Rice L.E. (1990), Journal of American Veterinary Medicine Association; 196: 1981-1984.
- Sargison N.D., Angus K.W. (2007), Diseases of the urinary system. In: I. D. Aitken (eds), Diseases of Sheep, 4th edn (Blackwell, Oxford), 393-423.

# Insolito caso di intossicazione da “pollina”: osservazioni cliniche ed indagini anatomo- istopatologiche



S.A. MIGNACCA<sup>1</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>2</sup>, P.R.D. ROCHA<sup>2</sup>, E. BIASIBETTI<sup>2</sup>,  
C. STELLETTA<sup>3</sup>, G. GUARNERI<sup>1</sup>, D. TASCA<sup>1</sup>, I. VAZZANA<sup>1</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>3</sup> Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova

**Parole chiave:** ovini, urati, rene.

**INTRODUZIONE** - Gli uccelli eliminano azoto principalmente come acido urico o il suo sale (sali di urato) con urea e ammoniaca (Braun, 2003). L'acido urico è un elemento organico che gli animali producono nel metabolismo delle purine. In un contesto clinico l'iperuricemia è un indicatore prognostico di malattia renale. I calcoli renali sono costituiti da sali di calcio depositati su una matrice organica di ossalato e di urato. La loro formazione avviene nell'ultrafiltrato glomerulare in presenza di pH acido (ossalato o urato) o alcalino (carbonati e fosfati) (De Oliveira e Burini, 2012). L'acido urico ha un ruolo importante nella formazione di calcoli renali e, quindi, nello sviluppo di un'insufficienza renale progressiva (Capasso et al., 2005). La pollina è usata come concime per aziende a conduzione biologica e può essere ingerita dagli animali se è nella loro disponibilità. Gli Autori riportano i sintomi clinici, gli esiti degli esami di laboratorio ed i reperti anatomico-istopatologici di un insolito caso di intossicazione da “pollina” (guano) di colombi.

**MATERIALI E METODI** - In un allevamento, costituito da circa 700 pecore incrocio comisana, il proprietario riferisce di quattro animali con sintomatologia neurologica ingravescente a seguito d'ingestione di pollina di colombi accumulatasi in un vecchio rudere. Su tre soggetti ancora in vita è stata intrapresa terapia medica a base di somministrazione orale di acqua fredda miscelata ad aceto (0,5l di aceto in 2litri di acqua) e sono stati eseguiti esami di biochimica clinica per valutare l'entità del danno renale provocato.

Dal quarto animale, dopo l'esame autoptico, campioni di diversi organi (encefalo, rene e fegato) sono stati fissati il più rapidamente possibile in formalina tamponata al 10% e processati routinariamente per l'esame istologico.

Sulle sezioni di rene è stata inoltre eseguita l'impregnazione argentea secondo il metodo di Galantha per i cristalli di urati.

**RISULTATI** - La sintomatologia compariva a distanza di circa 48 ore dall'ingestione ed era caratterizzata in tutti gli animali da isolamento dal gruppo, apatia, disoressia, deviazione del capo, ammiccamento, decubito persistente, pedalage, stupore, coma e morte.

Dagli esami ematochimici si è evidenziato un elevato grado di uremia con valori che hanno raggiunto i 230 mg/dl e con livelli di creatinemia pari a 0,9 mg/dL indicativi di blocco renale. Gli enzimi (GOT, GPT, CK, LDH) relativi al danno tissutale sono risultati essere particolarmente elevati in tutti i casi valutati.

L'esame autoptico rivelava congestione generalizzata dei visceri addominali e toracici, steatosi epatica e irregolari striature giallastre nella midollare del rene.

Istologicamente a livello di corteccia cerebrale erano presenti una minima e diffusa spongiosi della sostanza bianca con multifocale degenerazione dei neuroni corticali associata a gliosi. Il fegato era steatosico. I reni mostravano diffusa congestione, piccole emorragie midollari e fibrose. Depositi eosinofili e nerastri intratubulari ed in parte interstiziali erano presenti soprattutto nella midollare. Tali depositi si presentavano talora di aspetto cristallino, talora come piccole goccioline. Molti tubuli contenenti i depositi mostravano un epitelio degenerato ed in sfaldamento. Non si osservavano lesioni glomerulari né vascolari.

**DISCUSSIONE** - I principali segni clinici descritti in corso di tossicosi sono: salivazione eccessiva, tremori, atassia e decubito (Pancierera et al.,

1990), ma questi sintomi sono estremamente generici e non indicativi della causa primaria.

Purtroppo, l'assenza di un tempestivo trattamento medico ha portato a morte anche i tre animali intossicati.

I valori degli enzimi (GOT, GPT, CK e LDH) oltre che di urea e di creatinina sono superiori ai valori di riferimento per pecore da latte (Di Mauro et al., 2008) indicando specificatamente un blocco renale a decorso acuto con danno tissutale per effetti tossici.

L'esame macroscopico del rene ha rivelato la presenza di striature biancastre che presumibilmente corrispondono a cristalli birifrangenti a livello della midollare e della papilla analogamente a quanto riportato in letteratura nel ratto (Spencer et al., 1976). I depositi intratubulari osservati istologicamente sono verosimilmente depositi di sali di acido urico. Purtroppo la mancata fissazione in etanolo, considerata procedura di elezione per evitare la solubilizzazione di questi sali, ha reso impossibile la loro visualizzazione in toto. Tali depositi cristallini sono riportati in letteratura in casi di iperuricemia (Bluestone et al., 1975; Spencer et al., 1976; Guo, 2010). Diversamente da quanto citato in letteratura nei nostri casi non è visibile nefrite interstiziale mononucleata che dovrebbe svilupparsi in seguito all'ostruzione tubulare provocata dai depositi di urati. Nei casi in studio si osserva solo una minima fibrosi interstiziale. Molti tubuli presentano però degenerazione dell'epitelio di rivestimento con tendenza spesso alla necrosi. Questo reperto depone a favore di un decorso iperacuto della lesione. Analogamente a quanto riportato da Bluestone et al. (1975) i glomeruli ed i vasi sanguigni sono nella norma. Le lesioni encefaliche presenti potrebbero essere correlate in parte all'intossicazione e pertanto all'iperammoniemia, ed in parte all'età adulta/anziana degli animali.

**CONCLUSIONI** - Secondo gli autori questa intossicazione da acido urico è il primo caso riportato nell'ovino. Le lesioni istologiche, non pienamente sovrapponibili con quelle presenti in letteratura, suggeriscono la possibilità di un meccanismo patogenico specie-specifico.

## ■ Urine birds poisoning: clinical and histopathological investigations

**Key words:** sheep, uric acid, kidney.

## Bibliografia

- Bluestone R., Waisman J., Klinenberg J.R. (1975), Chronic experimental hyperuricemic nephropathy Lab. Invest. 33(3): 273-9.  
 Braun E.J. (2003), Comp. Biochem. Physiol.; 136: 499-505.  
 Capasso G., Jaeger P., Robertson W.G., Unwin R.J. (2005), Curr. Pharm. Des.; 11: 4153-4159.  
 Di Mauro C., Bonelli P., Nicolussi P., Rassa S.P.G., Cappio-Borlino A., Pulina G. (2008), The Veterinary Journal; 178: 278-281.  
 De Oliveira E.P. and Burini R.C. (2012), Diabetology & Metabolic Syndrome; 4: 12.  
 Guo H.B. (2010), Transplantation Proceedings; 42: 2804-2807.  
 Panciera R.J., Martin T., Burrows G.E., Taylor D.S., Rice L.E. (1990), J. Am. Vet. Med. Assoc.; 196 (12): 1981-4.  
 Spencer H.W., Yarger W.E., Robinson R.R. (1976), Kidney Int.; 9: 489-500.

# Cisti congenite in rene, fegato e pancreas presenti in un piccolo gregge di capre della Regione Calabria



G. LUCIFORA<sup>1</sup>, F. TORCHIA<sup>2</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>3</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>4</sup>, S. AGNELLO<sup>4</sup>, P.R.D. ROCHA<sup>3</sup>, E. BIASIBETTI<sup>3</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>4</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

<sup>2</sup> Medico Veterinario L. P., Catanzaro

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>4</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia - Area di Barcellona P.G. (ME)

**Pareole chiave:** capra, rene, cisti, lesione congenita.

**INTRODUZIONE** - Lesioni cistiche congenite che coinvolgono il fegato e i reni sono riportate negli esseri umani e di rado nelle specie domestiche (Krotec et al., 1996; Newman et al., 2000), di laboratorio e selvatiche. Gli autori riportano un raro episodio di cisti congenite di rene, fegato e pancreas che ha coinvolto capretti di 7-10 giorni di un piccolo gregge di capre allevato in una zona montuosa dell'entroterra calabro.

**MATERIALI E METODI** - L'allevamento di provenienza, situato in Provincia di Catanzaro, è composto da circa 200 ovini e circa 100 caprini incrocio maltese. Il gregge di capre è stato costruito per rimonta interna a partire da un nucleo originario di 10 caprette di razza maltese. L'allevatore garantisce la variabilità genetica sostituendo i maschi ogni tre anni, sebbene essi siano provenienti soltanto da pochi e piccoli allevamenti confinanti. I caprini partoriscono, per lo più, nel periodo di ottobre-novembre mentre le giovani rimonte partoriscono in primavera. Generalmente i parti sono gemellari. L'allevatore opera una rimonta interna allevando annualmente circa 30 capretti di cui 7-8 maschi. Sette capretti di età compresa tra 7 e 10 giorni sono stati sottoposti a visita clinica da parte del veterinario di stalla in quanto mostravano ottundimento del sensorio, decubito sternale, astenia, disoressia e disidratazione. Alla palpazione dell'addome si riscontrava la presenza di una massa pendula di consistenza soda che occupava gran parte della cavità. A fronte dell'anamnesi e del numero di soggetti interessati, il sospetto diagnostico si indirizzava verso un'infezione batterica gastroenterostinale e la massa in addome veniva considerata abomaso ripieno di coaguli compatti di latte. Per tale motivo si prescriveva terapia antibiotica ad ampio spettro associata a terapia di supporto. Dopo 48 ore i soggetti malati non presentavano remissione dei sintomi; inoltre, nello stesso periodo altri 50 capretti circa della stessa età iniziavano a manifestare gli stessi sintomi e lesioni, anche se in maniera più blanda. Nei giorni a seguire, alcuni animali vennero a morte, mentre tutti gli altri mostravano una costante ma lenta ripresa. Su alcuni animali deceduti e su due capretti maschi sacrificati fu eseguito l'esame autoptico per opportuni approfondimenti anatomopatologici e laboratoristici. Gli organi sono stati esaminati macroscopicamente e successivamente posti in formalina tamponata al 10% per mirati esami istologici.

**RISULTATI** - In tutti i casi il quadro anatomo-patologico era sovrapponibile; si osservava notevole aumento di volume di entrambi i reni, i quali si presentavano pallidi e con numerose cisti del diametro di alcuni mm disseminate in tutto il parenchima.

Altresì, il fegato si presentava con voluminose disseminate ectasie cistiche multicamerale ripiene di bile, alcune oblitrate altre comunicanti direttamente con il coledoco. Formazioni cistiche di dimensioni inferiori interessavano anche il pancreas.

**DISCUSSIONE** - Lesioni cistiche congenite coinvolgenti fegato, reni e pancreas sono riportate nella specie umana (Ishak e, Sharp, 1994) e raramente in specie animali domestiche e selvatiche inclusi i cani, i gatti, i suini, il topo e la gazzella (Krotec et al., 1996). Tuttavia le informazioni circa la morfologia, le origini e lo sviluppo sono limitate. In umana

spesso le cisti epatiche e renali coesistono e rientrano in un complesso gruppo di disordini displastici congeniti (Summerfield et al., 1986). Nei cani di razza West Highland White Terriers è descritta una malattia policistica renale ed epatica di origine autosomica recessiva (Meuten, 2002). Cisti pancreatiche sono talvolta riportate come strutture delimitate da parete sottile, solitarie o multiple, probabilmente di origine duttale come esito di malformazioni congenite. Alternativamente cisti pancreatiche possono far seguito a ostruzioni del drenaggio dei dotti (Head et al, 2002). Nelle capre sono riportate lesioni cistiche in reni, fegato e pancreas di presunta origine congenita (Krotec et al., 1996; Newman et al., 2000). Nel fegato in particolare, le cisti sembrano essere anomalie di sviluppo delle cellule epiteliali delle vie biliari e un meccanismo analogo potrebbe essere ipotizzato per la formazione delle cisti renali e pancreatiche. Si ipotizza che il difetto primario risieda nella crescita e differenziazione delle cellule epiteliali che ne provocherebbe una crescita anomala con alterata secrezione e anomalo metabolismo delle cellule della matrice extracellulare. Studi su modelli animali della malattia renale policistica hanno dimostrato un'anomala espressione dei proto-oncogeni nelle cellule epiteliali che delimitano le cisti renali (Calvet et al., 1993; Gabow, 1993). Inoltre, colture primarie di epitelio di reni umani policistici esprimono un eccesso di recettori per il fattore di crescita epidemico (EGF) e rispondono con una eccessiva proliferazione ai fattori di crescita (Gabow, 1993).

**CONCLUSIONI** - Gli autori considerano tale patologia un difetto congenito risultato letale solo per alcuni capretti.

## ■ Congenital cysts in the kidney, liver and pancreas present in a small herd of goats in the Calabria region

**Key words:** goat, kidney, cysts, congenital lesion.

## Bibliografia

- Calvet J. (1993), *Kidney*; 43: 101-108.  
 Gabow P.A. (1993), *N. Engl. J. Med.*; 329: 332-342.  
 Head K.W., Else R.W. and Dubielzig R.R. (2002), Tumors of the alimentary tract. In: *Tumors of Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press.; 481.  
 Ishak K.G., Sharp H.L. (1994), Developmental abnormalities and liver disease in children. In: *Pathology of the Liver*, ed. McSween R.N.M., Anthony P.P., Scheuer P.J., Burt A.D. and Pormann B.C., pp. 83-122. Churchill Livingstone, New York, NY.  
 Krotec K., Meyer B.S., Freeman W., Hamir A.N. (1996), *Vet. Pathol.*; 33 (6): 708-10.  
 Meuten D.J. (2002), Tumors of the Urinary System. In: *Tumors of Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press.; 525.  
 Newman S.J., Lechner T., Crisman M., Ramos J. (2000), *J. Vet. Diagn. Invest.*; 12 (4): 374-378.  
 Summerfield J.A., Nagafuchi Y., Sherlock S., Cadafalch J., Scheuer P.J. (1986), *J. Hepatol.*; 2: 141-156.

# Tre casi di melanomi in piccoli ruminanti: reperti anatomo-istopatologici



S.A. MIGNACCA<sup>1</sup>, E. BIASIBETTI<sup>2</sup>, P.R.D. ROCHA<sup>2</sup>, G. GUARNERI<sup>1</sup>, D. TASCA<sup>1</sup>, L. SPURIA<sup>1</sup>, F. ARTALE<sup>3</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>3</sup> Medico Veterinario Specialista Ambulatoriale, ASP 8 di Trapani

**Parole chiave:** pecora, capra, melanoma.

**INTRODUZIONE** - I melanomi sono tumori cutanei infrequenti nei piccoli ruminanti (Orti *et al.*, 2006; Canpolat *et al.*, 2007; Vala *et al.*, 2012), fatta eccezione per le capre di razza Angora (Bourgoin, 1972; Parsons *et al.*, 1990).

Gli autori descrivono tre neoformazioni cutanee in piccoli ruminanti allevati nella Regione Sicilia.

**MATERIALI E METODI** - Le neoformazioni sono state prelevate mediante escissione chirurgica (amputazione di parte del padiglione auricolare interessato) in due animali o rimosse dopo eutanasia per eccessiva estensione e gravità della lesione.

Dopo l'esame anatomopatologico le neoformazioni sono state poste in formalina tamponata al 10% e processate routinariamente per l'esame istologico.

**RISULTATI** - I primi due animali, una capra Girgentana di 5 anni di età allevata all'interno del Parco dei Nebrodi (Me) ed una pecora delle Langhe di circa 6 anni allevata in provincia di Palermo, presentavano una singola proliferazione di circa 1 cm di lunghezza di colore rosso-nerastro a livello della superficie esterna del padiglione auricolare. Il terzo animale, una capra Girgentana di 7 anni di età allevata nel comune di Messina, mostrava una voluminosa neoformazione, complicata da miiasi, della grandezza di un grosso mandarino e di colore bruno-nerastro a livello della base del corno destro. Istologicamente le proliferazioni erano composte da melanociti polimorfi a differente grado di pigmentazione intracitoplasmatica localizzati prevalentemente a livello della giunzione dermo-epidermica.

**DISCUSSIONE** - I melanomi sono tumori maligni dei melanociti abbastanza frequenti nel cane, mentre poco frequenti nelle altre specie di animali domestici (Goldschmidt e Hendrick, 2002). Il melanoma può presentarsi come una lesione solitaria o multipla e può essere riscontrato nella zona dermo-epidermica o sottocutanea. I melanomi della capra sono altamente maligni, localmente aggressivi, e comunemente provocano metastasi ad altri organi per via linfatica ed ematica. Le sedi principali in cui sono segnalati melanomi maligni nei caprini sono la cute, il cerchio coronario e la base del corno (Mavangira *et al.*, 2008). Raramente, i melanomi possono metastatizzare al sistema nervoso centrale (Koestner e Higgins, 2002) e all'osso (Thompson e Pool, 2002). Le cause di melanomi sono incerte. Negli esseri umani sono stati descritti

fattori di rischio quali la razza, la mancanza di pigmentazione della pelle e l'eccessiva esposizione alla luce solare. Nei cavalli, la perdita del pigmento melanico, l'età avanzata e la pigmentazione del mantello grigio o bianca sono stati identificati come fattori di rischio. Nei bovini, ovini, maiali e cani i melanomi sono stati anche associati alla cute scura. Nelle capre le sedi anatomiche maggiormente interessate da questi tumori sono quelle scarsamente coperte di pelo, come l'orecchio, il muso, l'ano, la vulva, la coda e le mammelle. Nelle capre di razza Angora è stato suggerito che la presenza di melanomi maligni sia secondaria a mutazioni indotte dai raggi ultravioletti (UV) (Mavangira *et al.*, 2008).

**CONCLUSIONI** - La mancanza di pigmentazione della cute associata alla luce UV è stato probabilmente il fattore di rischio per lo sviluppo di questi tumori nelle due capre di razza Girgentana e nella pecora delle Langhe.

## ■ Three cases of melanoma in small ruminants: clinical symptoms and pathological results

**Key words:** sheep, goat, melanoma.

## Bibliografia

- Bourgoin J.J. (1972), *Bulletin de la Societe des Sciences Veterinaires et de Medecine Comparee de Lyon*; 4: 307-314.
- Canpolat I., Yaman I., Gunay C. (2007), *Revue de Médecine Vétérinaire*, 158: 171-173.
- Koestner A., Higgins R.J. (2002), *Tumors of the nervous system*. In: *Tumors of Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press; 737.
- Mavangira V., Hughes J.M., Middleton J.R., Mitchell W.J., Kim D.Y. (2008), *J. Vet. Diagn. Invest.*; 20: 104-107.
- Ortín A., Ferrer L.M., Loste A., García de Jalón J.A., Gómez P. *et al.* (2006), *Veterinary Record*; 159: 718-719.
- Parsons P.G., Takahashi H., Candy J., Meyers B., Vickers J. *et al.* (1990), *Pigment Cell and Melanoma Research*; 3: 297-305.
- Thompson K.G., Pool R.R. (2002), *Tumors of bones*. In: *Tumors of Domestic Animals*. 4th ed. Iowa State Press; 313.
- Vala H., Pópulo H., Mesquita J.R., Esteves F., Santos C., Soares P., Lopes J.M. (2012), *J. Comp. Pathol.*; 146 (2-3): 160-164.

# Neoformazioni delle cavità nasali negli ovini: sintomi clinici e reperti anatomico-istopatologici



P.R.D. ROCHA<sup>1</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>2</sup>, E. BIASIBETTI<sup>1</sup>, S. MILONE<sup>3</sup>, M. FIASCONARO<sup>2</sup>, V. ARONICA<sup>2</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>2</sup>, M.T. CAPUCCHIO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

<sup>3</sup> Medico Veterinario Specialista Ambulatoriale, ASP 5 - Messina

**Parole chiave:** ovini, cavità nasali, polipo.

**INTRODUZIONE** - Le neoformazioni delle cavità nasali degli ovini dei caprini sono sporadicamente riportate in letteratura benché la cavità nasale sia uno dei distretti più comuni (Rings e Roiko, 1985; Lacasta et al., 2012).

Gli autori riportano la presenza di formazioni neoplastiche a livello delle cavità nasali in quattro ovini adulti.

**MATERIALI E METODI** - Le neoformazioni sono state prelevate dopo eutanasia/macellazione dell'animale. Dopo l'esame macroscopico le neoformazioni sono state poste in formalina tamponata al 10% e processate routinariamente per l'esame istologico.

**RISULTATI** - Gli animali del presente studio erano rappresentati da un ariete adulto di razza Biellese proveniente da un allevamento piemontese e tre pecore adulte di cui due di razza Valle del Belice e una di razza Pinziritta allevate in aziende siciliane.

L'animale di razza Biellese, che da alcuni mesi aveva mostrato dispnea cronica in fase inspiratoria ingrossante era stato soppresso su richiesta dei proprietari a seguito di fistolizzazione di una lesione suppurativa endonasale.

Le due pecore di razza Valle del Belice con più di 6 anni di età provenivano da un allevamento di circa 150 animali allevati allo stato semibrado nella provincia di Messina. Il primo animale aveva dispnea inspiratoria cronica ingrossante che deprimeva per una grave ostruzione delle alte vie respiratorie, e dimagrimento cronico. In seguito alla macellazione venivano rilevati in sede endonasale polipi multipli di grandi dimensioni che invadevano gran parte delle cavità nasali, si osservava inoltre erosione di numerosi cornetti nasali. Il secondo animale invece presentava dispnea cronica ingrossante espiratoria, che deprimeva per un danno a carico delle basse vie respiratorie, e dimagrimento cronico. All'esame anatomopatologico quest'ultimo animale presentava lesioni polmonari indotte da Visna/Maedi ed i polipi nasali, dell'ordine di pochi mm di lunghezza, avevano dimensioni molto più ridotte rispetto a quelle riscontrate negli altri animali. La terza pecora, di razza Pinziritta, aveva un'età compresa tra 8 e 9 anni e apparteneva ad un allevamento di tipo semibrado della provincia di Enna, costituito da circa 800 animali. Negli ultimi 4-5 mesi mostrava sintomatologia clinica sovrapponibile alla prima pecora di razza Valle del Belice ed, una volta sacrificata, presentava lesioni anch'esse sovrapponibili.

Istologicamente le neoformazioni erano ricoperte da epitelio semplice colonnare con numerose cellule calciformi mucipare. Il tessuto era composto soprattutto da cellule fusiformi lasse immerse in un'abbondante matrice amorfa mesenchimale. Si riscontrava inoltre la presenza di infiltrato linfocitario e plasmacellulare sub epiteliale multifocale e di vasi neofornati.

La neoformazione riscontrata nell'ovino di razza Biellese mostrava diffuse aree necrotiche infiltrate da granulociti neutrofilici.

In tutti i casi le caratteristiche delle lesioni erano compatibili con polipi nasali mixoidi.

**DISCUSSIONE** - I polipi sono classificati nel gruppo delle riniti idiopatiche e sono raramente riportati in cavalli e gatti, meno ancora in altre specie animali (Caswell and Williams, 2007). Nei cavalli i polipi tendono a formarsi nella regione etmoidale, mentre nei gatti sono più fre-

quentemente riscontrati nella rinofaringe e nelle trombe di Eustachio (Lopez, 2012). Occasionalmente, possono diventare pedunculati. L'ispessimento della mucosa nasale e l'ostruzione delle vie nasali sono tra le conseguenze più comuni dei polipi intranasali. Lo stroma fibrotico è gravemente infiltrato da linfociti e plasmacellule e l'epitelio superficiale può essere iperplastico, eroso, o andare incontro a metaplasia squamosa. La causa di questa malattia rimane sconosciuta e la patogenesi rimane da chiarire, anche se in molti casi pare che i polipi facciano seguito a rinite cronica o sinusite (Caswell e Williams, 2007; Lopez, 2012). Nei gatti è stato proposto che i polipi possano avere una causa congenita (Wilson e Dungworth, 2002). Un insulto primario sconosciuto iniziale sarebbe quindi causa primaria di una alterazione del sistema immunitario locale, con conseguente danno alla mucosa e sviluppo di infezioni secondarie da parte di patogeni normalmente considerati parte della flora commensale con sviluppo di reazione infiammatoria locale. Tuttavia, l'infiammazione linfo-plasmacellulare potrebbe anche essere una reazione comune della mucosa nasale ad un insulto primario come un corpo estraneo, un'infezione batterica o fungina, o un'altra neoplasia (Caswell e Williams, 2007). *Cryptosporidium sp.* è stato infatti associato alla presenza di polipi oro-faringei nelle iguane (Uul et al, 2001). Recentemente Lacasta et al. (2012) hanno descritto una rinite cronica proliferativa con multiple proliferazioni polipoidi associata a infezione da *Salmonella enterica*.

Non è da escludere che l'agente eziologico della flogosi purulenta riscontrata nella neoformazione dell'ovino di razza Biellese possa essere stato la causa della reazione del mesenchima nasale. Mentre negli altri animali l'insulto primario potrebbe essere rappresentato verosimilmente da infestazioni croniche e massive da *Oestrus ovis*, parassita endemicamente presente nella Regione Sicilia.

**CONCLUSIONI** - Gli autori ritengono necessario svolgere ulteriori indagini per approfondire l'eziopatogenesi dei polipi nasali negli ovini.

## ■ Nasal cavity neofornations in sheep: clinical symptoms and pathological results

**Key words:** sheep, nasal cavity, polyp.

## Bibliografia

- Caswell J.L. and Williams K.J. (2007), Respiratory System. In: Jubb and Kennedy Pathology of Domestic Animals. 5th ed. Vol 2: 533-534.
- Lacasta D., Ferrer L.M., Ramos J.J., Bueso J.P., Borobia M., Ruiz de Arcaute M., Figueras L., González-Sainz J.M., De Las Heras M.J. (2012), J. Comp. Pathol.; in press, 61 (7):1-5.
- Lopez A. (2012), Respiratory System, Mediastinum and Pleurae. In: Pathologic Basis of Veterinary Disease, Zachary J.F., Macgavin M.D., Elsevier Mosby, St. Louis, Missouri.
- Rings D.M., Rojko J. (1985), Cornell Vet.; 75 (2): 269-76.
- Uul E.W., Jacobson E., Bartick T.E., Micinilio J., Schimdt R. (2001), Veterinary Pathology; 38 (2): 239-242.
- Wilson D.W., Dungworth D.L. (2002), Tumors of the Respiratory tract in Tumors of Domestic Animals. 4th ed.

# Reperti anatomo-istopatologici associati a vestigia dell'uraco



M.T. CAPUCCHIO<sup>1</sup>, E. BIASIBETTI<sup>1</sup>, P.R.D. ROCHA<sup>1</sup>, L. STRADA<sup>2</sup>, S.A. MIGNACCA<sup>3</sup>, V. DI MARCO LO PRESTI<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Azienda Sanitaria Provinciale n° 8, Trapani

<sup>3</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** uraco, istopatologia, pecora.

**INTRODUZIONE** - Le anomalie congenite dell'uraco sono riportate in diverse specie animali (Greene and Bohning 1971, Hansen 1972, Borrás 1983, Baxter and others 1987, 1992, Dean and Robertson 1988, Adamu and others 1991) ma sembrano essere piuttosto inusuali nei piccoli ruminanti (Yeruham, 2002).

Gli autori riportano vestigia uracali in ovini adulti regolarmente macellati o deceduti per cause non correlabili.

**MATERIALI E METODI** - Dopo il decesso o la macellazione degli animali sono state prelevate le vesciche e sottoposte ad esame anatomo-istopatologico. In seguito alla valutazione macroscopica sono state poste in formalina tamponata al 10% e processate routinariamente per l'esame istologico.

**RISULTATI** - Macroscopicamente si osservavano formazioni nodulari di colore chiaro, di dimensioni variabili e consistenza sodo-elastica a livello dell'apice della vescica. Istologicamente nello spessore della parete muscolare della vescica si osservavano numerose formazioni ovalari delimitate da epitelio di transizione irregolare circondate da abbondante tessuto connettivale con vasi neoformati. Il lume di alcune formazioni era pieno di materiale amorfo eosinofilo. Tessuto fibroso e muscolare era presente perifericamente. Minimo infiltrato non purulento era visibile nel tessuto fibroso.

**DISCUSSIONE** - L'uraco è una struttura embrionale che durante lo sviluppo fetale collega la vescica urinaria al sacco allantoideo. Questa struttura permette il trasporto dei metaboliti di scarto dalla vescica alla placenta per la successiva rimozione. Dopo la nascita, l'uraco dovrebbe perdere la sua funzionalità e dare luogo ad una cicatrice persistente all'apice vescicale (Lavery e Salisbury, 2002). Anomalie dell'uraco sono rare e la maggior parte si diagnosticano nei primi anni di vita (Al-Hindawi e Aman, 1992). Possono essere classificate in cinque tipi principali: diverticolo vescico-uracale, seno uracale, legamento uracale, cisti uracale e uraco evidente (Hansen 1972).

L'insieme delle anomalie è spesso riportato come vestigia uracali e sono talvolta associate a infezioni ricorrenti o persistenti del tratto urinario e ad urolitiasi. In particolare un uraco evidente fornisce un'ottima via di ingresso di batteri tale da provocare nell'uomo la formazione di ascessi o peritoniti per rottura intraperitoneale (Blichert-Toft & Nielsen, 1971). Molto più rare sono le trasformazioni neoplastiche delle cisti uracali (Korobkin et al., 1988).

La diagnosi differenziale delle vestigia uracali deve tenere in considerazione ascessi, cisti vitelline, ematomi, cisti da echinococco, cisti mesenteriche e neoplasie (Al-Hindawi e Aman, 1992).

I reperti osservati sono compatibili con diverticoli uracali all'interno della parete vescicale.

Istologicamente si osservano i tre strati caratteristici della sua parete. Sono presenti infatti lo strato interno formato da epitelio transizionale cuboide con attività secretoria, talora metaplasico e circondato da flogosi cronica; lo strato intermedio fibroso e lo strato esterno muscolare in continuità con il muscolo detrusore della vescica. La presenza di numerose strutture duttali come osservato nei casi del presente lavoro è da riferire presumibilmente a sezioni condotte nell'estremità superiore dell'uraco che si ramifica in numerosi canali (Campbell Begg, 1930).

**CONCLUSIONI** - Solo l'esame istologico ha permesso di confermare il sospetto diagnostico. Gli autori ritengono che le vestigia uracali nei piccoli ruminanti siano molto più frequenti di quanto riportato in bibliografia. La loro individuazione è fondamentale in quanto, seppur sporadicamente nei soggetti adulti, possono dare luogo a complicazioni quali cistiti ricorrenti o addirittura peritoniti. La terapia in caso di anomalie di grosse dimensioni reperite in animali d'affezione è solo chirurgica.

## ■ Vestigial of urachus in sheep: pathological study

**Key words:** sheep, urachus, histopathology.

## Bibliografia

- Adamu S.S., Mohammed A., Egwu G.O., Ahmadu B. (1991), *Veterinary Record*; 129, 338.
- Al-Hindawi M.K., Aman S. (1992), *The British Journal of Radiology*, 65: 313-316.
- Baxter G.M., Darien B.J., Wallace C.E. (1987) *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 191: 555-558.
- Baxter G.M., Zamos D.T., Mueller, P.O.E. (1992), *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 200: 517-520.
- Blichert-Toft M. Nielsen O.V. (1971), *Acta Chirurgica Scandinavica*; 137: 807-814.
- Borrás M. (1983), *Laboratory Animals*; 17: 55-58.
- Campbell Begg R. (1930), *J. Anat.*; 64 (2): 170-183.
- Dean P.W., Robertson J.T. (1988), *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 192: 375-376.
- Greene R.W., Bohning R.H. (1971), *Journal of the American Veterinary Medical Association*; 158: 489-491.
- Hansen J.S. (1972), *Veterinary Medicine: Small Animal Clinician*; 67: 379-381.
- Korobkin M., Cambier L., Drake J. (1988), *Journal of Computer Assisted Tomography*; 12: 981-987.
- Lavery P.H., Salisbury S.K. (2002), *Journal of Small Animal Practice*; 43: 227-229.
- Yeruham I. (2002), *Vet. Rec.* 16; 150 (11): 353.

# Carcinoma a cellule squamose in pecore allevate nella Regione Sicilia



R. PULEIO, M.T. CAPUCCHIO<sup>1</sup>, S. MIGNACCA, L. SPURIA, T. SOFIA<sup>2</sup>,  
M. FIASCONARO, G.R. LORIA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" - Palermo

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie - Università degli Studi di Torino

<sup>2</sup> Medico Veterinario Specialista Ambulatoriale, ASP Catania

**Parole chiave:** ovini, carcinoma squamocellulare, Sicilia.

**INTRODUZIONE** - I carcinomi squamo-cellulari in sede oculare sono neoplasie, solitamente ad evoluzione lenta, che possono generarsi a livello della cornea, della congiuntiva e delle palpebre. L'esposizione intensa ai raggi solari ultravioletti è sicuramente un fattore di rischio, insieme all'eventuale presenza di papillomi o ancora lesioni infiammatorie croniche. Gli autori descrivono quattro casi di carcinoma squamocellulare in pecore allevate in Sicilia.

**MATERIALI E METODI** - Lo studio riguarda tre animali a mantello chiaro (Valle del Belice), dai 4 agli 8 anni di età, allevati nelle province di Enna, Palermo e Catania ed un quarto soggetto, una pecora Pinzirita di 7 anni di età, allevata nella Provincia di Messina. Una pecora presentava delle lesioni carcinomatose limitate alle palpebre ed alla nictitante. Un secondo animale mostrava lesioni neoplastiche prevalentemente a carico delle strutture perioculari con parziale prolasso del globo oculare. Le altre due pecore erano colpite da neoformazioni di notevoli dimensioni che coinvolgevano, in entrambi i casi, la regione orbitale destra. In uno dei due casi la cute si presentava ampiamente ulcerata, mentre nell'altro caso il mancato drenaggio aveva determinato una grave tumefazione della parte. Tutti gli animali sono stati sacrificati. In uno dei quattro soggetti è stata eseguita una sezione trasversale del cranio (Fig. 1), in cui risultava evidente una proliferazione neoplastica con ampie aree necrotiche colliquate e la pressoché completa erosione dei turbinati con deformazione delle strutture adiacenti. Durante l'esame necroscopico si prelevavano porzioni di tessuto, da tutte le sospette neoformazioni, per l'esame istologico che, una volta fissate ed incluse, venivano colorate secondo procedure standard con Ematossilina-Eosina.

**RISULTATI** - In tutti e quattro i casi clinici osservati nelle diverse province, le sezioni istologiche esaminate hanno evidenziato, a vario grado, una caratteristica proliferazione neoplastica costituita da gruppi di cellule epiteliali disposti in ammassi irregolari organizzati in cordoni, isole e trabecole. Le cellule tumorali presentavano forma poligonale con nucleo centrale e abbondante citoplasma debolmente acidofilo, con caratteri simili alle cellule dello strato spinoso dell'epidermide ma evidenti atipie. Gli ammassi di cellule tumorali mostravano, inoltre, una tendenza all'invasione dei tessuti circostanti, in assenza di una membrana basale di contenimento del tumore e dello strato di cellule basali periferiche. Frequentemente in seno ai cordoni di cellule epiteliali è stato possibile osservare le cosiddette perle cornee, costituite da cellule cheratinizzate, disposte concentricamente e circondate da tessuto neoplastico. Le caratteristiche istologiche della lesione hanno consentito di classificare tutte le neoplasie come carcinoma squamocellulare lesione frequentemente riportata.

**DISCUSSIONE** - I fattori predisponenti riportati in letteratura per il carcinoma squamocellulare nella pecora sono essenzialmente: la razza (Merinos e Ile de France), l'esposizione solare e la co-infezione con papillomavirus. Nel nostro caso possono essere considerati sia la razza (Valle del Belice e Pinzirita), che l'irradiazione solare che alle nostre latitudini e in particolari periodi dell'anno può assumere una notevole importanza. Ulteriori indagini saranno necessarie a confermare queste ipotesi e l'eventuale ruolo dei papilloma-virus.

■ Squamous cell carcinomas in Sicilian sheep

**Key words:** ovine, squamous cell carcinoma, Sicily.



Figura 1 - Sezione trasversale del cranio di un soggetto.

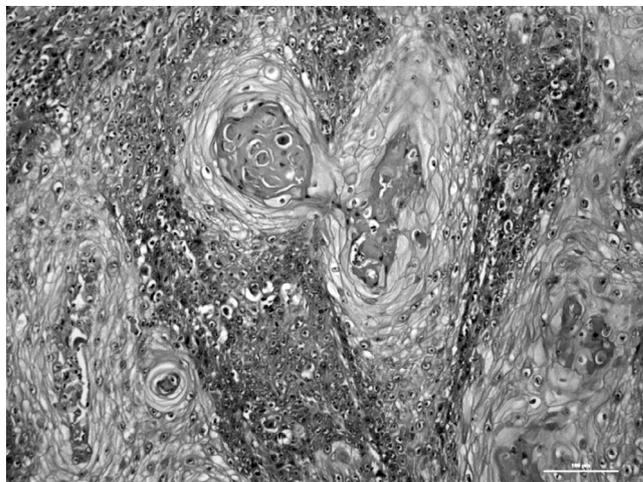


Figura 2 - EE 10x.

## Bibliografia

- Ahmed, A.F., Hassanein, K.M.A. (2012), Ovine and caprine cutaneous and ocular neoplasms. *Small Ruminant Res.*; 106: 189-200.
- Marà M, Di Guardo G, Venuti A, Marruchella G, Palmieri C, De Rugeris M, Petrizzi L, Simeone P, Rizzo C, Della Salda L. (2005), Spontaneous ocular squamous cell carcinoma in twin goats: pathological and biomolecular studies. *J. Comp. Pathol.*; 132: 96-100.
- Méndez A, Pérez J, Ruiz-Villamor E, García R, Martín MP, Mozos E. (1997), Clinicopathological study of an outbreak of squamous cell carcinoma in sheep. *Vet. Rec.*; 141:597-600.
- Pérez J, Méndez A, de Lara FC, Martín MP, Mozos E. (1997), Ovine squamous cell carcinoma: immunohistochemical characterisation of neoplastic cells and peritumoural cellular infiltrate. *Res. Vet Sci.*; 63: 43-7.

# Epatite necrotica da *B. trehalosi* nei capretti: descrizione di un focolaio in Sicilia



F. CAMPO, S. AGNELLO, A. STANCANELLI, C. PIRAINO, S. MIGLIACCA, V. DI MARCO LO PRESTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** *Bibersteinia trehalosi*, capretti, Sicilia.

**INTRODUZIONE** - La *Bibersteinia trehalosi* (prima *Pasteurella trehalosi*) è un importante e ben documentato agente patogeno degli ovini e dei caprini che causa principalmente broncopneumonia e infezioni sistemiche. L'infezione causata da *B. trehalosi* negli agnelli e nei capretti si manifesta con la comparsa improvvisa di inappetenza, febbre, tossiemia, marcata tachipnea e talora porta fino alla morte. Questo microrganismo è comunemente presente nelle vie respiratorie superiori e nelle tonsille di pecore sane. La diffusione sistemica del microrganismo e la sua azione patogena segue ad un periodo di stress che può essere dovuto anche ad un cambio di management. Una via alternativa di ingresso è la mucosa gastro-intestinale con conseguente diffusione attraverso il circolo portale. La contemporanea presenza di altri agenti infettivi sia batterici che virali può complicare sia il quadro clinico che anatomopatologico, oltre che facilitare l'azione patogena della *B. trehalosi*. La rapidità del decesso è dovuta ad una endotossinemia, in particolare alla leucotossina.

**MATERIALI E METODI** - In questo studio gli autori descrivono un focolaio di *B. trehalosi* verificatosi, tra il tardo inverno e inizio primavera del 2011, in un allevamento caprino di razza Camosciata delle Alpi. L'azienda è ubicata nella provincia di Caltanissetta ed ha una consistenza di circa 400 capi. Si tratta di un allevamento di tipo intensivo con stabulazione permanente nel periodo invernale e brevi ore di pascolo in primavera ed estate. I capretti, dopo l'assunzione del colostro materno vengono allattati con latte artificiale. L'intervento è stato richiesto dopo il rapido verificarsi di gravi forme di malattia con elevata mortalità neonatale (circa dieci capretti morti nel volgere di pochi giorni senza risposta a qualsiasi trattamento). Al momento del nostro intervento alcuni capretti mostravano gravi difficoltà respiratorie, dimagrimento, ipertermia ed evidente atteggiamento di sofferenza. Tutti i soggetti con sintomi al momento della valutazione sono stati sottoposti a campionamento di tamponi nasali per i successivi esami batteriologici. I soggetti adulti non presentavano apparenti segni di malattia. Un capretto ormai deceduto, dall'età stimata di 45-50 giorni, portato presso il laboratorio è stato sottoposto ad esame necroscopico. Lo stato di nutrizione era scadente con dimagrimento e disidratazione, quest'ultima evidente soprattutto nel tessuto sottocutaneo. All'interno della cavità addominale si notavano aree di essudato fibrinoso. Caratteristiche le lesioni epatiche (Fig. 1). L'organo si presentava lievemente aumentato di

volume, con margini quasi nella norma. Ciò che colpiva maggiormente l'attenzione era la presenza di lesioni focali. Al taglio i dotti biliari si presentavano lievemente ispessiti. La bile all'interno della cistifellea aveva un aspetto schiumoso. La milza era aumentata di volume. Le lesioni più imponenti si sono riscontrate in cavità toracica, dove abbondante fibrina era presente nel pericardio. I polmoni di consistenza aumentata presentavano una superficie tesa e traslucida per presenza di edema, con abbondante presenza di fibrina soprattutto sulla parte dorsale. Evidenti i focolai di polmonite fibrinosa predominanti sui lobi apicali e cardiaci. Campioni dei vari visceri e tamponi nasali sono stati sottoposti ad analisi batteriologiche, utilizzando i comuni terreni colturali (Agar Sangue, MSA, TKT, CMM, Broth e Agar Mycoplasma). Il quadro anamnesticco e soprattutto anatomopatologico, hanno suggerito di indirizzare la ricerca principalmente nei confronti della *Pasteurella* non escludendo la probabile presenza dei Mycoplasmi e dei Clostridi.

**RISULTATI E CONSIDERAZIONI** - Gli esami batteriologici eseguiti sui tamponi, sul sangue cardiaco, polmoni, milza e fegato, hanno escluso la presenza sia dei Mycoplasmi che dei Clostridi. In piastre di Agar Sangue incubate per 24 ore a 37° C sia in atmosfera normale che in presenza di CO<sub>2</sub> (5%) sono cresciute delle colonie lisce, grigie, non emolitiche. L'esame microscopico ha evidenziato dei piccoli coccobacilli Gram -. Il ceppo isolato è stato saggiato mediante gallerie commerciali API NE (bioMérieux) che lo hanno identificato come *Pasteurella* spp. I test dell'ossidasi e della catalasi sono risultati rispettivamente positivo e negativo. Ulteriori test biochimici eseguiti presso il Laboratorio di Bacteriologia di II istanza dell'IZS di Palermo hanno tipizzato il ceppo come *B. trehalosi*. Lo studio istopatologico delle lesioni sarà l'oggetto dei futuri approfondimenti.

**CONCLUSIONI** - L'isolamento di *B. trehalosi* è stato più volte segnalato in Sicilia. Si tratta di una semplice segnalazione priva di un supporto epidemiologico e che di sicuro necessita di maggiori approfondimenti. Scopo dello studio è quello di suscitare una maggiore attenzione verso questa patologia che sicuramente merita maggiore considerazione, cercando di arrivare ad una diagnosi eziologica precisa per conoscere la diffusione e facilitarne il controllo.

## ■ Necrotic hepatitis by *B. trehalosi* in kids: A report of an outbreak in Sicily

**Key words:** *Bibersteinia trehalosi*, kids, Sicily.



Figura 1

## Bibliografia

- Blackall P. J., Bojesen A. M., Christensen H., Bisgaard M. (2007) Reclassification of (*Pasteurella*) *trehalosi* as *Bibersteinia trehalosi* gen. nov., comb. Nov. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 57: 666-674.
- Watson P. J., Scholes S. F. E. (2010) *Bibersteinia trehalosi* necrotising epatitis associated with sudden death in an adult cow. Veterinary Record; 167 (3): 100-102.
- Di Marco V., Vazzana I., La Cavera E., Priolo I. (2000) Indagine sulla presenza di *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella Trehalosi* e distribuzione dei relativi sierotipi in allevamenti ovi-caprini. Atti S.I.P.A.O.C.; I: 123-126.
- Di Marco V., Priolo I., Vazzana I., La Cavera E., Caracappa S. (2000) *Pasteurella* ovis: Primo isolamento di *Pasteurella trehalosi*. La Selezione Veterinaria; 12: 1185-1189.
- Di Marco V., Piraino C., La Cavera E., Capucchio M. T., Priolo. (1999) Infezioni da *Pasteurella* negli ovini: Esperienze cliniche e diagnostiche. Atti Congresso SIVAR: 33.

# S. aureus in Puglia da formaggi a latte crudo ovino e profilo di antibiotico resistenza



M.G. BASANISI, E. CRISSETTI, R. PEDALE, M.C. NARDELLA, G. LA SALANDRA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia (Italy)

**Parole chiave:** *Staphylococcus aureus*, enterotossine, antibiotico resistenza, biotipo.

**INTRODUZIONE** - *Staphylococcus aureus* è un microrganismo ubiquitario e circa il 50% dei ceppi è capace di causare una sintomatologia gastroenterica nell'uomo in quanto produttore di enterotossine. Un numero relativamente alto di ceppi è inoltre resistente ai più comuni antibiotici utilizzati in molte infezioni umane ed animali<sup>8</sup>.

In termini di sicurezza microbiologica degli alimenti non è più sufficiente considerare *S. aureus* semplicemente un produttore di enterotossine e quindi un agente di intossicazione alimentare, ma è opportuno valutare anche il rischio legato alla capacità del microrganismo di acquisire antibiotico-resistenza provocando infezioni nel consumatore talvolta difficili da trattare o incurabili<sup>10</sup>.

**MATERIALI E METODI** - Con questo lavoro sono stati caratterizzati 78 ceppi di *S. aureus* isolati da altrettanti campioni di formaggio a latte crudo ovino prodotto e commercializzato in Puglia, negli anni 2010 e 2011.

I ceppi di *S. aureus* sono stati prima identificati con l'utilizzo del terreno CHROMagar™ (CHROMagar Microbiology, Parigi, Francia). Il DNA dei singoli isolati è stato poi estratto con DNeasy Blood & Tissue Kit, Qiagen.

Ciascun ceppo è stato sottoposto a multiplex PCR per la rivelazione di 12 geni specifici per le enterotossine stafilococciche quali *sea*, *seb*, *sec*, *seh*, *sed*, *see*, *seg*, *sei*, *sem*, *sen* e *seo* seguendo i protocolli modificati di diversi autori<sup>1,3,4,5,9</sup>.

La biotipizzazione è stata eseguita sui ceppi di *S. aureus* con il metodo descritto da Devriese<sup>2</sup>. L'antibiotico-resistenza è stata valutata con il metodo della diffusione in agar (Kirby-Bauer) secondo le linee guida del National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>7</sup>. Ogni ceppo è stato testato nei confronti di 15 antibiotici (penicillina, ampicillina, eritromicina, sulfametoxazolo-trimethoprim, streptomina, tetraciclina, bacitracina, novobiocina, kanamicina, teicoplanina, vancomicina, cefalotina, gentamicina, enrofloxacin e oxacillina) a concentrazioni prestabilite e classificato sensibile, intermedio o resistente al dato antibiotico. Sui ceppi di *S. aureus* isolati è stata effettuata un'analisi PCR per la rivelazione del gene *mecA* secondo il protocollo di Murakami et al. (1991)<sup>6</sup>.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - La prova di M-PCR per rilevare i geni codificanti le 12 enterotossine stafilococciche ha dato i seguenti risultati: su 78 isolati, 63 possiedono uno o più geni codificanti le enterotossine (80,8%); *sec* risulta essere il gene più frequente (54%) seguito da *sea* (28,6%), cluster *ecg* (*seg*, *sei*, *sem*, *sen*, *seo*) con il 19%, *seb* (17,5%), *sed* (14,3%), *sej* (7,9%), *seh* (6,3%). Nessun ceppo possiede il gene *see* e il gene *mecA*.

I risultati della biotipizzazione sui 78 ceppi sono i seguenti: 29 (37,2%) risultano appartenere al biotipo ovino, 15 (19,2%) al biotipo NHS (non ospite specifico), 12 (15,4%) al biotipo umano, 4 (5,1%) a quello bovino e 2 (2,6%) al biotipo poultry-like. Alcuni ceppi (16-20,5%) di *S. aureus* non sono stati identificati nei biotipi studiati.

Nelle prove di antimicrobico-resistenza su un totale di 78 ceppi, 47 (60,3%) sono risultati resistenti; 16 ceppi (34%) sono risultati resistenti ad un antibiotico, 15 ceppi (32%) a due, 13 (27,6%) a tre, 3 (6,4%) ad almeno quattro. La percentuale totale di ceppi multiresistenti (resistenza a tre o più antibiotici) è risultata essere del 34% (16/47).

In particolare, 27 ceppi (57,4%) sono risultati resistenti a penicillina/ampicillina, 10 (21,3%) a eritromicina, 8 (17%) a sulfametoxazolo-trimethoprim, 6 (12,8%) a streptomina e tetraciclina, 4 (8,5%) a bacitracina, 3 (6,4%) a novobiocina, 2 (4,3%) a kanamicina e teicoplanina. Nessun ceppo è risultato essere resistente a vancomicina, cefalotina, gentamicina, enrofloxacin e oxacillina.

**CONCLUSIONI** - Il rilievo di ceppi di *S. aureus* nelle matrici alimentari esaminate e l'attitudine a produrre enterotossine nell'80,8% degli stipiti microbici considerati, sottolinea la presenza di un elevato rischio di tossinfezione alimentare per il consumatore, in particolare quando non si adoperano le misure necessarie atte ad evitare la replicazione del microrganismo e la produzione di SEs. In tal modo, gli alimenti di origine animale possono essere fonte di contaminazione di *S. aureus* e la presenza di ceppi multiresistenti potrebbe provocare infezioni nell'uomo, che richiederebbero terapie diverse da quelle comunemente utilizzate come conseguenza all'antibiotico-resistenza. La biotipizzazione, volta a stabilire la specie di provenienza del ceppo microbico, importante ai fini di azioni preventive in autocontrollo in allevamento e in stabilimento, ha evidenziato la prevalenza del biotipo ovino confermando che la contaminazione può dipendere da mastiti subcliniche degli animali, sottolineando così, ancora una volta, la necessità di controlli efficaci negli allevamenti per una corretta gestione del rischio alimentare.

Lavoro svolto con i fondi del Ministero della Salute RC 2008 e RC 2009.

## ■ S. aureus in Puglia from raw milk sheep cheese and profile of antibiotic resistance

**Key words:** *Staphylococcus aureus*, enterotoxins, antibiotic resistance, biotype.

## Bibliografia

- Boerema JA, Clemens R, Brightwel G. (2006), International Journal of Food Microbiology; 107 (2): 192-201.
- Devriese LA. (1984), Journal of Applied bacteriology; 56 (2): 215-20.
- Jarraud S, Mougel C, Thioulouse J, Lina G, Meugnier H, Forey F, Nesme X, Etienne J, Vandenesch F. (2002), Infection and Immunity; 70 (2): 631-641.
- Løvseth A, Loncarevich S, Berdal KG. (2004), Journal of Clinical Microbiology; 42 (8): 3869-72.
- Monday SR, Bohach GA. (1999), Journal of Clinical Microbiology; 37 (10): 3411-14.
- Murakami K, Minamide W, Wada K, Nakamura E, Teraoka H, Watanabe S. (1991), Journal of Clinical Microbiology; 29 (10): 2240-4.
- National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS). (2006), CLSI Document M31-A2. Wayne, Pennsylvania.
- Normanno G, La Salandra G, Dambrosio A, Quaglia NC, Corrente M, Parisi A, Santagada G, Firinu A, Crisetti E, Celano GV. (2007), International Journal of Food Microbiology; 115 (3): 290-6.
- Rosec JP, Gigaud O. (2002), International Journal of Food Microbiology; 77 (1-2): 61-70.
- Crisetti E, Cataleta A, D'Alessandro M, Normanno G, Chiocco D, La Salandra G. (2011), Atti XXI Congresso Nazionale AIVI.

# Nematodi gastrointestinali nei piccoli ruminanti in Sicilia: problematica ancora attuale



V. CURRÒ<sup>1</sup>, F. SALINA<sup>1</sup>, M.F. PERSICHETTI<sup>2</sup>, R. DISCLAFANI<sup>1</sup>, V. PALAZZOLO<sup>1</sup>, D. NIFOSI<sup>3</sup>, G. LO BIUNDO<sup>1</sup>, F. LICITRA<sup>1</sup>, P. CICERO<sup>1</sup>, P. GALLUZZO<sup>1</sup>, S. CARACAPPA<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri"

<sup>2</sup> Dipartimento di Scienze Veterinarie Università degli Studi di Messina

<sup>3</sup> Assessorato della Salute Dipartimento Regionale per le Attività Sanitarie

**Parole chiave:** nematodi gastrointestinali, ovini, caprini.

**INTRODUZIONE** - La Sicilia rappresenta la seconda regione italiana per consistenza numerica di ovini e caprini distribuiti uniformemente su tutto il territorio, vantando circa 1.000.000 di capi (dati ISTAT 2011). La realtà siciliana si caratterizza per un 70% di allevamenti ovini e per il 30% di allevamenti promiscui in cui le capre non raggiungono mai più del 10% dell'effettivo. Le razze ovine allevate sono per lo più autoctone come Pinzirita, Comisana e Valle del Belice, e tra le capre soprattutto la Rossa Mediterranea, la Maltese e l'Argentata dell'Etna<sup>1</sup>. Tali razze sono dotate di forte rusticità ben adattate alle condizioni pedoclimatiche dell'Isola, ad indirizzo verso la produzione di latte e derivati sulla scorta del riconoscimento di n. 2 DOP del Pecorino e del Piacentino ennese e della "Vastedda della Valle del Belice". Tra le problematiche sanitarie di rilievo per tali realtà allevatoriali la infestazione da nematodi gastrointestinali (*Teladorsagia*, *Haemonchus*, *Bunostomum*, *Cooperia*, *Nematodius*, *Trichostrongylus*, *Chabertia* ed *Oesophagostomum*) risulta essere tra le principali cause di danno economico negli allevamenti al pascolo<sup>2,3,4</sup>. Infatti, il poliparassitismo ad opera di diverse specie di nematodi nello stesso soggetto provoca anche un'azione infiammatoria e traumatica, talvolta con sintomi gravissimi soprattutto negli animali giovani. Gli animali colpiti subiscono un'importante sottrazione di principi nutritivi tale da riflettersi negativamente sull'accrescimento e sulla fecondità oltre che sulla capacità produttiva<sup>2</sup>. Nella capra da latte, la problematica è anche più grave se si considera che questo animale, non sviluppando la stessa efficace immunità verso i parassiti come la pecora, è soggetto a ripetute infestazioni che ne compromettono non solo lo stato fisiologico ma anche in modo rilevante la produzione<sup>5</sup>.

**MATERIALI E METODI** - La nostra indagine si è svolta durante il primo semestre 2012 ed ha coinvolto 48 allevamenti scelti in 16 diverse località della provincia di PA, TP, CL, RG ed AG. Per ogni capo arruolato è stata compilata una scheda clinica standard con indicazioni in merito al segnalamento, alla localizzazione GPS, all'altitudine, al numero di animali presenti nell'allevamento, all'indirizzo produttivo e al tipo di mungitura (meccanica o tradizionale). Per ogni sito sono stati eseguiti prelievi di feci di massa (n. 1 per allevamento) ed individuali (n. 2 per allevamento), ripetuti a cadenza mensile. I campioni sono stati sottoposti a esami copromicroscopici qualitativi utilizzando le tecniche di flottazione con l'utilizzo di soluzioni di nitrato di sodio e saccarosio densità pari a 1300-1350 g/l<sup>7</sup>. Per il riconoscimento di quei nematodi le cui uova non consentono l'identificazione per genere e specie di appartenenza, il materiale fecale è stato messo in coltura per ottenere la schiusa delle uova e lo sviluppo delle larve L3. In seguito, le larve sono state separate in maschi e femmine ed identificate dopo chiarificazione in lattofenolo<sup>6,8,9</sup>. La procedura è stata quindi completata con tecnica di Baermann<sup>7</sup> utilizzando per l'identificazione le chiavi di lettura disponibili<sup>8</sup>. Per 18 ovini e 6 caprini i prelievi sono stati eseguiti post-mortem. L'intestino è stato accuratamente lavato sotto un lento flusso di acqua di fonte ed il contenuto è stato raccolto in setacci da 500 µm. I parassiti isolati sono stati conservati in alcol al 70% per poi essere identificati<sup>6,8,9</sup>.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Dalle indagini condotte, è stata registrata una cospicua presenza di nematodi gastrointestinali nella maggior parte degli individui esaminati (soggetti vivi ed animali sottoposti ad autopsia), senza alcuna differenza significativa ( $P > 0,05$ ) per sesso, età, razza, numero di soggetti per allevamento, localizzazione geografica e tipo di mungitura. Su 176 campioni analizzati, 119 erano positivi per presenza di parassiti gastrointestinali, i restanti 57 erano negativi nonostante provenissero da allevamenti inclusi nel progetto che non erano esenti da infestazione. L'identificazione di specie ha permesso di risalire a 8 specie diverse di elminti appartenenti a 5 famiglie (Tab. 1). Quarantuno campioni sono ancora in corso di identificazione. Il controllo delle infestazioni parassitarie deve prevedere l'utilizzo di presidi farmacologici mirati a scadenze regolari. Tale aspetto è spesso trascurato dagli allevatori per

**Tabella 1** - Parassiti isolati e relative percentuali di frequenza.

Famiglia	Specie	Stadio	Ovini	% di frequenza	Caprini	% di frequenza
Trichostrongylidae	<i>H. contortus</i>	38 femmine	10	12,82	/	/
	<i>C. Curticei</i>	55 forme larvali + adulti	8	10,26	2	2,56
	<i>N. spathiger</i>	Uova	1	1,28	/	/
	<i>T. columbriformis</i>	adulti	10	12,82	/	/
Ancylostomatidae	<i>B. trigonocephalum</i>	adulti	20	25,64	5	6,41
Strongylidae	<i>C. ovina</i>	43 adulti	10	12,82	/	/
Oesophagostomatidae	<i>O. venulosum</i>	57 adulti	6	7,69	3	3,85
Trichuridae	<i>T. ovis</i>	uova	3	3,85	/	/

poca disponibilità di fondi e talvolta per scarsa prospettiva produttivo-economica. Problematica attuale è inoltre il verificarsi di fenomeni di farmaco resistenza, già noti nei piccoli ruminanti in diverse parti del mondo<sup>10</sup>, per interventi terapeutici non idonei spesso eseguiti da non professionisti. Il controllo dei nematodi gastrointestinali nei piccoli ruminanti necessita di un continuo monitoraggio da parte di personale qualificato, attività questa non disgiunta dallo studio del territorio dove insistono tali problematiche, in considerazione del fatto che la presenza e l'intensità delle malattie parassitarie in un territorio dipende anche da fattori ambientali e climatici. Sono sempre più numerose infatti le esperienze di utilizzo di Sistemi Informativi Geografici anche negli studi legati alle patologie parassitarie<sup>5</sup>. Il controllo delle condizioni igienico-sanitarie ed il trattamento costante e ponderato degli animali migliora la performance dei soggetti con indiscussi vantaggi in termini di benessere e di produttività aziendale.

**CONCLUSIONI** - Possiamo asserire che molto verosimilmente il problema delle parassitosi gastrointestinali dei piccoli ruminanti è sempre di grande attualità essendo, soprattutto nelle piccole realtà, spesso assicurato da un management non idoneo per incostanza nei trattamenti, e dal ricorso talvolta a prodotti non specifici o a basso costo spesso inefficaci (S. Caracappa, comunicazione personale). Tale problematica è anch'essa sempre più attuale, soprattutto in un momento storico in cui l'allevamento soffre della crisi economica. Rimane ancora da chiarire il ruolo dell'impiego di antiparassitari non autorizzati provenienti dai Paesi in via di sviluppo.

## ■ Gastrointestinal nematodes in small ruminants: problem still present

**Key words:** gastro-intestinal nematodes, sheep, goat.

## Bibliografia

- Campisi D., et al (2006); supplemento a L'Informatore Agrario n.27: 18-21.
- Cringoli G.,(2010); Atti XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.
- Culmone M., et al (2012); Atti XXVII Congresso Nazionale SOIPA.
- Manfredi M.T., et.al (2010); Atti XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.
- Garippa G., et al. (2008); Atti XVII Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.
- Barth D.(1991)Magen-Darminematoden des rindes:Diagnostischer Atlas.Ferdinand Enke.
- IZSSI- PAR05 rev.9/08: Ricerca qualitativa di uova ed oocisti di parassiti gastrointestinali.
- J. Euzeby (1958) Diagnostic expérimental des Helminthoses animales - Vigot Freres Editeurs, Paris.
- Margaret W. Sloss (1976) Parassiti in medicina veterinaria: metodi di identificazione ed indagine microscopica - Edi-Ermes Milano.
- Bosco A., et al(2010); Atti XIX Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C.

# Proteine immunogeniche di *Brucella abortus* e *Yersinia enterocolitica* O:9 investigate a mezzo *Western Blot*



S. VILLARI<sup>1</sup>, V. MONTEVERDE<sup>1</sup>, G. CHIARENZA<sup>1</sup>, V. GARGANO<sup>1</sup>, M.L. CORRENTE<sup>2</sup>, M.F. GRECO<sup>2</sup>, G. VESCO<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" via Gino Marinuzzi 3, 90129 Palermo

<sup>2</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria - Università degli Studi di Bari "A. Moro"

**Parole chiave:** *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9, proteine immunogeniche, *Western Blot*.

**INTRODUZIONE** - La Brucellosi è una malattia endemica nei Paesi Mediterranei, che prevale soprattutto in aree ricche di allevamenti di bovini, ovi-caprini e suini. Negli allevamenti dell'Italia meridionale, questa zoonosi è ancora un problema rilevante, sia per le ripercussioni di carattere sanitario sia per quelle di carattere economico; in Sicilia, la situazione epidemiologica della Brucellosi è a macchia di leopardo; si riscontrano, infatti, territori in cui persistono tassi elevati di incidenza della malattia ed altri in cui questa si è ormai significativamente ridotta. I test sierologici per la diagnosi di Brucellosi previsti dalla normativa nazionale (SAR ed FCD) hanno permesso una rapido decremento dei casi di infezione, tuttavia, in condizioni di bassa prevalenza, sono emersi i limiti di queste prove diagnostiche legate alla loro specificità poiché si basano sull'impiego di un antigene che ha come componente immunodominante il lipopolisaccaride della parete cellulare batterica (LPS), che presenta frazioni in comune con quello di altri batteri Gram-negativi ubiquitari, tra cui *Yersinia enterocolitica* O:9. Per ovviare a questo problema, si sta cercando di mettere a punto test quali la i-ELISA, la c-ELISA, la Fluorescenza Polarizzata (FPA) e il Western Blot, basati sull'impiego di antigeni non LPS, provvisti di maggiore specificità. Il presente lavoro intende fornire un contributo preliminare allo studio di antigeni appartenenti alle due specie batteriche in esame per l'identificazione di antigeni discriminanti tra i due patogeni che possano essere impiegati, insieme ai test sierologici previsti dalla normativa nazionale, per limitare il problema della cross-reattività.

**MATERIALI E METODI** - Per lo studio degli antigeni di superficie non-LPS i ceppi di *Brucella abortus* e *Yersinia enterocolitica* O:9 sono stati coltivati sui terreni classici per l'arricchimento in purezza (TSB). Dopo l'opportuna incubazione, i batteri sono stati raccolti per centrifugazione e sottoposti a cicli di sonicazione per la lisi delle membrane cellulari. Il lisato così ottenuto è stato sottoposto ad uno specifico protocollo messo a punto per l'estrazione e la purificazione di proteine non-LPS. Il protocollo messo a punto vede l'impiego di un detergente (il Triton X-100 o simili) e soluzioni saline a pH definito che permettono di selezionare la frazione proteica di membrana e suddividerla a sua volta in una fase acquosa ed una detergente da analizzare separatamente. Gli antigeni così ottenuti sono stati sottoposti a dosaggio colorimetrico con metodo BCA e successivamente impiegati per l'analisi *Western Blot*. Questa tecnica biochimica permette l'identificazione di proteine immunogene mediante il riconoscimento da parte di anticorpi specifici. La miscela di proteine in esame viene prima sottoposta ad analisi elettroforetica su gel di poliaccrilammide in condizioni riducenti (SDS-

page): ciò permette la separazione degli antigeni in base al peso molecolare. Il gel così prodotto viene successivamente posto a contatto con una membrana di nitrocellulosa alla quale le proteine si legano in maniera stabile. La rilevazione degli antigeni specifici avviene direttamente sulla membrana mediante l'utilizzo di sieri specifici. L'analisi *Western Blot* è stata ulteriormente condotta impiegando antigeni commerciali di entrambi i batteri come controllo positivo del test. Nello specifico, i sieri testati appartenevano ad animali di specie ovina positivi ai test SAR e FdC; come controlli positivi sono stati utilizzati: siero nazionale standard anti-Brucella, siero di lavoro anti-*Yersinia*, e, come controlli negativi, un siero di campo negativo per *Brucella* e per *Yersinia* e il PBS.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I dati rilevati dall'analisi *Western Blot* su antigeni di *Brucella abortus* e *Yersinia enterocolitica* O:9 non hanno permesso di rilevare significative differenze tra i due patogeni in esame. La spiegazione di questo risultato va ricercata principalmente nella metodica di estrazione degli antigeni batterici; ad oggi infatti non esiste un protocollo definito per l'estrazione di antigeni non-LPS dai due patogeni in esame e laddove si cerca di riarrangiare i protocolli messi a punto su altri batteri, spesso la quantità di proteine estratte sembra non essere utile per il test *Western Blot* messo a punto presso il nostro laboratorio utilizzando antigeni commerciali purificati e non LPS "free". Ciò potrebbe dipendere anche in larga misura dal grado di purificazione dell'antigene prodotto, poiché le soluzioni utilizzate per la rimozione dell'LPS potrebbero interferire con il legame dell'antigene all'anticorpo e inficiare l'andamento del test.

## ■ Immunogenic proteins of *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* O:9 investigated by Western Blot analysis

**Key words:** *Brucella abortus*, *Yersinia enterocolitica* O:9, immunogenic proteins, *Western Blot*.

## Bibliografia

- Riber U., Jungersen G. (2007), *Vet. Immunol. Immunopathol.*; 116: 13-25.  
 Durán-Ferrer M, León L, Nielsen K, Caporale V, Mendoza J, Osuna A, Perales A, Smith P, De-Frutos C, Gómez-Martín B, Lucas A, Chico R, Delgado OD, Escabias JC, Arrogante L, Díaz-Parra R, Garrido F. (2004), *Vet Microbiol.*; 100 (3-4): 219-231.  
 Ko K.Y., Kim J.W., Her M., Kang S.I., Jung S.C., Cho D.H., Kim J.Y. (2012), *Vet. Microbiol.*: 156 (3-4): 374-380.  
 Thavaselvam D, Kumar A, Tiwari S, Mishra M, Prakash A. (2012), *J. Med. Microbiol.*, 59: 421-428.

# Rapida caratterizzazione di specie di *Chlamydophila* con High-Resolution Melt Analysis Qualitativa



G. VESCO, V. GARGANO, S. VILLARI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" via Gino Marinuzzi 3, 90129 Palermo

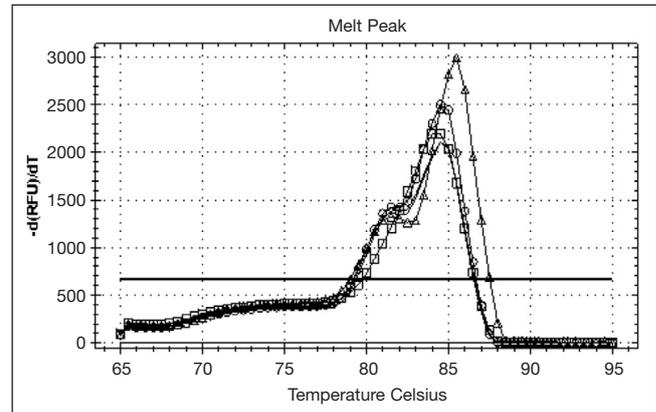
**Parole chiave:** *Chlamydophila* species, PCR, HMR.

**INTRODUZIONE** - I batteri appartenenti al genere *Chlamydophila* sono patogeni intracellulari obbligati di largo interesse veterinario. I risultati qui presentati rappresentano i dati preliminari che porteranno alla messa a punto di un metodo rapido, efficiente e poco oneroso per la diagnosi e caratterizzazione di specie differenti di *Chlamydophila*: *Cp abortus*, *Cp pecorum*, *Cp suis*. A tale scopo abbiamo sviluppato una PCR *Real-Time* basata sull'amplificazione di geni che presentano delle variazioni nella sequenza nucleotidica caratteristiche di ciascuna specie in esame. La metodologia applicata non prevede l'ausilio di sonde molecolari marcate, ma l'impiego di una nuova molecola intercalante che permette di associare a ciascuna specie analizzata una curva di melting caratteristica, permettendo quindi l'identificazione di specie.

**MATERIALI E METODI** - Il nostro lavoro è partito dall'estrazione del DNA da colture cellulari infettate sperimentalmente con le tre specie batteriche: *Chlamydophila suis*, *abortus* e *pecorum*, realizzate presso i nostri laboratori. Per l'estrazione degli acidi nucleici è stato utilizzato un kit commerciale: Qiamp Mini Kit, Qiagen. Successivamente è stata effettuata l'amplificazione di porzioni del genoma batterico che contengono variazioni nella sequenza nucleotidica caratteristiche di ciascuna specie in esame. A tale scopo è stata effettuata una PCR *Real-Time* con *EvaGreen*, una nuova molecola intercalante che a differenza di altri, come il noto Sybergreen, satura la molecola di amplificato; ciò fa sì che durante i cicli di melting (a cui viene sottoposto normalmente l'amplificato alla fine dei cicli di amplificazione per verificare la specificità della reazione) tale molecola venga rilasciata con una cinetica che dipende dal contenuto in basi della sequenza in esame. Regioni ricche in A:T denatureranno a temperature più basse e rilasceranno per prime le molecole di *EvaGreen*, rispetto a sequenze ricche in G:C che rilasceranno l'intercalante a temperature più elevate. Tale metodica quindi, che viene definita HMR (*High-Resolution Melting*), riesce ad identificare, sulla base di una curva di melting caratteristica, gli amplificati di ciascuna specie. Le curve di melting di ciascuna specie di *Chlamydophila* oggetto di questo studio sono state caratterizzate e successivamente usate come riferimento per l'identificazione di specie.

La regione del DNA di ciascuna specie batterica scelta per l'analisi HMR è una porzione del gene che codifica per la subunità ribosomiale 16S dotata di polimorfismi nucleotidici specie-specifici. La sequenza dei primers utilizzati è mostrata in Tabella 1. Per l'amplificazione del DNA la metodica standardizzata sui ceppi di riferimento è stata poi applicata per l'identificazione di specie di *Chlamydophila* da matrici complesse come invogli fetali, reperti abortivi e organi di animali con diagnosi di Chlamidiosi.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - Lo scopo del nostro lavoro è stato quello di mettere a punto una metodica basata sulla PCR *Real-Time* per



**Figura 1** - Diagnosi differenziale di specie di *Chlamydophila* tramite analisi HMR. Linea con cerchi: DNA specifico di *Cp abortus*; Linea con triangoli: DNA specifico di *Cp pecorum*, Linea con quadrati: DNA specifico di *Cp suis*. Linea semplice: campioni in doppio.

la rapida identificazione di specie di *Chlamydophila* di interesse veterinario. A tale scopo abbiamo selezionato delle porzioni del genoma batterico che presentano nella sequenza nucleotidica variazioni specie-specifiche; grazie all'impiego di primers specifici, disegnati su porzioni non variabili della sequenza nucleotidica, tali regioni sono state sottoposte ad amplificazione tramite PCR *Real-Time* e successivamente ad analisi HMR. Questa nuova metodica permette di assegnare a ciascuna sequenza di DNA una curva di melting caratteristica che può essere utilizzata come riferimento per l'identificazione di specie. Il nostro lavoro è partito quindi dallo studio delle curve di Melting di porzioni del genoma delle tre specie di *Chlamydophila* in esame: *pecorum*, *suis* e *abortus*. Dopo aver assegnato a ciascuna specie batterica la sua curva di melting, abbiamo applicato il metodo per la diagnosi differenziale delle tre specie in esame da campioni reperiti presso i nostri laboratori. I dati ottenuti qui mostrati sembrano indicare che tale tipo di analisi possa essere applicata per la diagnosi molecolare di Chlamidiosi, poiché l'analisi della curva di melting ottenuta dall'amplificazione del DNA estratto dal campione in esame è paragonabile solo a quella ottenuta amplificando DNA specifico di *Cp abortus*.

## ■ Rapid Detection of *Chlamydophila* species by qualitative High-Resolution Melt Analysis

**Key words:** *Chlamydophila* species, PCR, HMR.

**Tabella 1** - Sequenza nucleotidica dei primers utilizzati per l'amplificazione del DNA di Specie di *Chlamydophila*.

LOCUS	PRIMERS	SEQUENZA
16S r RNA	Forward Reverse	TGATGAGGCATGCAAGTC TTACCTGGTACGCTCAAAT

## Bibliografia

- Cheng J.C., Huang C.L., Lin C.C., Chen C.C., Chang Y.C., Chang S.S., Tseng C.P. (2006), Clin. Chem.; 52 (11): 1997-2004.  
 Fukushi H., Hirai K., (1993), Int. J. Syst. Bacteriol.; 43 (3): 613-617.  
 Robertson T, Bibby S, O'Rourke D, Belfiore T, Lambie H, Noormohammadi AH. (2009), J. App. Microbiol.; 107(6): 2017-2018.



**Micoplasmosi  
emergenti e riemergenti**

# Agalassia contagiosa e micoplasmosi nei piccoli ruminanti in Italia: scenario attuale



G.R. LORIA<sup>1</sup>, R. PULEIO<sup>1</sup>, A. TAMBURELLO<sup>1</sup>, F. MESSINA<sup>1</sup>, R. NICHOLAS<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" - Palermo, Italy

<sup>2</sup> Animal Health Veterinary Laboratories Agency - Weybridge, UK

**Parole chiave:** micoplasmosi, piccoli ruminanti, Italia.

Le malattie da micoplasmidi dei piccoli ruminanti causano generalmente una breve setticemia con secondaria localizzazione del patogeno in organi elettivi (apparato respiratorio, mammario, articolazioni, apparato genitale, congiuntiva). Due malattie emergono tra tutte per danni ed implicazioni socio economiche e per tal motivo incluse nell'OIE International Animal Code List: la Pleuropolmonite Contagiosa delle Capre (CCPP) che colpisce prevalentemente i caprini, diffusa nei paesi africani ed asiatici e causata da *Mycoplasma capricolum subsp. capripneumoniae* (che tralasciamo in quanto non ancora segnalata in EU) e l'Agalassia contagiosa, la ben nota sindrome multi-eziologica che affligge gli allevatori di razze da latte del bacino del Mediterraneo. Accanto a queste malattie, vengono annoverati altri micoplasmidi patogeni per le greggi che potrebbero essere oggi considerati come epizoozie emergenti: *Mycoplasma ovipneumoniae* (Movp) e *Mycoplasma conjunctivae* (Mc). L'agalassia contagiosa (AC) è stata descritta per la prima volta 170 anni addietro sebbene in Italia il primo focolaio sia stato notificato soltanto nel 1973 (Sanguinetti e Chiocco, 1987). In Sicilia la malattia è storicamente endemica, già nel 1932 l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, sotto la direzione scientifica del Prof. Adelmo Mirri, provvedeva a fornire veterinari ed allevatori di un vaccino inattivato allestito dal latte di animali infetti (Stazzi e Mirri, 1956). L'agalassia contagiosa ha un elevato impatto sull'economia delle aziende ovine e caprine a causa della sua particolare morbilità (Nicholas *et al.*, 2008a) che trova condizioni ideali per radicarsi legate agli aspetti tipici della zootecnia mediterranea: allevamento di tipo estensivo, il pascolo comune, la selezione di razze ad alta produzione latte, le lattazioni prolungate (Ottobre-Luglio), la mungitura manuale, le greggi miste ovine e caprine, gli scambi ed il commercio incontrollato di animali.

Anche se questa malattia è classificata tra quelle appartenenti alla Lista B dell'OIE, non ha mai rappresentato, nella realtà, una priorità epidemica per la Veterinaria pubblica, probabilmente perché la zootecnia ovina e caprina è da sempre considerata un settore meno sviluppato ed economicamente meno interessante della fiorente industria bovina (e suina) delle regioni del Centro-Nord Europa. Gli unici dati epidemiologici riguardanti i focolai di agalassia contagiosa sono riportati nei rapporti annuali degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali regionali, ma,

nella gran parte dei casi, sottostimano la reale prevalenza della malattia. Il danno economico a carico degli allevatori non è solamente riconducibile all'interruzione della produzione e alla terapia dei capi infetti ma, anche e soprattutto, agli obblighi dettati dalle norme di Polizia Veterinaria applicate nei focolai confermati. Le restrizioni di Polizia Veterinaria non sono mai mutate dal 1940: quando si verifica un focolaio di AC, le norme obbligatorie, ancora oggi in vigore, prevedono di dichiarare l'azienda come "area infetta" e obbligano a mettere in atto una serie di restrizioni con forti ricadute gestionali ed economiche: impossibilità di avvio al pascolo del gregge infetto al di fuori dell'azienda, distruzione della produzione latte, disinfezione degli ambienti, etc. Tali restrizioni sono adottate, secondo legge, sino al termine di trenta giorni dall'ultimo caso clinico di agalassia contagiosa.

In Sicilia, l'AC è responsabile di oltre il 40% delle mastiti delle pecore e delle capre e, al momento, questa malattia rappresenta uno dei problemi più seri in termini di economia zootecnica, seconda soltanto alla brucellosi per le sue implicazioni zoonosiche. Anche se l'agalassia contagiosa è attribuita a quattro diversi micoplasmidi patogeni, il principale responsabile della malattia nelle nostre regioni è *Mycoplasma agalactiae*. *M. mycoides sub. capri* sino al 2009 classificato come *M. mycoides sub. mycoides "LC"* (Manso-Silvan *et al.*, 2009), *M. capricolum subsp. capricolum* e per ultimo, *M. putrefaciens* sono meno frequentemente isolati in Italia quali agenti di mastite ed artrite in greggi caprine ed ovine (Nicholas *et al.*, 2008b).

L'incubazione dell'AC varia da 6 a 30 giorni, seguita da due differenti decorsi clinici: una forma acuta, osservata di rado, con febbre alta, segni neurologici, tremori e morte e una forma sub-acuta, più tipica delle aree endemiche. La sindrome sub-acuta è caratterizzata da mastite, cheratocongiuntivite, ed artrite. L'infezione della mammella evolve come mastite interstiziale, inizialmente caratterizzata da gonfiore dell'emimammella, aumento della temperatura dell'organo e dolore alla mungitura, seguito da una drastica caduta della produzione e qualità del latte. Le artrite e le cheratocongiuntiviti si osservano normalmente nel 5-10% dei casi. Il Ma è stato isolato dal SNC di soggetti infetti, sia in presenza che in assenza di lesioni specifiche (Loria *et al.*, 2007b) tale fatto, se associato all'evidenza segnalata già da Zavagli nel 1951 (che produceva un vaccino da cervello ovino proprio per l'abbondanza di antigeni estratto), sottolinea la potenziale importanza clinica dei micoplasmidi quali agenti di encefaliti/meningiti soprattutto con riferimento alle infiammazioni di "tipo non purulento".

Nel caso dell'AC, il corso dell'infezione si risolve generalmente in un mese con un dannoso anticipo dell'asciutta ma la forma cronica può prolungarsi per oltre tre mesi (Nicholas *et al.*, 2008a). La severità dell'infezione dipende dall'immunità dell'ospite e dalla virulenza del ceppo coinvolto e, nelle aree endemiche, spesso le greggi possono mostrare totale o parziale assenza di segni clinici, sviluppando una forma cronica subclinica che sorprendentemente può non causare particolari ripercussioni sulla percentuale di grasso, proteine totali, lattosio, totale e cellule somatiche (De la Fe *et al.*, 2009).

Come evidenziato in studi sperimentali condotti da Buonavoglia (1998b), la presenza di anticorpi non è identificabile attraverso esami sierologici (ELISA) prima dei 25-30 giorni. Tuttavia, l'escrescenza dell'antigene è già evidenziabile nel latte infetto dal 9° al 31° giorno dalla prima infezione, nei tamponi oculari dal 4° al 36° giorno, in quelli nasali dal 1° al 39° giorno. Questi risultati confermano che il metodo più sicuro, per la conferma della malattia, continua ad essere rappresentato dall'isolamento del patogeno. In Italia, per la diagnosi di micoplasmosi, l'isolamento dell'agente eziologico dai campioni sospetti, incluso latte, liquido articolare, tamponi oculari, viene effettuato utilizzando terreni selettivi (disponibili ormai in commercio) o in alcuni laboratori prepa-



Figura 1 - Mungitura a mano.

rati estemporaneamente, con aggiunta di inibenti, per evitare la crescita di germi opportunisti durante il lungo periodo di incubazione necessario (4-10 giorni) ed osservare le colonie tipiche. Il test microbiologico rappresenta, ad oggi, il test ufficiale di conferma della malattia. Per alcune specie di micoplasmi, soprattutto quando il campione è contaminato, il tempo necessario a far crescere il microrganismo in questi terreni colturali, può anche richiedere due settimane.

I micoplasmi agenti di agalassia contagiosa necessitano, per svilupparsi, di temperature di 37°C e di una incubazione in atmosfera microaerofila (5-10% CO<sub>2</sub>). *M. agalactiae* produce film-spot sulla superficie sia dell'agar che del brodo di terreni di crescita contenenti proteine dell'uovo. I test biochimici (abilità a fermentare il glucosio, idrolisi dell'arginina e degradazione del tetrazolio) sono eseguiti in brodi di coltura contenenti i differenti substrati ma, a causa della lenta crescita caratteristica dei micoplasmi, questi metodi necessitano di giorni se non di settimane per fornire una risposta certa (Nicholas, Baker, 1998). L'identificazione del ceppo può anche essere eseguita semplicemente tramite metodi sierologici come l'inibizione della crescita o del film-spot e/o con l'utilizzo di anticorpi fluorescenti utilizzando siero iperimmune di coniglio allestito contro le differenti specie di micoplasmi patogeni.

Più recentemente la polymerase chain reaction (PCR) è entrata nell'uso comune per la sua capacità di aumentare la rapidità di risposta, la sensibilità e la specificità della diagnosi (Tola *et al.*, 1997; Mc Auliffe *et al.*, 2003). Tuttavia, rimane un fatto assodato che l'estrazione del DNA del patogeno dal "latte", non è sempre agevole a causa degli inibenti naturali presenti nel campione che ne ostacolano l'estrazione. Nella pratica, si osserva che, campioni di latte con quantità meno abbondanti di antigene (come si verifica per i latti di massa, diluiti per il numero di animali ancora sani, con titoli <10<sup>4</sup> UFC/ml), possono risultare negativi all'analisi. Nella nostra esperienza, visti soprattutto gli insuccessi nell'estrarre adeguate quantità di DNA dal latte, che rappresenta ovviamente il campione di elezione per l'AC, la via più rapida (e sicura) per confermare l'infezione nel gregge è quella di mettere il latte in coltura in brodo selettivo (in ragione di 1/10) per 24 ore, ed eseguire quindi la prova di PCR specifica sul brodo brevemente incubato. Questo consente al campione (spesso classificato come falso negativo a causa dell'eccessiva diluizione come si verifica nei latti di massa) di raggiungere una concentrazione di antigene sufficiente da essere identificato con la PCR.

Enzyme immunoassays, come l'ELISA, il test di inibizione della crescita, l'epifluorescenza e l'immunoblotting sono i più comuni metodi utilizzati in laboratorio (OIE 2008). Negli ultimi anni, sono stati proposti dal commercio diversi kit ELISA che, al momento, forniscono numerosi laboratori che lavorano alla diagnosi ed al controllo dell'infezione. Questi kit hanno però, caratteristiche spesso diverse, allestiti con antigene intero o con le sue frazioni proteiche immunodominanti e possono fornire risultati differenti. Infatti, il più rilevante limite di tali test è il tasso elevato di soggetti falsi negativi che in tal modo rimangono (invisibili) escretori dell'infezione nell'ambiente e diffusori della malattia nel gregge (Lillini *et al.*, 1996). L'ELISA infatti, non evidenzia gli anticorpi negli stadi precoci dell'infezione; alcuni autori hanno potuto, infatti, riscontrare sperimentalmente che gli anticorpi (IgG) compaiono soltanto dopo 4 settimane dall'inizio dell'infezione (Buonavoglia *et al.*, 1998b). Oggi, in Italia i più recenti studi suggeriscono una applicazione combinata di ELISA ed Immunoblotting. Quest'ultimo test, basato sull'elettroforesi e su una colorazione immunoenzimatica, può determinare la presenza dei vari antigeni nel siero a differenti stadi di infezione. In questo modo è possibile discriminare i vari momenti della malattia o, ancora, i capi vaccinati dagli infetti e le eventuali reazioni crociate con altri micoplasmi (Nicholas, 2008a).

Il controllo dell'AC si basa su trattamenti antibiotici e/o vaccinali e sull'applicazione del regolamento di Polizia Veterinaria. La terapia antibiotica comprende differenti principi attivi incluse le ossitetracicline, la tilosina, la tiamulina, l'enrofloxacin ed altri fluorochinoloni di nuova generazione, potenzialmente efficienti contro l'agalassia contagiosa e le altre infezioni da micoplasmi. Nella pratica clinica tuttavia, tali prodotti pur arrestando temporaneamente i segni clinici, non evitano il contagio nel gregge (Nicholas, 2008b). Al momento, dati sull'efficacia "in vivo" di tali farmaci non sono disponibili e ci sono limitati studi pubblicati (in vitro) sull'antibiotico suscettibilità di *M. agalactiae* (Loria *et al.*, 2003). Inoltre, per un allevatore, l'acquisto dei prodotti più moderni ed efficaci è spesso molto oneroso ed il trattamento dell'intero gregge non è realizzabile. Comunque, l'azione degli antibiotici ha raramente effetti permanenti sul decorso della malattia causando spesso, dopo



Figura 2 - Artrite delle articolazioni carpali, causata da *M. agalactiae*.

un primo temporaneo recupero degli animali, una riemersione della micoplasmosi, alcune settimane dopo il trattamento.

Per molti anni, la produzione di un vaccino, considerato all'unanimità come efficace contro la malattia, è stata spesso argomento di dibattito, subendo severe restrizioni: negli anni '90, venivano messi al bando i vaccini prodotti a partire da tessuti animali imputati di esser all'origine dell'ampia diffusione degli episodi di scrapie in tutto il paese (Caramelli *et al.*, 2001). Tale destino, oltre ad arrestare la produzione di un vaccino prodotto a partire da mammella e cervello di ovini infetti, è stato subito anche dallo storico vaccino prodotto a partire da latte malato, secondo la procedura di Mirri, uno dei presidi immunizzanti di maggiore successo clinico dell'IZS della Sicilia.

Con l'avvento delle moderne procedure di isolamento e di nuovi terreni colturali (Hayflick), a questi prodotti ha fatto seguito una seconda generazione di vaccini inattivati contro l'AC, preparati a partire da colture di micoplasma amplificate in brodo, purificate ed inattivate con diversi prodotti chimici tra cui la comune formalina e/o il fenolo e contenenti adiuvanti come l'idrossido di alluminio e l'olio minerale. Questi vaccini sono largamente utilizzati in Italia ma la loro reale efficacia in campo non è stata mai definitivamente provata (OIE, 2000). Tola (1999) ha dimostrato che la saponina ed il fenolo sono gli inattivanti che forniscono una protezione maggiore rispetto ai prodotti convenzionali che utilizzano formalina.

Recentemente, proteine immunogeniche di *Mycoplasma agalactiae* sono state identificate come possibili candidati per vaccini peptidici, ma lo sviluppo pratico di queste acquisizioni è ancora problematico soprattutto in relazione alla variabilità antigenica del patogeno. Sia *M. agalactiae* che *M. mycoides subs capri*, infatti posseggono geni (Vpma, Vmc) in grado di regolare l'espressione di determinate lipoproteine di superficie (Glew *et al.*, 2000; Wise *et al.*, 2006) e quindi di interagire con i meccanismi difensivi dell'ospite, variando i propri antigeni di membrana e sfuggendo in tal modo a quanto messo in atto dal sistema immunitario.

L'uso dei vaccini vivi, prodotti in Turchia ed in Cina, promettente sul piano della stimolazione antigenica, è comunque, al momento, bandito dalla UE.

I futuri programmi di controllo per l'endemismo da AC hanno bisogno di un supporto diagnostico caratterizzato da maggiore sensibilità e me-

todi alternativi per l'identificazione del patogeno e della risposta immunitaria caratteristica. Gli attuali test infatti, non possono superare due differenti limitazioni: la difficoltà nel determinare gli stadi iniziali dell'infezione e di discriminare con facilità i capi vaccinati dagli infetti o ancora, dagli animali guariti che sono spesso, per lungo tempo, i serbatoio della malattia (Bergonier *et al.*, 1998). I test sierologici, a causa della ritardata o variabile produzione di anticorpi negli animali ammalati, sono oggi considerati "test di screening" piuttosto che test individuali (Buonavoglia *et al.*, 1998a). L'ELISA è il più utilizzato dei test disponibili nelle diagnosi di gregge perché è un test di facile realizzazione e può analizzare in breve tempo, molti campioni in una singola prova, con elevata sensibilità e specificità. Tuttavia l'ELISA non è in grado di determinare i casi precoci e discriminare tra i capi malati e vaccinati. L'Immunoblotting è un test più complesso, in termini di tecnica (utilizzato per anni contro la CBPP), ma molto versatile in questo tipo di studi. Rimane, infatti, l'unico strumento in grado di identificare e caratterizzare gli antigeni immunodominanti specifici per ogni ceppo, costantemente espressi durante una infezione da micoplasmata. Tale test è estremamente sensibile (e spesso considerato quale "gold standard") per le malattie da micoplasmata, ma è costoso e trova difficoltà nell'uso routinario. Utilizzando una combinazione dei due test: e.g. ELISA su tutto l'effettivo del gregge ed Immunoblotting per confermare i capi risultati positivi, si ottiene la migliore risposta discriminando tra anticorpi naturali o vaccinali (Tola, comunicazione personale, 2011). In un futuro prossimo, in cui si prevedono più intensi scambi di razze ovine e caprine, un altro importante utilizzo potrebbe essere quello di certificare "AC-free flocks", aggiungendo valore economico agli animali di quell'azienda o di quel territorio. Gli sviluppi futuri della ricerca dovrebbero considerare test sierologici più sensibili che includano anche le IgM. La Biologia Molecolare e la recente introduzione di nuovi test, quale ad esempio il multilocus sequence typing (MLST) nello studio delle micoplasmosi, già contribuiscono ad una reale comprensione e tracciabilità dei focolai ed ancora, nell'interpretare l'evolvere dell'infezione nel territorio (McAuliffe *et al.*, 2011).

Per quanto riguarda gli altri due micoplasmata patogeni, a rischio per l'allevamento ovino e caprino italiano, ovvero il *M. conjunctivae* agente della Cheratocongiuntivite infettiva-Infectious keratoconjunctivitis (IKC) ed il *M. ovipneumoniae* responsabile della cosiddetta "Polmonite atipica", il primo ha sinora preoccupato più per le sue conseguenze nei selvatici (camosci, stambecchi, mufloni) che nelle greggi (Giacometti *et al.*, 2002) dove, ad oggi, la malattia sembra avere un decorso nella maggior parte dei casi, autolimitante. L'evidenza che ancora non convince alcuni ricercatori è che stipti isolati da forme cliniche della malattia e da animali sani non presentano differenze genetiche e pertanto è ancora dibattuta la sua reale patogenicità.

La diagnosi di IKC viene eseguita principalmente attraverso metodi di Biologia Molecolare (PCR) o RT-PCR (Giacometti *et al.*, 1999), effettuati su tamponi congiuntivali. La tempestività del prelievo migliora l'efficienza della diagnosi: in esperienze di campo è stato osservato che nello stesso focolaio, casi recenti osservati nei primi giorni della malattia fornivano un risultato positivo alla PCR, negatizzandosi, anche in presenza di sintomi severi, a partire dal 5° giorno. (Loria *et al.*, 2007a). L'isolamento del patogeno in questa malattia risulta spesso problematico per la contaminazione batterica che segue la prima infezione del micoplasmata. Ricercatori della Sardegna tuttavia, hanno isolato stipti di *M. conjunctivae* da greggi ovine con casi clinici riferibili a IKC con metodi tradizionali.

Non sono disponibili vaccini contro questa malattia e l'uso degli antibiotici (per via topica) ha comunque senso nel limitare i germi di irruzione secondaria che rischiano di complicarne il quadro clinico.

La Polmonite atipica ("Barn cough") è una malattia osservata esclusivamente negli agnelli allo svezzamento. Rari casi di "tosse dei fienili", in ovis adulti, sono riportati in UK come episodi occasionali. Per molti aspetti, la Polmonite atipica somiglia ad una malattia virale, caratterizzata da febbre elevata, scolo nasale di tipo sieroso associato o meno a tosse secca e/o atteggiamenti dispnoici. *M. ovipneumoniae* presenta normalmente, alta morbilità ma bassa mortalità ma, se interviene *Mannheimia spp.* a complicare il quadro clinico, si assiste ad episodi con gravi perdite di soggetti. La trasmissione è squisitamente respiratoria e le condizioni ambientali (concentrazione di molti agnelli, correnti d'aria) sono determinanti per l'insorgere dei focolai.

L'isolamento del patogeno è relativamente agevole anche se le colonie non sempre presentano il tipico aspetto "ad uovo fritto"; la PCR risulta più efficiente nel confermare il sospetto clinico (Loria *et al.*, 2007c)



Figura 3 - Severo episodio di infezione da *M. conjunctivae*.

## Contagious agalactia in small ruminants in Italy

**Key words:** mycoplasma diseases, small ruminants, Italy.

## Bibliografia

- Bergonier, D., Van De Vlede, A., Simon, J.L., Lambert, M., Poumarat, F., Pepin, M., Martel, J.L., Berthelot, X. (1998) Contagious agalactia in France: epidemiological situation and control strategies. In: Leori G., Santini F., Scanziani E., Frey J. (Editors) *Mycoplasmas of Ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. Vol. 2, Brussels European Commission, pp.102-105.
- Buonavoglia, D., Fasanella, A., Sagazio, P., Tempesta, M., Iovane, G., Buonavoglia, C., (1998a) Persistence of antibodies to *Mycoplasma agalactiae* in vaccinated sheep. *Microbiologica* 21, 209-12.
- Buonavoglia, D., Fasanella, A., Greco, G., Montagna, C., Scaltrito, D. (1998b) Infezione sperimentale di pecore con *Mycoplasma agalactiae* rilievi clinici, batteriologici e sierologici. In: *Proceedings XIII Congresso Nazionale SIPAOC, Palermo 16-19 Aprile 1996, Italy*, pp. 109-111.
- Caramelli, M., Ru, G., Casalone, C., Bozzetta, E., Acutis, P.L., Carella, A., Forloni, G. (2001) Evidence for the transmission of scrapie to sheep and goats from a vaccine against *Mycoplasma agalactiae*. *Veterinary Record* 148, 531-536.
- Consenti, B., Montagna, C. O. (1989) Profilassi dell'Agalassia contagiosa degli ovi-caprini. *Obiettivi Veterinari* 5, 31-33.
- De la Fe C., Sanchez A., Gutierrez A., Contreras A., Corrales J.C., Assuncao P., Poveda C., Poveda J.B. (2009) Effects on goat milk quality of the presence of *Mycoplasma spp.* in herds without symptoms of contagious agalactia. *Journal of Dairy Research* 76, 20-23.
- Giacometti M., Nicolet J., Johansson K.E., Naglic T., Degiorgis M.P. and Frey J. (1999) Detection and identification of *Mycoplasma conjunctivae* in infectious keratoconjunctivitis by PCR based on the 16rRNA gene. *Zentralblatt für veterinärmedizin* 46, 173-180.
- Giacometti M., Janovsky M., Belloy L., Frey J. (2002) Infectious keratoconjunctivitis of ibex, chamois and other Caprinae. *Revue Scientifique et Technique Office International des Epizooties* 21, 335-345.
- Lillini, E., Macri, G., Gemma, L., Sabatini, S., Fagiolo, A. (1996) Presence and persistence of healthy carriers in flocks affected by contagious agalactia. In: Frey J. and Sarris K. (Editors) *Mycoplasmas of ruminants: pathogenicity, diagnostics, epidemiology and molecular genetics*. Luxembourg: Office for official publication of the European Commission, pp 133-135.
- Glew M.D., Papazisi L., Poumarat F., Bergonier D., Rosengarten R., Citti C. (2000) Characterization of a multigene family undergoing high-frequency DNA rearrangements and coding for abundant variable surface proteins in *Mycoplasma agalactiae*. *Infection and Immunity* 6, 4539-4548.
- Loria, G.R., Sammartino, C., Nicholas, R.A.J. and Ayling, R.D. (2003) In vitro susceptibility of field isolates of *Mycoplasma agalactiae* to oxytetracycline, tylosin, enrofloxacin, spiramycin and lincospectinomycin. *Research in Veterinary Science*, 75, 3-7.
- Loria G.R., Sparacino L., Manno C., Monteverde V., Caracappa S., McAuliffe L., Nicholas R.A.J. (2007a) "Mycoplasma conjunctivae: a new Risk for small ruminants in the Mediterranean region" 15th International Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Kusadasi, Turchia 15 – 19 maggio 2007.

- Loria G.R., Casalone C., Sparacino L., Iulini B., Oliveri F., Tamburello A., Monteverde V., Caracappa S., Nicholas R.A.J. (2007)b Infezione da *Mycoplasma agalactiae* in cervelli ovini: un nuovo sito di infezione? *Large Animal Review* 2, 65-68.
- Loria G.R., Caracappa S., Scanziani E., Radaelli E., Giardina P., Monteverde V., Nicholas R.A.J. (2007)c "Mycoplasma ovipneumoniae e la "polmonite atipica" degli ovini. *Large Animal Review*, 13: 7 – 11.
- Manso-Silvan L., Vilei E.M., Sachse K., Djordjevic S.P., Thiaucourt F., Frey J. (2009) *Mycoplasma leachii* sp. Nov. species designation for *Mycoplasma* sp. Bovine group 7 of Leach, and reclassification of *Mycoplasma mycoides* subsp. *mycoides* LC as serovar of *Mycoplasma mycoides* subsp. *capri*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 59, 1353-1358.
- McAuliffe, L., Ellis, R., Ayling, R.D., Nicholas, R.A.J. (2003) Differentiation of *Mycoplasma* species by 16S ribosomal DNA PCR and denaturing gradient gel electrophoresis fingerprint. *Journal of Clinical Microbiology*. 41, 4844-4847.
- McAuliffe L, Gosney F, Hlusek M, de Garnica ML, Sperser J, Kargl M, Rosengarten R, Ayling RD, Nicholas RA, Ellis RJ. (2011) Multilocus sequence typing of *Mycoplasma agalactiae*. *J Med Microbiol*. 6, 803-811
- Mirri A. (1932) in Stazzi e Mirri: *malattie infettive degli Animali Domestici*, XI ed. Palermo, 889-890.
- Nicholas R.A.J. (1995) Contagious agalactia. *State Veterinary Journal* 5,13-15.
- Nicholas, R.A.J., Baker, S. (1998) Recovery of *Mycoplasma* from animals. In: Miles R.J. and Nicholas R.A.J. (Editors) *Mycoplasma protocols, Methods in molecular biology*, vol. 104, Humana Books Press, Totowa, New Jersey, USA, pp. 37-43.
- Nicholas R., Ayling R. and McAuliffe L. (2008)a: "Contagious agalactia" in "Mycoplasma diseases of ruminants" Chapter 8, pp 98-113. CABI editors.
- Nicholas R.A.J., Ayling R.D., Loria G.R. (2008)b *Ovine mycoplasmal infections. Small Ruminant Research*, 76: 92-98.
- OIE - Office International Des Epizooties (2008). Contagious agalactia. In: *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines*. 6th Edn. O.I.E. Paris. 2,4,3, 490-496.
- Sanguinetti, V., Chiocco, D. (1987) Contagious agalactia and *Mycoplasma mycoides*: the situation in Italy. In *Agriculture-Contagious Agalactia and Other Mycoplasmal Diseases of Small Ruminants*. Office for Official Publication of the European Communities. Luxembourg, pp. 1-21.
- Stazzi P., Mirri, A. (1956) *Agalassia contagiosa degli ovini e dei caprini*. In: Stazzi P., Mirri A. (Editors) *Malattie infettive degli animali domestici*, 11 ed. Palermo, Italy, pp. 881-891.
- Tola, S., Idini, G., Manunta, D., Casciano, I., Rocchigiani, A.M., Angioi, A., Leori, G. (1996) Comparison of *Mycoplasma agalactiae* isolates by pulsed field gel electrophoresis, SDS-page and immunoblotting. *FEMS Microbiology Letters* 143, 259-265.
- Tola, S., Angioi, A., Rocchigiani, A.M., Idini, G., Manunta, D., Galleri, G., Leori, G. (1997) Detection of *Mycoplasma agalactiae* in sheep milk samples by polymerase chain reaction. *Veterinary Microbiology* 54, 17-22.
- Tola, S., Manunta, D., Rocca, S., Rocchigiani, A. M., Idini, G., Angioi, A., Leori, G. (1999) Experimental vaccination of against *Mycoplasma agalactiae* using different inactivated vaccine. *Vaccine* 17, 2764-2768.
- Wise K.S., Foeking M.F., Roske K., Lee Y.J., Lee Y.M., Madan A., Calcutt J. (2006) Distinctive repertoire of contingency genes conferring mutation-based variation and combinatorial expression of surface lipoproteins in *Mycoplasma capricolum* subsp. *capricolum* of the *Mycoplasma mycoides* phylogenetic cluster. *Journal of Bacteriology* 188, 4926-4941.
- Zavagli V. (1951) *Bull Off. Int. Epiz.* 36, 336-362.

# Produzione, uso ed efficacia sul campo di un vaccino stabulogeno contro *Mycoplasma mycoides subsp. capri* nelle capre



G. MAROGNA, A. BARBATO, A. FIORI, G. SCHIANCHI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna "G. Pegreffi" - Dipartimento di Produzioni

**Parole chiave:** profilassi, immunizzazione, esame clinico.

**INTRODUZIONE** - I micoplasmi appartenenti al cluster *mycoides* sono patogeni sia per gli ovini che per i caprini. In particolare il *Mycoplasma mycoides subsp. capri* può causare nei piccoli ruminanti: setticemie, artriti, mastite e polmoniti. La trasmissione della malattia avviene per contatto diretto, la morbilità è elevata (può arrivare al 100%) mentre la mortalità è variabile e dipende da tutta una serie di fattori condizionanti. In Sardegna, l'infezione è diventata di riscontro relativamente comune nelle capre mentre è sporadica l'osservazione di focolai in greggi ovine. La malattia si manifesta solitamente in forma clinicamente acuta, con febbre e segni respiratori caratterizzati da dispnea, tosse produttiva e scolo nasale. Nella nostra esperienza abbiamo riscontrato la sintomatologia respiratoria principalmente sui soggetti adulti mentre quadri setticemici, ad elevata mortalità, febbre e poliartrite sono stati rilevati principalmente nei capretti. Negli ultimi anni abbiamo registrato un incremento dei focolai di malattia causati dal *Mycoplasma mycoides subsp. capri* nel nostro territorio, a tale riguardo è utile ricordare che la Sardegna è la regione con la più numerosa popolazione di caprini d'Italia ed è lecito ipotizzare che la diffusione dell'infezione possa essere stata condizionata anche dalle strutturali trasformazioni dell'allevamento in parte passato da tecniche di gestione estensiva a management intensivi o semi-intensivi tecnologicamente supportati. Se negli ultimi anni sono aumentate le segnalazioni e si sono contemporaneamente evolute le tecniche diagnostiche ancora poco si è fatto a riguardo della profilassi immunizzante. Questo rappresenta oggi un limite importante nel contrasto alla malattia, ancora più evidente se si considera che la terapia antibiotica consente solo risultati parziali. Il tutto peraltro in un contesto nel quale i nuovi indirizzi nel controllo delle infezioni batteriche prevedono un utilizzo sempre più limitato e ponderato degli antibiotici a vantaggio delle profilassi e in particolare delle vaccinazioni. È in questo contesto che abbiamo monitorato l'evoluzione di due diversi focolai di malattia nelle capre, sperimentando l'efficacia sul campo di una specifica vaccinazione con stabulogeno. I nostri interventi ci hanno consentito di valutare l'efficacia, in sede di focolaio, in tempi e contesti diversi. Nel primo gregge (gregge A) siamo intervenuti in piena lattazione e con capretti da rimonta di poche settimane di vita, nel secondo gregge (gregge B) nel periodo dell'asciutta, in assenza di rimonta. I tempi dei nostri interventi hanno condizionato il calendario delle vaccinazioni ma non l'obiettivo e il risultato finale.

## MATERIALI e METODI

• **Popolazione Sperimentale e anamnesi** - Le nostre prove sono state condotte su due greggi caprini di seguito denominati A e B. I nostri interventi sono iniziati in presenza di focolai naturali della malattia. La consistenza delle greggi, al momento del nostro primo intervento, stimava la popolazione del gregge A in 347 capi adulti di cui 298 femmine in lattazione. In allevamento era presente un gregge di 130 caprette di età compresa fra pochi giorni e due mesi di vita, di cui 58 soggetti femmine destinati alla rimonta con età compresa fra 1 e 2 mesi. Tutte le capre dell'allevamento appartenevano alla razza Saanen. La prima visita avveniva nel mese di febbraio del 2011. La popolazione del gregge B era di 238 capre adulte, di cui 98 a fine lattazione (una mungitura ogni 2 giorni) e la rimanente parte in asciutta. Non era presente in allevamento la rimonta. Le capre erano ibridi di razze diverse principalmente di: Sarde, Maltesi e Saanen. La prima visita avveniva nel mese di luglio del 2011. La tecnica di allevamento era comune alle due greggi e prevedeva pascolo libero in prati naturali, pascolo stagionale su erbai per poche ore al giorno, utilizzo di concentrati in fase di mungitura (sotto i 400 gr. die/capo), fieni e acqua *ad libitum*, mungitura meccanica con impianto "a lattodotto", pernottamento degli adulti in caprile, con lettiera, solo durante i periodi più rigidi dell'inverno. I capretti venivano tenuti in caprili separati, in un unico gregge, dove le adulte en-

travano due volte al giorno (mattino e sera) per allattare i soggetti non ancora svezzati. Allevatori e veterinari aziendali ci riferivano la seguente anamnesi: gregge A, nonostante la cura nell'alimentazione, buona parte delle adulte dimagrivano in modo rapido ed evidente, diversi soggetti adulti mostravano segni di dispnea e scolo nasale (40-50%), di questi, nella stagione in corso venivano a morte circa una decina di capi. La produzione di latte subiva una leggera flessione. Terapie antibiotiche a base di ossitetraciclina per via sistemica, effettuate su singoli capi, non avevano portato ad un miglioramento significativo del quadro clinico. Nei capretti si riferiva elevata mortalità, stentato accrescimento, poliartriti e decubito. Nel gregge B ci veniva riferito di sintomi respiratori analoghi a quelli precedentemente descritti sempre nei soggetti adulti e mortalità del 100% della quota di rimonta (56 caprette) avvenuta nell'arco di un paio di mesi e anticipata da dimagrimento, apatia, poliartrite e decubito.

• **Prelievi e Analisi** - Il nostro metodo prevedeva: visita clinica di un campione rappresentativo delle greggi, prelievi di feci per analisi parasitologiche e per paratubercolosi, prelievi di sangue per ricerca sierologica CAEV, prelievi di latte per ricerche microbiologiche varie, necropsia su soggetti adulti deceduti in allevamento. La pratica del prelievo di latte prevedeva una preventiva pulizia e disinfezione dei capezzoli e quindi l'eliminazione dei primi schizzi di latte e una nuova disinfezione. Il prelievo non veniva differenziato per emimammella, ma si costituiva una miscela del latte di ogni singola mammella. I campioni di latte venivano posti a 5 °C, quindi trasportati al laboratorio dove si procedeva all'immediata semina culturale. Aliquote di 10 µl di latte di ciascun campione venivano seminate su piastre con diversi terreni di coltura per l'isolamento e l'identificazione batterica, ed incubate a 37°C per 24-48 ore. I batteri isolati sono stati identificati a livello di specie, sia mediante tecniche biochimiche che mediante metodi molecolari. In questo lavoro infatti, i metodi biochimici sono stati affiancati da tecniche di identificazione mediante PCR utilizzando primers specie-specifici. In entrambi gli allevamenti abbiamo avuto modo di eseguire diverse autopsie su soggetti adulti morti in azienda e ulteriori campionamenti di organo (essenzialmente polmone) sono stati eseguiti su capi regolarmente macellati. La semina da organo (polmone) è avvenuta per impronta direttamente su agar Hayflick.

• **Vaccino Stabulogeno** - Il vaccino stabulogeno è stato allestito a partire da una colonia (clone) di *Mycoplasma mycoides subsp. capri* dopo identificazione molecolare effettuata utilizzando la metodica specifica messa a punto dalla dott.ssa Bastiana Tola (IZS della Sardegna, Dipartimento di Produzioni). L'allestimento del vaccino ha previsto una prima amplificazione del micoplasma in un matraccio con 50 ml di PPLO arricchito con TC al 15% e siero equino al 10% ed incubando il tutto a 37°C per 24 ore. Da questa coltura si è provveduto alla preparazione di un inoculo sul medesimo terreno, amplificandolo sino ad un volume pari al 10% circa del volume finale del vaccino e re-incubando il medesimo per ulteriori 24 ore a 37°C in agitazione. Si è proceduto quindi alla preparazione dello stabulogeno con un'ulteriore amplificazione, seminando il pre-inoculo su un volume di terreno di crescita proporzionale alla quantità di antigene necessaria alla preparazione delle dosi di vaccino da inoculare agli animali, sempre incubando in agitazione per 24 h a 37°C. Il controllo della purezza della sospensione veniva effettuato eseguendo direttamente una nuova semina su agar sangue e su un brodo nutritivo e tioglicolato. La brodo-coltura veniva quindi adiuvata con idrossido di alluminio al 15% per due ore e successivamente inattivata con l'aggiunta di fenolo allo 0,5% e posta in termostato a 37°C per 24 ore in agitazione. La sospensione veniva lasciata sedimentare a 4°C per 24 ore ed il 50% del surnatante veniva centrifugato a 6.000 g/min in centrifuga Sorvall refrigerata e il pellet dei batteri raccolto ed aggiunto alla sospensione con soluzione fisiologica, fino ad ottenere una concentrazione di micoplasmi di 10<sup>9</sup> UFC/ml. La sospensione così ottenuta ve-

niva omogenata in agitazione e quindi il prodotto veniva infflaconato.

- Controlli sul vaccino - I controlli sul prodotto finito sono stati distinti in fisico-chimici (aspetto e pH), microbiologici (controlli di sterilità) e biologici (controlli di tossicità su topino). Per quanto concerne i controlli di sterilità, le prove hanno comportato la semina contemporanea di una aliquota della sospensione su diversi terreni di crescita:

- 1) agar sangue per verificare una eventuale crescita di batteri aerobi;
- 2) Sabouroud (Oxoid, U.K.) per verificare la crescita delle muffe;
- 3) Thioglicolate Broth (Oxoid) per verificare la crescita degli anaerobi;
- 4) Hayflick agar per verificare l'eventuale crescita di micoplasmi;

Il controllo della tossicità ha previsto l'inoculazione sottocutanea su topino di 1 ml di vaccino e quindi l'osservazione per 24 ore.

- Vaccinazioni - In entrambi i greggi siamo intervenuti in sede di focolaio. La nostra strategia è stata quindi quella di vaccinare il più rapidamente possibile tutto l'effettivo delle capre presenti nelle aziende. La dose di inoculo prevista è stata di 2 ml/capo/sc. Il primo richiamo è stato effettuato a 30 giorni dalla prima inoculazione. Il richiamo successivo è stato previsto a 5 mesi di distanza. Per cui, il calendario ha previsto, per il gregge A: 1° inoculo a marzo, 1° richiamo ad aprile e 2° richiamo a settembre 2011 e per il gregge B, 1° inoculo ad agosto, 1° richiamo a settembre e 2° richiamo a febbraio 2011. Queste prime inoculazioni hanno interessato tutto l'effettivo dei greggi, compresa ovviamente la rimonta del gregge A. Il 3° richiamo è stato calendarizzato sei mesi dopo il 2°, così come i successivi. In pratica si è voluto arrivare ad un regime di due vaccinazioni all'anno a distanza di sei mesi l'una dall'altra. Discorso differente per quanto concerne alla rimonta del 2012 e successive. La nostra strategia ha previsto di continuare le vaccinazioni fino a quando tutti i capi adulti dei due allevamenti non fossero stati sostituiti da capi di rimonta regolarmente vaccinati, si è preventivato di raggiungere questo obiettivo in circa 3 anni, con una rimonta fra il 30 e il 35% ottenuta allevando le caprette femmine nate fra dicembre e gennaio. Tutti gli altri capretti, maschi e femmine, non compresi in questo gruppo o lasso temporale, sono stati destinati alla macellazione all'incirca entro il 35° giorno di vita. Su questa rimonta, svezzata attorno al 20° giorno, si è deciso di vaccinare molto precocemente, a circa 1 mese di vita, con richiamo dopo 30 giorni e con un secondo richiamo previsto fra il quinto e sesto mese successivi tendente ad uniformare e sincronizzare le vaccinazioni di questi gruppi attorno al mese di agosto. Da questo momento in poi le capre della rimonta vengono richiamate seguendo il calendario delle vaccinazioni delle adulte.

- Profilassi sanitaria - Tutti i capi con sintomi clinici sono stati sistematicamente divisi e riuniti in un gregge isolato. È stata bloccata l'introduzione di nuovi capi in azienda. La gestione della rimonta ha comportato, durante il periodo dell'allattamento, il divieto di introduzione nel caprile dei capretti, di adulti con segni clinici di qualsiasi natura.

- Terapia - l'utilizzo della terapia è stato ridotto al minimo e ha riguardato pochissimi capi sui quali gli interventi sono stati giustificati da esigenze di rispetto dei fondamentali principi di benessere animale. La terapia antibiotica è stata quindi praticata solo in casi eccezionali utilizzando il principio attivo *tilosina*.

- Riforma - questa è una delle voci fondamentali nel risanamento. Tutti i capi adulti con gravi sintomi respiratori, magri e anziani sono stati sistematicamente scartati dall'allevamento in tempi e modi condivisi con gli allevatori.

## RISULTATI E DISCUSSIONE

- Esami clinici pre-vaccinazione - Gregge A: circa il 30% delle capre adulte del gregge era costituito da animali molto magri (stima BCS); oltre il 50% degli animali presentava una abbondante presenza di muco alle nari; 26 soggetti presentavano, oltre al muco e al dimagrimento anche un grave quadro di dispnea. Non si osservavano poliartriti nelle capre adulte ad eccezione di un becco in età avanzata. All'esame clinico della mammella dei soggetti in mungitura non si evidenziavano lesioni particolari, le produzioni erano comunque buone, anche se l'allevatore dichiarava di aver notato un calo. L'esame clinico ha seguito il metodo descritto da Marogna et al. nel 2011. Nel gregge dei capretti abbiamo rilevato 5 soggetti di età compresa fra uno e due mesi che presentavano febbre (41-42 °C), apatia, decubito, dimagrimento e poliartrite. L'allevatore ci riferiva che tutti i capi che avevano precedentemente presentato questa sintomatologia erano venuti invariabilmente a morte nell'arco di 1-3 giorni, in tutto una quindicina di capi. Il resto dei capretti conviventi appariva, clinicamente, in ottimo stato di salute. Gregge B: anche in questo gregge verificavamo una sintomatologia clinica respiratoria simile alla precedente. Molti soggetti apparivano magri, presentavano muco alle nari e circa una trentina di capi presentava dispnea. I capi adulti an-

cora in lattazione erano pochi e stavano entrando in asciutta, la visita non avveniva quindi nelle migliori condizioni per evidenziare qualcosa, in ogni caso non si apprezzavano lesioni particolari. Non era possibile visitare la rimonta perché l'allevatore ci riferiva che tutti i capi erano morti con sintomi di poliartrite, apatia, dimagrimento.

- Esami anatomico-patologici - I quadri da noi verificati erano analoghi per i due greggi. Tutti i 5 capi adulti esaminati nell'arco di un mesetto (2 del gregge A e 3 del gregge B), presentavano le stesse lesioni anche se con quadri di gravità differenti. Abbiamo rilevato una pleurite essudativa fibrinosa con versamento di liquido in cavità toracica e focolai di polmonite più o meno estesi, a vario grado di epatizzazione. I linfonodi mediastinici apparivano aumentati di volume, reattivi e in alcuni casi emorragici.

- Esami parassitologici, sierologici e colturali - Gli animali di entrambi i greggi non mostravano cariche infestanti tali da giustificare i sintomi descritti. In entrambi gli allevamenti, nel campione saggiato, si evidenziava una positività sierologica alla CAEV sotto il 30%. Dato oggi, purtroppo, di normale riscontro nelle greggi isolate e, a nostro avviso, non tale da condizionare in modo significativo lo stato descritto. Non si rinvenivano, perlomeno nel campione saggiato, casi di paratubercolosi. Dal latte di entrambi gli allevamenti venivano isolati alcuni stafilococchi coagulasi negativi e in pochi capi il *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. Lo stesso microorganismo veniva sistematicamente isolato su tutti i campioni di polmone analizzati.

- Per quanto concerne ai controlli specifici sul vaccino stabulogeno riportiamo:

*Controlli fisico-chimici*: la sospensione vaccinale non ha evidenziato formazione di grumi o comunque di alterazioni particolari dell'aspetto, il valore finale di pH è variato fra 6.0 e 6.2.

*Controlli microbiologici*: nei controlli di purezza con agar sangue si è risolto esclusivamente il *Mycoplasma mycoides subsp. capri*.

*Controllo della sterilità*: non è stata evidenziata alcuna crescita nella semina sui terreni: Agar Sangue, Sabouroud, Thioglicolate e Hayflick.

Per quanto concerne alle reazioni post vaccinali riportiamo:

*Controlli post inoculo*: non si sono evidenziate reazioni nel punto di inoculo e nelle 24 ore successive all'inoculazione i soggetti vaccinati non hanno manifestato segni clinici comunque riferibili alla vaccinazione.

- *Efficacia sul campo*: l'efficacia sul campo è stata valutata sia dal punto di vista clinico che con prelievi di latte durante la lattazione e con prelievi di polmone effettuati su animali regolarmente macellati. Il nostro protocollo prevedeva anche esami autotipici sistematici su tutti i capi eventualmente morti in azienda dopo il primo richiamo ma, l'assenza di mortalità, ha reso inapplicabile questo riscontro. Abbiamo quindi seguito esclusivamente le macellazioni degli animali di scarto, rinvenendo lesioni, peraltro attese, nei soggetti che già prima della vaccinazione avevano manifestato una sintomatologia clinica, mentre non sono mai state osservate lesioni in animali vaccinati e regolarmente macellati con una anamnesi di assenza di sintomi clinici pre e post vaccinazione. Per quanto concerne al gregge A, nell'intervallo di tempo fra la prima vaccinazione e il primo richiamo, morivano due dei 5 capretti con sintomatologia pre-vaccinale e si ammalava un nuovo capo del gregge. Nel periodo fra il primo e il secondo richiamo (5 mesi) non si ammalavano nuovi capretti e guarivano, apparentemente senza riportare danni, tre dei quattro soggetti ammalati. Un unico capretto continuava a presentare uno stentato accrescimento, poliartrite e difficoltà di deambulazione per cui si riteneva necessaria la soppressione. La nascita dei capretti della stagione successiva (2012) si svolgeva senza problemi di ordine sanitario e nessuno dei soggetti della rimonta, peraltro più numerosa della norma, ha mai presentato sintomi riferibili all'infezione da *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. Nessun caso di nuova infezione, o meglio, nessuna sintomatologia respiratoria clinicamente evidente è stata evidenziata nella popolazione delle capre adulte. Anche gli esami colturali del latte non hanno evidenziato crescita di *Mycoplasma mycoides subsp. capri*. Gregge B, anche in questo gregge nessun nuovo caso clinico con sintomatologia respiratoria è stato evidenziato nella popolazione delle capre adulte. Nessun capo adulto è venuto naturalmente a morte. I parti di dicembre e gennaio si sono svolti regolarmente. Un problema si è invece verificato nel mese di marzo quando nel gruppo della rimonta composto in quel momento da 53 caprette femmine di 2-3 mesi di età abbiamo constatato sintomi relativamente poco severi, ma presenti, in 7 capi. A questo punto abbiamo verificato che il 1° richiamo dopo la vaccinazione era stato eseguito per errore con un ritardo di circa un mese rispetto a quanto da noi prescritto. I soggetti sono tutti guariti spontaneamente e da quel momento non abbiamo più registra-

to nuovi casi. Questo inconveniente ci ha comunque consentito di avere maggiori riferimenti sul potere e la durata dell'immunizzazione del nostro stabulogeno. Premesso che uno dei problemi di fondo di tutti gli stabulogeni, come di tutti i vaccini spenti, sia la sua scarsa capacità di provocare una risposta immunologica intensa e duratura, da cui la necessità di adjuvare il vaccino e di prevedere almeno un richiamo ogni 6 mesi, il vaccino, quando inoculato nei tempi previsti ha dimostrato di proteggere gli animali dall'insorgere delle forme cliniche evidenti, sia quelle respiratorie che quelle setticemiche o poliartriche tipiche dei capretti. Dall'utilizzo del vaccino la mortalità nei due greggi è stata ridotta a zero. La nota evidentemente negativa riguarda la circolazione dei micoplasmi. È evidente come sia bastato un ritardo di un mese nel richiamo delle caprette del gregge B per determinare una recrudescenza sintomatologica. Questi nuovi casi, seppur risolti in modo positivo, hanno dimostrato che il vaccino non impedisce o meglio, non impedisce completamente la circolazione dei micoplasmi. È vero che ci eravamo prefissi l'eradicazione della malattia vaccinando per almeno tre anni, tuttavia rimane un dato inconfutabile che, ad un anno dall'inizio del risanamento, è bastato un piccolo ritardo per causare una recrudescenza. Su questo punto dobbiamo lavorare molto. Dobbiamo dotarci di strumenti di monitoraggio più pratici e specifici che ci consentano, per esempio, di seguire meglio la risposta sierologica (su questi aspetti lavora con successo la dott.ssa Bastiana Tola) nonché, in prospettiva futura, testare nuovi adjuvanti che ci consentano di aumentare sia l'intensità che la durata della risposta. In ogni caso, non dimentichiamoci che, in attesa di nuove soluzioni, i nostri vaccini stabulogeni rimangono attualmente l'unica possibile e valida arma contro queste infezioni.

**CONCLUSIONI** - Da quanto esposto nei risultati appare evidente come il nostro vaccino stabulogeno, se regolarmente inoculato, abbia contribuito ad eliminare l'insorgere di nuove forme cliniche di malattia nei due allevamenti in esame. Nel contesto internazionale la valutazione dell'efficacia dei vaccini ha subito negli ultimi anni importanti evoluzioni, l'obiettivo è infatti passato dal ridurre la gravità delle manifestazioni cliniche ad evitare nuove infezioni e ad impedire la circolazione dei microrganismi patogeni. L'introduzione di nuove tecnologie sia nell'allestimento dei vaccini che nella possibilità di monitorare la risposta del sistema immunitario ha infatti prospettato più alti livelli di protezione vaccinale. Tuttavia, ad oggi, il migliore risultato ottenuto nella maggior parte delle prove sul campo rimane sempre quello ridurre o evitare l'insorgere di nuovi casi clinici nell'allevamento. Nella moderna valutazione dell'efficacia vaccinale vengono oggi considerati aspetti un tempo ignorati o sottovalutati come quelli legati alla capacità dell'organismo di sviluppare un adeguato livello di difese immunitarie specifiche ed aspecifiche. Questa capacità dipenderebbe da numerosi fattori legati: alla specie animale, alle caratteristiche di allevamento e all'individuo, tutte queste novità, per alcuni aspetti, possono complicare la valutazione dell'efficacia dei vaccini. Per esempio, nel caso delle bovine da latte è noto che vi siano degli stati di immunodepressione legati a particolari momenti produttivi come il parto (Ingvarsen, 2003), ed è altrettanto noto che vi siano differenze nei livelli di difese immunitarie aspecifiche in funzione dell'età dell'animale (Mehrzhad et al. 2001) studi sui caprini sono in corso ma è lecito pensare che anche in questa specie esistano analoghi meccanismi. Queste differenze determinano quindi una notevole variabilità nella sensibilità degli animali alle infezioni

durante la loro carriera produttiva e di queste nozioni bisognerebbe sempre tenere conto nella valutazione dell'efficacia vaccinale. Anche nel nostro lavoro la diversa tempistica vaccinale, perlomeno in una prima fase, potrebbe aver condizionato la risposta immunitaria, tuttavia, ad oggi, non abbiamo ancora specifici riscontri da presentare. Altri fattori che condizionano sia l'allestimento dei vaccini che la valutazione della loro efficacia risiedono nella eterogeneità genica ed antigenica dei micoplasmi, perlomeno quando presente. Ecco quindi che assumono grande importanza gli studi che consentono una mappatura delle proteine di superficie dei ceppi circolanti nonché lo studio genetico dei diversi ceppi eventualmente esistenti. Per quanto riguarda il *Mycoplasma mycoides subsp. capri* non possediamo al momento dati conclusivi che ci possano sostenere in tal senso. In ogni caso, la nostra strategia incentrata sull'utilizzo dei micoplasmi direttamente isolati nell'allevamento, consente di ovviare a questa problematica. Quanto scritto illustra la maggior parte delle difficoltà che bisogna affrontare nell'allestimento di nuovi vaccini pienamente efficaci ed evidenzia lo sforzo, anche economico, che la ricerca deve sostenere in questo compito. La nostra proposta, cioè l'utilizzo di vaccini stabulogeni nel controllo di questa come di altre patologie, non deve essere interpretata come un ritorno al passato e/o come il tentativo di sminuire o sconfessare gli studi sui nuovi vaccini, ma vuole essere, in attesa che finalmente si arrivi a vaccini evidentemente dotati di maggiore efficacia, la più valida (attualmente l'unica?) ed economica alternativa che oggi si può utilizzare nella pratica di campo. Da un punto di vista pratico/logistico poi, la rete degli Istituti Zootecnici, diffusa su tutto il territorio nazionale, è assolutamente in grado di coprire ogni eventuale richiesta, per cui riteniamo che l'utilizzo sistematico dei vaccini stabulogeni contro queste infezioni sia utile e conveniente sia dal punto di vista sanitario che economico.

*Ringraziamenti: un sentito ringraziamento deve andare ai Sig.ri Farina Fabrizio, Auzzas Salvatore e Dinapoli Uccio, senza il cui apporto questo lavoro non sarebbe mai venuto alla luce.*

#### ■ Production, use and field efficacy of a herd-specific vaccine against *Mycoplasma mycoides subsp. capri* in goat

**Key words:** prophylaxis, immunization, clinical examination.

#### Bibliografia

1. Marogna G., Pilo C., Vidili A., Tola S., Schianchi G., Leori S.G. (2011). Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis - Small Ruminant Research 102: (2011) 74-83.
2. Ingvarsen KJ, Dewhurst Rj, Friggens Nc. (2003). On the relationship between lactational performance and health: is it yield or metabolic imbalance that cause production diseases in dairy cattle? A position paper. Livestock Production Science 2003; 83:277-308.
3. Mehrzhad J, Dosogne H, Meyer E, Heyneman R, Burvenich C. (2001). Respiratory burst activity of blood and milk neutrophils in dairy cows during different stages of lactation. J.Dairy Res. 2001;68:399-415.

**Protocolli clinico diagnostici  
e strategie di profilassi e/o terapia  
delle principali problematiche  
sanitarie dell'allevamento  
ovino e caprino**

# Paratubercolosi ovi-caprina: approccio alla diagnosi e al controllo



M. FIASCONARO<sup>1</sup>, C. GARBARINO<sup>2</sup>, M. RICCHI<sup>2</sup>, G. CAMMI<sup>2</sup>, L. SPURIA<sup>1</sup>,  
V. DI MARCO<sup>1</sup>, N. ARRIGONI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Area di Barcellona P.G. (Me)

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Centro di riferimento Nazionale per la Paratubercolosi, Sezione di Piacenza

**Parole chiave:** Paratubercolosi, ovino, caprino, diagnosi, controllo.

**INTRODUZIONE** - La paratubercolosi o Malattia di Johne riveste oggi un ruolo di notevole attualità, sia per i gravi danni sanitari ed economici che arreca agli allevamenti, che per le segnalazioni sempre più frequenti che attribuiscono a *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map) un ruolo eziologico nella genesi della Malattia di Crohn dell'uomo. Tuttavia, anche se Map viene isolato con una frequenza 7 volte più elevata nelle persone affette da malattia di Crohn che nei controlli<sup>1</sup>, a tutt'oggi non tutte le opinioni sono concordi nell'attribuirgli un ruolo causale<sup>2</sup>, o almeno quello di fattore scatenante la malattia in una sotto-popolazione geneticamente predisposta. Recentemente è stato inoltre ipotizzato un coinvolgimento di Map nella patogenesi di altre malattie croniche dell'uomo, quali il diabete mellito tipo 1<sup>3,4</sup>, il colon irriabile<sup>5</sup> e la sclerosi multipla<sup>6</sup>.

Un aspetto che preoccupa particolarmente è quello della possibile contaminazione degli alimenti di origine animale, in particolare dei prodotti lattiero-caseari. Per l'esportazione di tali prodotti in alcuni paesi terzi (India, Cina) già vengono richieste garanzie sanitarie nei confronti di questa patologia. È pertanto prioritario focalizzare l'attenzione su questa malattia, nell'ipotesi che nel futuro questa correlazione fosse definitivamente provata.

Nonostante le prime segnalazioni della malattia nella pecora e nella capra risalgano rispettivamente al 1911 e al 1924<sup>7</sup>, fino ad oggi l'attenzione del mondo scientifico è stata rivolta principalmente alla specie bovina ed in particolare all'allevamento da latte di tipo intensivo.

Poca considerazione ha avuto invece la malattia negli ovini e nei caprini, soprattutto nell'allevamento tradizionale allo stato brado e semibrado, tipico e peculiare del meridione d'Italia e delle isole, ancora molto diffuso e caratterizzato dalla produzione di una vasta gamma di prodotti a latte crudo.

Non ci sono dati precisi sulla diffusione della patologia in Italia negli ovi-caprini, ma è presumibile che, analogamente a quanto segnalato per il resto del territorio europeo dove la prevalenza di allevamenti infetti risulta superiore al 20%<sup>8</sup>, la diffusione dell'infezione nel nostro paese sia elevata, anche se spesso sottovalutata perché difficilmente riconosciuta e diagnosticata dagli allevatori e dai veterinari aziendali.

Scopo del presente contributo è fornire un approccio metodologico ai veterinari aziendali e agli allevatori sugli aspetti diagnostici e di controllo dell'infezione in allevamento.

**Eziologia** - La paratubercolosi è una malattia infettiva e contagiosa, ad andamento cronico, che colpisce i ruminanti domestici e selvatici, causata da *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map).

Tra le peculiarità che caratterizzano la malattia nei piccoli ruminanti, è da segnalare che i ceppi di Map di origine ovina sono marcatamente differenti, sia dal punto di vista genetico che fenotipico e patogenetico, rispetto ai ceppi che infettano la specie bovina<sup>9,10,11,12,13,14</sup>.

Sulla base di alcune caratteristiche genetiche e fenotipiche, attualmente i ceppi di Map sono suddivisi in tre gruppi principali<sup>15</sup>:

- Tipo I (denominato anche S=sheep), isolato per lo più negli ovini e nei caprini e caratterizzato da crescita estremamente lenta o addirittura non coltivabile nelle normali condizioni utilizzate dalla maggior parte dei laboratori, talvolta pigmentato;
- Tipo II (denominato anche C=cattle), ad ampio spettro d'ospite (uomo compreso), di facile isolamento in coltura, con tempi di incubazione variabili da 1 a 4 mesi;
- Tipo III (definito anche come Tipo intermedio), raramente isolato da bovini, ovini e caprini<sup>16,17</sup>, molto vicino sia da un punto di visto

genetico sia fenotipico, al tipo I, tanto che da alcuni autori ne viene considerato un sottotipo<sup>15</sup>.

Sulla base di polimorfismi delle sequenze d'inserzione IS1311 e IS900, i differenti tipi di Map possono essere discriminati tra loro rispettivamente mediante PCR-REA<sup>18</sup> o PCR-DMC<sup>19</sup>.

Nonostante la frequente promiscuità tra bovini ed ovini, in quest'ultima specie è molto più frequente il riscontro di ceppi ovini (tipo I o "S"). Questo suggerisce che i ceppi bovini (tipo II o "C"), nonostante la dimostrazione sperimentale della potenziale patogenicità per gli ovini, tendano a non mantenersi naturalmente negli ovini<sup>20</sup>. Studi sperimentali hanno inoltre dimostrato l'assenza di patogenicità dei ceppi ovini per i bovini<sup>21</sup>. Per quanto riguarda le capre, queste si infettano con entrambi i ceppi, ma quelli bovini sembrano dotati di maggiore patogenicità rispetto ai ceppi ovini.

**Patogenesi e sintomatologia clinica** - Analogamente a quanto avviene nella specie bovina, i fattori che influenzano la durata del periodo di incubazione e la gravità della forma clinica sono la dose infettante e l'età, essendo massima la recettività all'infezione negli animali giovani e via via decrescente fino a ridursi quasi completamente in età adulta. Tuttavia, in condizioni particolari (alta prevalenza di infezione, management scadente), anche gli animali adulti possono infettarsi, ma difficilmente manifesteranno la forma clinica.

Maggiore è la quantità di Map assunto (dose e frequenza) e minore è l'età di infezione, più grave e precoce è l'esordio dei sintomi clinici.

Gli animali si infettano generalmente durante le prime settimane di vita attraverso l'ingestione di feci contenenti Map, o di latte e colostro contaminati. Analogamente alla specie bovina, è segnalata la possibilità di infezione verticale, in particolare se la madre si trova in fase avanzata di infezione.

Il periodo di incubazione negli ovi-caprini è generalmente più breve rispetto a quanto si osserva nel bovino, tipicamente dai 2 ai 5 anni; in particolari condizioni di rischio il periodo di incubazione può essere anche più breve<sup>22</sup>, talvolta inferiore ai 12 mesi<sup>20</sup>.

Anche il complesso dei sintomi clinici negli ovini e nei caprini mostra caratteristiche differenti rispetto a quello tipico del bovino<sup>7,23</sup>.

Nei piccoli ruminanti il segno più caratteristico è infatti la perdita di peso e lo scadimento delle condizioni generali, mentre la classica diarrea profusa, comunemente riscontrata nella specie bovina, è generalmente assente o intermittente e compare solo nella fase finale di "collasso delle resistenze".

Altri sintomi riscontrati nei piccoli ruminanti sono: riduzione della produzione latte e presenza di vello opaco e caduco.

L'enteropatia proteino-disperdente ed il malassorbimento, dovuto alla marcata alterazione della struttura della parete intestinale, portano ad una ipoalbuminemia, con conseguente ascite ed edema intermandibolare di origine discrasica. Segni questi caratteristici, ma non patognomonici della malattia e spesso, soprattutto nella capra, incostanti. Sebbene l'appetito rimanga conservato, in conseguenza del deficit metabolico vengono utilizzate inizialmente le riserve muscolari, in particolar modo dei muscoli lombari e degli arti posteriori, successivamente i depositi adiposi sottocutanei e viscerali, tra cui quelli sub-epicardici.

Sebbene la paratubercolosi sia generalmente descritta come una malattia apiretica, gli animali possono presentare febbre, poiché il progressivo indebolimento induce una maggiore suscettibilità alle infezioni ed infestazioni secondarie. In corso di malattia conclamata inoltre, si riscontrano spesso alterazioni ematologiche quali eritropenia, diminuzione della emoglobina, leucocitosi con inversione del rapporto neutrofili/linfociti, ipoalbuminemia<sup>23,24</sup>. Negli ovini sono stati riscontrati squi-

libri elettrolitici con diminuzione di ioni calcio, potassio, cloro e magnesio a causa dello stato diarroico<sup>23</sup>.

**Lesioni anatomo-patologiche** - L'indagine clinico-anamnestica deve essere accompagnata da un accurato esame necroscopico delle carcasse dei soggetti venuti a morte, allo scopo di raccogliere le informazioni necessarie a confermare o escludere il sospetto diagnostico.

Nella maggior parte dei casi, le lesioni macroscopiche coinvolgono la porzione distale del piccolo intestino (digiuno ed ileo) ed i relativi linfonodi tributari; è da sottolineare che le lesioni tipicamente osservate nel bovino (enterite granulomatosa con ispessimento della mucosa e della sottomucosa, infiltrata da parte di ammassi di cellule epitelioidee replete di micobatteri) sono generalmente meno evidenti nei piccoli ruminanti, in particolare nei caprini, e spesso la gravità delle lesioni non è correlata all'intensità dei sintomi.

Nei casi più gravi l'aspetto delle lesioni intestinali viene descritto "a circonvoluzioni cerebrali", oppure, secondo altri autori, "a scala di corda"<sup>25</sup>. I linfonodi meseraici possono essere aumentati di 2-3 volte rispetto al volume normale ed in sezione si presentano edematosi, con presenza di focolai necrotici, spesso calcificati. Secondo alcuni autori, le lesioni calcifiche, talvolta riscontrate anche a livello epatico, sono di maggiore riscontro nella capra che nella pecora<sup>7</sup>.

Particolarmente caratteristica è la reazione flogistica a livello dei vasi linfatici, ove i macrofagi si accumulano, andando incontro a fenomeni di necrosi e calcificazione e formando focolai puntiformi biancastri, più o meno confluenti, "a corona di rosario", a grappolo o cordoniformi. L'estesa ostruzione e la conseguente stasi del circolo linfatico sono alla base della linfangectasia, generalmente associata alla presenza di focolai granulomatosi.

Il quadro anatomo-patologico può essere inoltre complicato da lesioni emorragiche puntiformi, sia a carico del tratto intestinale colpito che degli stessi linfonodi satelliti.

Non è infrequente il riscontro di arteriosclerosi dell'aorta in entrambe le specie e di amiloidosi renale<sup>26</sup>.

L'autopsia eseguita sui soggetti cachettici rivela ascite ed estesa atrofia gelatinosa generalizzata dei depositi di grasso.

Bisogna tuttavia sottolineare che non sempre il complesso di tutte le lesioni descritte è rappresentato, anzi a volte animali con forma clinica possono avere un intestino macroscopicamente normale e presentare unicamente un aumento di volume dei linfonodi meseraici. Pertanto, ai fini della formulazione di una diagnosi corretta, l'esame necroscopico deve essere sempre associato ad esami di laboratorio.

**Diagnosi differenziale** - Nel caso in cui il veterinario aziendale riscontri in allevamento la presenza di animali che manifestino calo dell'incremento ponderale, diminuzione della produzione latte, associati o meno a diarrea incurabile con le normali terapie, è necessario prendere in considerazione, ai fini della diagnosi differenziale, le patologie più frequentemente causa di problematiche analoghe. Tra queste sono da ricordare le infestazioni parassitarie (in particolare quelle sostenute da distomi e strongilidi), le infezioni batteriche (ad es. sostenute da *Corynebacterium pseudotuberculosis* o le clostridiosi a lungo decorso), virali (in particolare quelle sostenute da lentivirus quali *Visna Maedi* ed Adenomatosi polmonare)<sup>27</sup> e gli stati di malnutrizione.

In conclusione, nel caso di sospetto, un attento esame anamnestico e clinico deve prendere in considerazione l'età ed il numero dei soggetti colpiti, la prevalenza all'interno dell'allevamento, il periodo di comparsa della sintomatologia, l'acuzie e le caratteristiche della diarrea, le caratteristiche dell'alimentazione e del management aziendale e infine la tendenza da parte dell'allevatore all'acquisto ripetuto ed incontrollato di soggetti da diversi allevamenti.

Data l'aspecificità dei sintomi, per la conferma di sospetto è sempre necessario un campionamento mirato per le indagini di laboratorio.

**Diagnosi di laboratorio** - Per la conferma diagnostica, da effettuare mediante esame istologico e test diretti ad evidenziare Map (coltura e PCR) da tessuti colpiti da lesioni caratteristiche, si consiglia di prelevare ed inviare al laboratorio, in condizione di refrigerazione, tutto il pacchetto intestinale o almeno 5 cm di ileo terminale che include la valvola ileo-cecale ed i relativi linfonodi. Una parte del campione va messa in formalina e la rimanente va refrigerata per l'esame colturale e la PCR. Anche in presenza di un intestino apparentemente normale in un animale sospetto dal punto di vista clinico, è sempre consigliabile prelevare questo materiale<sup>20</sup>.

I **test diretti (coltura e PCR)** sono dotati di una specificità prossima al 100% e si rivelano molto utili nella gestione della problematica in allevamento, in quanto individuano gli animali eliminatori, anche in fase pre-

clinica. Tuttavia, dati i costi elevati, il loro utilizzo avviene generalmente solo in casi particolari e limitati (diagnosi iniziale di allevamento).

La coltura inoltre presenta altri inconvenienti, legati ai tempi lunghi di incubazione (fino a 6-8 mesi nei piccoli ruminanti) e alla difficoltà nella coltivazione dei ceppi ovis; per tali motivi nei piccoli ruminanti la coltura deve essere sempre associata al test PCR.

Il test che dimostra la più elevata applicabilità in campo, dati i costi ridotti, è il test **ELISA**. I dati di sensibilità di tale test variano in funzione della fase di infezione, risultando inferiori negli animali in fase iniziale (non escretori di Map attraverso le feci e senza sintomi clinici) rispetto agli animali escretori e a quelli con sintomi clinici<sup>28</sup>.

I dati di sensibilità riportati dai vari studi variano dal 16 al 44% negli ovini infetti in fase iniziale, per salire al 36-85% negli ovini con forma clinica.

I valori di sensibilità nelle capre appaiono più elevati rispetto a quelli degli ovini: negli animali infetti in fase iniziale la sensibilità riportata dalla letteratura è del 63-84%, per raggiungere valori di 82-100% negli animali con forma clinica. Nonostante non esistano robusti studi che siano in grado di differenziare la risposta immune e la suscettibilità delle pecore e delle capre alle infezioni da Map, dati sperimentali ed osservazioni cliniche nelle due specie suggeriscono che ci sia una certa differenza nella risposta immune di queste due specie; le capre infatti mostrano una risposta immune più intensa e più precoce rispetto alle pecore, suggerendo che i test sierologici possano essere più sensibili in questa specie<sup>20</sup>.

**Diagnosi di allevamento** - Qualora ci sia la necessità di classificare lo stato sanitario di un allevamento, al fine di adottare delle misure di controllo, possono essere usate diverse strategie, analogamente a quanto si attua in campo bovino.

L'analisi di **campioni di feci ambientali** è potenzialmente utile, ma non esistono dati pubblicati di sensibilità e specificità; analogamente non sono stati standardizzati né il numero di campioni necessari, né i punti di prelievo. In linea generale, i campioni devono essere rappresentativi del maggior numero possibile di animali adulti, per cui devono essere campionati i punti di massimo passaggio e affollamento. Dato che spesso le analisi vengono effettuate su materiale essiccato, il test PCR ha maggiori probabilità di successo ed è pertanto sempre consigliabile, perché in grado di rilevare anche ceppi non vitali.

Gli esami su **pool di feci** sono più impegnativi e richiedono più lavoro in laboratorio rispetto ai test ambientali, ma hanno il vantaggio di essere sicuramente rappresentativi di tutti gli animali adulti e, in caso di positività, è possibile risalire all'animale escretore.

La sorveglianza attraverso l'utilizzo di **test sierologici (ELISA) su siero di sangue o latte**, a fronte di costi sicuramente più sostenibili, può essere effettuata a tappeto oppure su un campione di animali di età più avanzata o in peggiori condizioni di nutrizione.

**Biosicurezza: come prevenire l'introduzione di Map in allevamento** - Il messaggio fondamentale che il veterinario deve trasmettere agli allevatori è come impedire che l'infezione entri e si diffonda in allevamento. A tale scopo il veterinario deve fornire una adeguata formazione/informazione agli allevatori, anche attraverso l'utilizzo di materiale didattico scritto.

Analogamente al settore bovino, il rischio maggiore di introdurre l'infezione in allevamento è attraverso l'acquisto di animali infetti. Testare gli animali in ingresso può essere utile, ma non è sufficiente, in relazione alle scarse *performances* dei test in termini di sensibilità. Garanzie maggiori si ottengono dalla conoscenza dello stato sanitario dell'intero allevamento di provenienza.

Altri rischi di introduzione dell'infezione, anche se di minore importanza, sono legati al contatto con feci infette, per esempio attraverso il pascolo contaminato da ruminanti infetti, sia domestici che selvatici.

Spesso la diagnosi di paratuberculosis viene fatta inizialmente in un gruppo di animali recentemente acquistati, anche a causa dello stato di stress che è generalmente superiore rispetto a quello degli animali presenti in azienda. In questo caso, allo scopo di valutare lo stato sanitario, è consigliabile applicare test mirati selettivamente sugli animali acquistati, evitandone la selezione per la rimonta. In ultima analisi, se l'incidenza di infezione appare elevata, è consigliabile eliminare tutto il gruppo di animali acquistati.

**Controllo** - Le strategie di controllo si basano sull'adozione contemporanea di misure tendenti a:

- eliminare i soggetti infetti, in particolare quelli in fase avanzata di infezione;
- proteggere gli animali giovani da rimonta dall'infezione.

A tale scopo vengono di seguito elencate le principali misure da intraprendere:

- utilizzare in modo programmato i test sierologici, a tappeto oppure in modo mirato agli animali con peggior stato di nutrizione, con successiva eliminazione degli animali positivi. Questo permette una riduzione delle fonti di infezione e quindi accelera il controllo dell'infezione;
- separare, ove possibile (allevamento da latte), la prole dalla madre immediatamente dopo il parto, evitando la suzione diretta alla mammella; in alternativa (allevamento da carne), dedicare zone separate al parto degli animali positivi e negativi, programmando controlli diagnostici alla messa in asciutta;
- trattare termicamente il colostro a temperatura di 56-59 °C per 60 minuti; tali temperature non possono essere superate per il rischio di coagulazione/gelificazione del colostro e denaturazione degli anticorpi e, nonostante non siano in grado di assicurare la completa distruzione di Map, riducono sensibilmente il rischio di contaminazione;
- pastorizzare il latte di scarto o utilizzare sostituti del latte;
- allevare gli animali giovani da rimonta in settori separati rispetto agli adulti il più a lungo possibile, preferibilmente fino al primo parto, evitando anche il pascolo promiscuo dei giovani con animali adulti;
- ridurre il più possibile la contaminazione fecale di alimenti ed acqua di abbeverata, garantendo un buon standard igienico all'allevamento.
- considerare il rischio associato al pascolo ed alla presenza di pozze di abbeverata, facilmente contaminati da feci infette. A tale scopo effettuare una idonea rotazione dei pascoli, con sospensione dell'utilizzo per almeno un anno dalla contaminazione, e recintare le pozze di abbeverata, fornendo acqua pulita attraverso punti di abbeveraggio controllati.

Non essendo disponibili strumenti *ad hoc* per l'allevamento ovi-caprino, possono essere utilizzati i manuali per la valutazione del rischio e le linee guida tracciati per l'allevamento bovino, disponibili sul sito del Centro di referenza Nazionale per la Paratuberculosis, IZSLER Piacenza ([www.izsler.it](http://www.izsler.it)), rispettivamente disegnati per l'allevamento da latte e da carne.

In alcuni paesi europei ed extraeuropei, quali la Spagna, la Norvegia, l'Olanda e l'Australia, la vaccinazione è consentita ed utilizzata routinariamente per il controllo della paratuberculosis ovi-caprina<sup>29</sup>.

Il vaccino è in grado di ridurre l'incidenza delle forme cliniche, diminuire drasticamente l'eliminazione di micobatteri<sup>29</sup>, ma non impedisce l'infezione ed inoltre può causare lesioni al punto di inoculo, anche in caso di inoculazione accidentale da parte dell'operatore. Al momento non esistono vaccini registrati in Italia per la paratuberculosis, in relazione alla possibile interferenza con i piani di controllo della tubercolosi, in particolare nei bovini e nei caprini.

**Conclusioni** - L'allevamento ovi-caprino è costituito da realtà diverse, che vanno dall'allevamento da compagnia a quello industriale.

Per questa ragione il veterinario aziendale, oltre ad avere le competenze necessarie a formulare una diagnosi corretta, deve avere flessibilità nel formulare un piano di gestione sanitaria che tenga conto sia degli obiettivi dell'allevatore che delle risorse disponibili, in termini di strutture e personale, utilizzando indicatori idonei a monitorarne l'efficacia.

Nella presentazione della problematica non bisogna trascurare gli aspetti emozionali e finanziari, ed è opportuno rassicurare gli allevatori sul fatto che la malattia può essere controllata, purché vengano adottate opportune strategie gestionali.

Tali strategie devono essere sempre conseguenti ad una opportuna valutazione del rischio, che tenga in considerazione tutte le varie fasi dell'allevamento, e devono conseguentemente includere le principali misure gestionali necessarie a evitare la introduzione/reintroduzione dell'infezione e la sua diffusione in allevamento.

## ■ Paratuberculosis in sheep and goat: diagnostic approach and control

**Key words:** Paratuberculosis, sheep, goat, diagnosis, control.

## Bibliografia

1. Feller M., Huwiler K., Stephan R., Altpeter E., Shang A., Furrer H., Pfyffer G.E., Jemmi T., Baumgartner A., Egger M. (2007) Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis and Crohn's disease: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 7: 607-13.
2. Chiodini R.J., Chamberlin W.M., Sarosiek J., McCallum R.W. (2012) Crohn's disease and the mycobacterioses: a quarter century later. Causation or simple association? *Crit Rev Microbiol*, 38 (1): 52-93.
3. Paccagnini D., Sieswerda L., Rosu V., Masala S., Pacifico A., Gazuoli M., Ikonomopoulos J., Ahmed N., Paratuberculosis Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's Disease and John's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities. *Journal of Clinical Microbiology*; 3883-3890.
4. Rosu V., Ahmed N., Paccagnini D., Gerlach G., Fadda G., Hasnain S.E., Zanetti S., Sechi L.A. (2009) - Specific Immunoassays Confirm Association of Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis with Type-1 but Type-2 Diabetes Mellitus. *Plos One*, vol. 4, issue 2.
5. Scanu A.M., Bull T.J., Cannas S., Sanderson J.D., Sechi L.A., Dettori G., Zanetti S., Hermon-Taylor J. (2007) Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis Infection in Cases of Irritable Bowel Syndrome and Comparison with Crohn's Disease and John's Disease: Common Neural and Immune Pathogenicities. *Journal of Clinical Microbiology*; 3883-3890.
6. Cossu D., Cocco E., Paccagnini D., Masala S., Ahmed N., Frau J., Marrosu M.G., Sechi L. (2011) Association of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis with Multiple Sclerosis in Sardinian Patients. *PlosOne*, vol.6.
7. Chiodini R.J., Van Kruiningen H.J., Merkal R.S. (1984) Ruminant paratuberculosis (John's disease): the current status and future prospects. *Cornell Veterinarian*, 74: 218-262.
8. Nielsen S.S., Toft N. (2009) A review of prevalences of paratuberculosis in farmed animals in Europe. *Preventive Veterinary Medicine*, 88: 1-14.
9. Bannantine, J.P., Wu, C.W., Hsu, C., Zhou, S., Schwartz, D.C., Bayles, D.O., Paustian, M.L., Alt, D.P., Sreevatsan, S., Kapur, V. and Talaat A.M. (2012) Genome sequencing of ovine isolates of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis offers insights into host association. *BMC Genomics*, 13: 89.
10. Marsh, I.B., Bannantine, J.P., Paustian, M.L., Tizard, M.L., Kapur, V., and Whittington, R.J. (2006). Genomic comparison of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis sheep and cattle strains by microarray hybridization. *J Bacteriol*, 188: 2290-2293.
11. Castellanos, E., Aranaz, A., Gould, K.A., Linedale, R., Stevenson, K., Alvarez, J., Dominguez, L., de Juan, L., Hinds, J., and Bull, T.J. (2009b). Discovery of stable and variable differences in the Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis type I, II, and III genomes by pan-genome microarray analysis. *Appl Environ Microbiol*, 75: 676-686.
12. Dohmann, K., Strommenger, B., Stevenson, K., de Juan, L., Stratmann, J., Kapur, V., Bull, T.J., and Gerlach, G.F. (2003). Characterization of genetic differences between Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis type I and type II isolates. *J Clin Microbiol*, 41: 5215-5223.
13. Hughes, V., Garcia-Sanchez, A., Smith, S., Mclean, K., Lainson, A., Nath, M., and Stevenson, K. (2012). Proteome-determined type-specific proteins of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis. *Vet Microbiol*, 158: 153-162.
14. Paustian, M.L., Zhu, X., Sreevatsan, S., Robbe-Austerman, S., Kapur, V., and Bannantine, J.P. (2008). Comparative genomic analysis of Mycobacterium avium subspecies obtained from multiple host species. *BMC Genomics*, 9: 135.
15. Stevenson, K., Alvarez, J., Bakker, D., Biet, F., de Juan, L., Denham, S., Dimareli, Z., Dohmann, K., Gerlach, G.F., Heron, I., Kopecna, M., May, L., Pavlik, I., Sharp, J.M., Thibault, V.C., Willemsen, P., Zadoks, R.N., and Greig, A. (2009). Occurrence of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis across host species and European countries with evidence for transmission between wildlife and domestic ruminants. *BMC Microbiol*, 9: 212.
16. Castellanos E., Aranaz A., de Juan L., Alvarez J., Rodríguez S., Romero B., Bezos J., Stevenson K., Mateos A. and Domínguez L. (2009a). Single nucleotide polymorphisms in the IS900 sequence of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis are strain type specific. *J Clin Microbiol*, 47: 2260-2264.
17. Griffiths T.A., Rioux K. and De Buck J. (2008). Sequence polymorphisms in a surface PPE protein distinguish types I, II, and III of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis. *J Clin Microbiol*, 46: 1207-1212.
18. Marsh I., Whittington R. and Cousins, D. (1999). PCR-restriction endonuclease analysis for identification and strain typing of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis and Mycobacterium avium subsp. avium based on polymorphisms in IS1311. *Mol Cell Probes*, 13: 115-126.
19. Collins D.M., De Zoete M. and Cavaignac S.M. (2002). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis strains from cattle and sheep can be distinguished by a PCR test based on a novel DNA sequence difference. *J Clin Microbiol*, 40: 4760-4762.
20. Robbe - Austerman S. (2011) Control of paratuberculosis in small ruminants. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(3): 609- 20.

21. Steward D.J., Vaughn J.A., Stiles P.L., Noske P.J., Tizard M.L., Prowse S.J., Michalski W.P., Butler K.L., Jones S.L. (2007) A long-term bacteriological and immuno-logical study in Holstein-Friesian cattle experimentally infected with *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* and necropsy culture results for Holstein-Friesian cattle, Merino sheep and Angora goats. *Vet Microbiol*, 122 (1-2): 83-96.
22. Stehman S.M., (1996) Paratuberculosis in small ruminants, deer, and South American camelids. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 12(2): 441-55.
23. Vialard J. (2003) La paratuberculosis nei piccoli ruminanti. *Summa. Animali da reddito*, 9: pp. 51-56.
24. Whitlock R.H., Buergelt C.D. (1996) Pre-clinical and clinical manifestations of paratuberculosis (including pathology). *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*, 12: 345-355.
25. Guarda F., Mandelli G. (2002) In: *Trattato di anatomia patologica*. ED UTET, Torino; 266-268.
26. Vialard J., Fleury C., Lacheretz A. (1994) Aspects anatomo-pathologiques de la paratuberculose caprine. *Recueil de Médecine Vétérinaire*, 170: 553 -558.
27. Farina R., Scatozza F. (1998) *Trattato di malattie infettive degli animali*, 2° edizione. UTET Torino, 318-322.
28. Nielsen S.S., Toft N., (2008) Ante mortem diagnosis of paratuberculosis: a review of accuracies of ELISA, interferon-gamma assay and faecal culture techniques. *Vet Microb*, 129 (3-4): 217-235.
29. Juste R.A., Perez V. (2011) Control of paratuberculosis in sheep and goats. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 27(1):127-38.

## Approccio diagnostico alle mastiti dell'ovino e del caprino



G. MAROGNA<sup>1</sup>, M.L. SCATASSA<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna

<sup>2</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia

**Parole chiave:** mastiti, piccoli ruminanti, clinica, laboratorio.

**INTRODUZIONE** - Negli ultimi anni la diagnosi delle mastiti dei piccoli ruminanti, come del resto la diagnosi di molte altre patologie riguardanti questi animali, si è arricchita di nuove, più specifiche e precise tecniche di laboratorio. Hanno infatti fatto il loro ingresso tutta una serie di prove dirette ed indirette che arricchiscono le possibilità diagnostiche (PCR, ELISA, immunoistochimica, sottopopolazioni linfocitarie, conta delle cellule somatiche ecc.). Nella pratica si constata come spesso il veterinario di campo si affidi esclusivamente ai laboratori per effettuare la diagnosi. Questo nuovo approccio sta comportando sia una mancanza di confronto fra il veterinario di campo e il veterinario responsabile della diagnosi in laboratorio, sia il parziale abbandono dell'esecuzione degli accertamenti anamnestici e clinici fondamentali per una corretta diagnosi e per i successivi eventuali piani di risanamento dell'allevamento. Il percorso sembra essersi semplificato e appiattito in una routine nella quale il veterinario di campo non fa altro che praticare dei prelievi sugli animali, inviarli al laboratorio e aspettare che, eseguiti gli opportuni accertamenti, quest'ultimo emetta un rapporto di prova con una diagnosi. Questa tendenza, a nostro avviso, deve essere modificata. Una diagnosi corretta, infatti, non è sempre conseguente al risultato degli esami di laboratorio ma è la risultanza critica di tutta una serie di accertamenti che devono essere effettuati prima e dopo l'invio dei campioni e che consentono di arrivare ad una ipotesi o a una conclusione razionale e motivata che diventa, appunto, una diagnosi corretta. Questo aspetto è tanto più importante quanto riferito alle problematiche sanitarie delle mastiti nei piccoli ruminanti. Il numero cospicuo degli agenti eziologici chiamati in causa, siano essi patogeni veri o ambientali e/o opportunisti, nonché il grande numero di fattori predisponenti l'insorgere della patologia (alimentazione, genetica, strutture aziendali, tecnica di mungitura, management ecc.), rendono in molti casi particolarmente difficile la diagnosi. Ed è proprio questa difficoltà che dovrebbe spingere verso esami e approfondimenti diagnostici diversificati e condivisi. Per avere più chiara quale è l'entità e l'importanza di queste patologie basterebbe ricordare che le mastiti infettive rappresentano la principale problematica sanitaria degli allevamenti di ovini da latte (Contreras et al., 2007; Conington et al., 2008) e che gli effetti negativi imputabili alle mastiti sono di natura economica, sanitaria e legale (Bergonier et al., 2003). Si è stimato che nei piccoli ruminanti l'incidenza annuale delle mastiti cliniche, in condizioni normali, sia al di sotto del 5%, mentre in greggi problema si possano registrare incidenze superiori al 30-50%, con mortalità o comunque riforma di capi che può raggiungere il 70% (Bergonier et al., 2003; Contreras et al., 2007). Nelle pecore e nelle capre le mastiti rappresentano la prima causa di scarto per motivi sanitari (Leitner et al. 2008; Malher et al. 2001, Bergonier et al., 2003). Si è stimato che gli effetti negativi delle mastiti sulla quantità e qualità del latte prodotto siano proporzionalmente superiori nei piccoli ruminanti rispetto a quelli riscontrati nei bovini (Leitner et al., 2004a). Numerosi autori hanno messo in evidenza significative riduzioni nella produzione del latte in soggetti con mammelle infette. Tali riduzioni variano in funzione del coinvolgimento di una o entrambe le emimammelle; con entrambe le emimammelle infette si sono registrati cali fino al 58% nella pecora e al 30% nella capra (Torres-Hernandez e Hohenboken, 1979; McCarthy et al., 1988; Gonzalo et al., 1994, 2002; Cucuru et al., 2002; Leitner et al., 2003, 2004a, 2004b). Per non parlare della mastite gangrenosa provocata dallo *Staphylococcus aureus* o della mastite causata da *Mycoplasma agalactiae* che possono provocare la completa scomparsa del latte. Altri lavori hanno evidenziato come la diminuzione delle produzioni e il deterioramento delle qualità nutrizionali del latte mastitico abbiano comportato un significativo calo degli incrementi ponderali e, più in generale, del corretto sviluppo degli agnelli (Robinson et al., 1969, Warren and Renbarger, 1963, citati da Torres-Hernandez e Hohenboken, 1979). Sono

state evidenziate alterazioni del comportamento di suzione degli agnelli (Gougoulis et al., 2008) e, nei casi più gravi, l'aumento della loro mortalità direttamente correlata alle mastiti delle madri (Watson and Buswell, 1984). Quanto sopra esposto chiarisce quale sia l'importanza di una corretta diagnosi quando si affronta il problema delle mastiti e quanto sia importante non sottovalutare ogni singolo aspetto che possa portare ad una diagnosi corretta nel più breve tempo possibile. Data la vastità dell'argomento, si è deciso di incentrare la presentazione su alcuni aspetti che riteniamo fondamentali come la corretta valutazione clinica degli animali sul campo (con particolare riguardo alla visita della mammella), le principali tecniche per il campionamento, prelievo, invio e conservazione dei campioni di latte e naturalmente per la "classica", diagnosi colturale che, malgrado l'avvento della PCR e altre metodiche, rimane a tutt'oggi la tecnica di diagnosi comunemente adottata nei nostri laboratori.

### MATERIALI E METODI

- **ANAMNESI e VISITA CLINICA** – Dall'esperienza maturata si ritiene estremamente importante predisporre e compilare una scheda anamnestica che possa riassumere i dati generali dell'allevamento quali: composizione del fondo agricolo, tipo di allevamento, tecnica di mungitura, consistenza del gregge, quantità di latte prodotto, recenti introduzioni di nuovi animali, interventi profilattici e terapeutici attuati e altre specie presenti in allevamento. Di seguito, una scheda clinica specifica per ogni singolo animale contenente identificazione, età, rilievi dell'esame obiettivo generale quali: stato del sensorio, stato di nutrizione mediante stima del Body Condition Score (BCS), alopecia, diarrea, temperatura rettale, pedaina, poliartrite, zoppia generica e cherato-congiuntivite. Da segnalare, sempre su questa scheda, eventuali trattamenti antibiotici praticati all'animale almeno durante l'ultima lattazione. Per quanto concerne l'esame clinico della mammella ricordiamo che le principali anomalie si apprezzano meglio a mammella munta e che le valutazioni, differenziate per emimammella, devono comprendere un esame ispettivo, la valutazione della consistenza della emimammella e dell'aspetto macroscopico del latte munto, l'esame dei linfonodi sopramammari e l'eventuale presenza di patologie come ad esempio la "lupia", una tipica mastopatia fibrocistica di riscontro relativamente frequente nei nostri allevamenti da latte. L'esame ispettivo deve valutare la presenza di pustole, croste, escrescenze cornee, ulcere, noduli, ascessi, *rubor*, *calor* e *dolor* (questi ultimi rispettivamente al termotatto e alla palpazione). La consistenza mammaria deve essere differenziata in: normale, edematosa, sclerotica e atrofica. L'aspetto macroscopico del latte deve essere differenziato in: normale, sieroso, emorragico, con pus, con frustoli o assenza anomala di secreto. La notevole mole di dati da raccogliere necessita di un sistema standardizzato per la registrazione ed archiviazione degli stessi.

- **CAMPIONAMENTO** – Per un corretto campionamento si dovrebbe tener conto della consistenza del gregge o di un gruppo di animali con specifiche caratteristiche. I capi campionati, infatti, devono essere sempre proporzionali e significativi della popolazione da analizzare; in proposito esistono delle apposite tabelle che aiutano i prelevatori indicando quanti animali siano rappresentativi di una data popolazione. Nella pratica di campo, in particolare nei prelievi per il rilievo di agenti eziologici responsabili di mastite, questo metodo è spesso disatteso. Comunemente arrivano in laboratorio 1-3 provette di latte anche se provenienti da greggi con più di 500 capi in lattazione. In questi casi il rischio di formulare diagnosi discutibili è alto. A tal proposito, in diversi greggi, abbiamo eseguito indagini sperimentali con prelievo di latte da tutti i capi in lattazione e i risultati hanno mostrato una grande eterogeneità dell'esito analitico (Scatassa et al., 2008). All'interno di un singolo gregge possiamo isolare germi diversi e a quel punto può diventare difficile individuare il bersaglio principale delle nostre cure; un campionamento limitato, infatti, non fornisce un quadro d'insieme e spesso impedisce di trovare il patogeno principale. All'interno di una stessa specie batterica si può notare,

eseguendo antibiogrammi sistematici su tutti i ceppi isolati, una notevole eterogeneità. Di conseguenza basarsi su un unico antibiogramma come si fa routinariamente, non permette di individuare l'antibiotico più adatto alla terapia. Pertanto, un corretto campionamento deve essere mirato, proporzionato e concordato con il laboratorio di analisi per poter ridurre gli errori diagnostici.

• **PRELIEVO DI LATTE** – Punto critico da non sottovalutare. La maggior parte delle diagnosi di laboratorio che si rivelano inutili nella pratica sono tali perché all'origine c'è stato un inquinamento al momento del prelievo. Sappiamo tutti che i prelievi di latte devono essere effettuati nelle condizioni più igieniche possibili, e che fra condizioni igieniche buone e ambiente sterile, la differenza è grande. In considerazione delle condizioni nelle quali spesso si è "costretti" ad operare l'inquinamento del campione, perlomeno con la tecnica di uso comune, è relativamente frequente. Per evitare il rischio di un potenziale inquinamento, è necessario adottare tutta una serie di accorgimenti per ottenere le migliori condizioni igieniche. In pratica rischia di essere inutile un prelievo eseguito in un ambiente con correnti d'aria, circondato da polveri e/o con mammelle sporche di fango o feci. La tecnica di base per un corretto prelievo di latte prevede la pulizia del capezzolo con un disinfettante (va bene anche Alcool etilico 90° denaturato) e l'eliminazione dei primi getti. Alcuni autori a questo punto consigliano una seconda disinfezione del capezzolo anche se, dalla nostra esperienza, non si evincono grandi differenze se la prima disinfezione viene condotta con la giusta perizia. Si dovrebbe avere l'accortezza di tenere il tappo vicino alla bocca della provetta, mantenendolo di fianco, evitando di toccarlo in prossimità del bordo di chiusura e chiudendo il contenitore il più rapidamente possibile. La provetta aperta non deve essere posizionata sotto la mammella ma al suo fianco; è il capezzolo che deve essere indirizzato verso il contenitore sterile e non il contrario. Per fare un esame colturale bastano pochi µl di latte, è quindi inutile prelevarne molto così facendo si aumenta solo la possibilità di inquinare il campione. Tutte queste attenzioni dovrebbero metterci nella condizione di evitare, per quanto possibile, l'inquinamento dei campioni.

• **CONSERVAZIONE E TRASPORTO** - Il campione raccolto deve essere prontamente refrigerato e deve arrivare al laboratorio nel più breve tempo possibile. Non bisogna mai sottovalutare questo aspetto. In molti casi la scelta se effettuare una terapia o una vaccinazione origina dalla valutazione quantitativa dei microrganismi e, siccome il latte è un ottimo terreno colturale, più la temperatura è alta, più tempo passa prima dell'analisi e più le eventuali popolazioni presenti si moltiplicano. In laboratorio poi, si possono adottare tecniche diverse a seconda dei casi e degli orientamenti diagnostici si semina a fresco, oppure con la tecnica del congelamento/scongelo (per "liberare" gli intracellulari) oppure, in apparente contraddizione rispetto a quanto prima affermato, si usa un arricchimento. Per fare un esempio pratico, se ipotizziamo di seminare dei campioni di latte correttamente conservati e trasportati e riscontrassimo la crescita di una singola colonia di *Staphylococcus epidermidis*, questo riscontro ci indurrebbe una risposta proporzionale, cioè nessuna terapia o vaccinazione; mentre, se lasciassimo a temperatura ambiente gli stessi campioni per diverse ore, troveremmo un tappeto di colonie al posto della singola colonia e questo indurrebbe una diversa strategia. In realtà quello che è cambiato è solo il contenuto quantitativo dei germi nella provetta e non lo stato sanitario delle pecore.

• **ESAME COLTURALE** - L'esame colturale routinario prevede l'inoculo di 10 µl di latte in piastre o brodi con uno o più terreni di coltura. Normalmente, in assenza di indirizzo diagnostico chiaro, si seminano diversi terreni: un terreno nutritivo e differenziale come l'agar sangue per l'isolamento della maggior parte dei microrganismi mastidogeni, un terreno selettivo per Gram negativi come ad. es. l'agar MacConkey, l'agar Sabouraud per verificare la crescita di miceti e l'Hayflick agar per l'isolamento dei micoplasmi. Naturalmente la collaborazione fra veterinario di campo e di laboratorio può semplificare e velocizzare la diagnosi. Se anamnesi e visite cliniche consentono la formulazione di una valida ipotesi diagnostica, la loro conoscenza potrebbe essere di grande utilità per il laboratorio e per l'efficacia dell'esito. Quello che purtroppo si osserva di frequente è il contrario, cioè l'invio del campione in laboratorio senza alcuna indicazione.

**DISCUSSIONE e CONCLUSIONI** - La netta separazione degli incarichi fra veterinari di campo e analisti di laboratorio, nonché la consuetudine di affidarsi sempre più al risultato analitico per la formulazione della diagnosi, sta comportando il parziale abbandono di alcuni approfondimenti anamnestici e clinici a discapito di diagnosi corrette e della rapidità di intervento che spesso sono condizioni inderogabili per riuscire ad arginare e quindi eradicare problematiche sanitarie come le mastiti dei

piccoli ruminanti. In sintesi si intende sottolineare che la risoluzione della maggior parte dei problemi legati alla diagnosi di queste malattie passa attraverso la collaborazione fra colleghi e l'attenta esecuzione di semplici attività considerate da alcuni, a torto, obsolete ed inutili. Negli ultimi anni sono state pubblicate indagini sulle pecore e sulle capre (Marogna et al., 2010, 2011) che hanno messo in risalto le correlazioni esistenti fra anamnesi, management, esami clinici e batteriologici e soluzione del problema mastite. Fare tesoro di queste conoscenze può consentire un approccio più corretto alla diagnosi delle mastiti negli ovini e nei caprini con soddisfazione reciproca delle varie anime del comparto.

## ■ Diagnostic approach to ewe and goat mastitis

**Key words:** mastitis, small ruminants, clinical examination, laboratory.

## Bibliografia

- Bergonier D., De Crémoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. (2003), Mastitis of dairy small ruminants. *Veterinary Research*; 34: 689-716.
- Conington J., Cao G., Scott A., Bunger L. (2008), Breeding for resistance to mastitis in United Kingdom sheep, a review and economic appraisal. *Veterinary Record*, 162: 369-376.
- Contreras A., Sierra D., Corrales J.C., Marco J.C., Paape M.J., Gonzalo C. (2007), Mastitis in small ruminants. *Small Ruminant Research*; 68: 145-153.
- Cuccuru C., Preti C., Meloni M.G., Moroni P. (2002). Riduzione delle cellule somatiche nella specie ovina. *Obiettivi & Documenti Veterinari*; 23 (1): 21-26.
- Gonzalo C., Carriedo J.A., Baro J.A., Primitivo F.S. (1994). Factors influencing variation of test day milk yield somatic cell count, fat, and protein in dairy sheep. *Journal of Dairy Science*, 77: 1537-1542.
- Gonzalo C., Ariznabarreta A., Carriedo, J.A., Primitivo F.S., 2002, Mammary Pathogens and Their Relationship to Somatic Cell Count and Milk Yield Losses in Dairy Ewes. *Journal of Dairy Science* 85 (6): 1460-1467.
- Gougoulis D.A., Kyriazakis I., Papaioannou N., Papadopoulos E., Taitzoglou I.A., Fthenakis G.C. (2008), Subclinical mastitis changes the patterns of maternal-offspring behaviour in dairy sheep. *Veterinary Journal* (176): 378-384.
- Leitner G., Chaffer M., Caraso Y., Ezra E., Kababea D., Winkler M., Glickman A., Saran A. (2003). Udder infection and milk somatic cell count, NAGase activity and milk composition – fat, protein and lactose – in Israeli-Assaf and Awassi sheep. *Small Ruminant Research*; 49: 157-164.
- Leitner G., Chaffer M., Shamay A., Shapiro F., Merin U., Ezra E., Saran, A., and Silanikove, N. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in sheep. *Journal of Dairy Science*; 87: 46-52.
- Leitner G., Merin U., Silanikove, N. (2004). Changes in milk composition as affected by subclinical mastitis in goats. *Journal of Dairy Science*; 87: 1719-1726.
- Leitner G., Silanikove N., Merin U. (2008). Estimate of milk and curd yield loss of sheep and goats with intramammary infection and its relation to somatic cell count. *Small Ruminant Research* 74: 221-225.
- Malher X., Seegers H., Beaudou F. (2001) Culling and mortality in large dairy goat herds managed under intensive conditions in western France. *Livestock Production Science* 71: 75-86.
- Marogna G., Rolesu S., Lollai S., Tola S., Leori S.G. (2010) Clinical findings in sheep farms affected by recurrent bacterial mastitis. *Small Ruminant Research*; 88:119-125.
- Marogna G., Pilo C., Vidili A., Tola S., Schianchi G., Leori S.G. (2011). Comparison of clinical findings, microbiological results, and farming parameters in goat herds affected by recurrent infectious mastitis - *Small Ruminant Research*; 102:74-83.
- McCarthy F.D., Lindsey J.B., Gore M.T., Nottter D.R., (1988). Incidence and control of subclinical mastitis in intensively managed ewes. *Journal of Animal Science* (66): 2715-2721.
- Robinson J.J., Foster W. H., Forbes T. J. (1969). The estimation of the milk yield of a ewe from body weight data on the suckling lamb. *Journal of Agricultural Science, Cambridge* (72):103.
- Scatassa M.L., Guarneri G., Arcuri F., Carrozzo A., Ducato B. Caracappa S. (2008) Latte ovino: contenuto in cellule somatiche ed isolamenti batterici. *Atti Società Italiana scienze Veterinarie*, LXII, 471-472.
- Torres-Hernandez G. Hohenboken W. (1979). Genetic and environmental effects on milk production, milk composition and mastitis incidence in crossbred ewes. *Journal of Animal Science*;49: 410-417.
- Warren E.P., Rembarger (1963). Some factors affecting milk yield of ewes and growth of lambs. *Journal Animal Science*; 22: 866.
- Watson D.J., Buswell J.F. (1984). Modern aspects of sheep mastitis. *British Veterinary Journal*; 140: 529-534.

## Approccio diagnostico alle miasi dei piccoli ruminanti



A. SCALA, P. MULA

Settore Parassitologia e Malattie Parassitarie Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università di Sassari

**Parole chiave:** miasi, piccoli ruminanti, diagnosi.

**INTRODUZIONE** - Le miasi degli ovini e/o dei caprini sono patologie causate da larve di ditteri che possono parassitare vari distretti anatomici degli animali vivi colpiti. Esse, in base allo sviluppo e all'accrescimento della larva, possono essere definite obbligatorie, come nel caso degli estridi, o facoltative, quando causate da calliforidi e sarcofagidi. Tra le più importanti si annoverano: a) l'estrosi o miasi delle cavità nasali e seni frontali degli ovi-caprini da larve di *Oestrus ovis*; b) la miasi sottocutanea dei caprini da larve di *Przhevalskiana silenus*; c) la miasi cutanea degli ovini (blowfly strike) da larve di ditteri appartenenti alle famiglie dei Calliphoridae (*Lucilia* spp.) e Sarcophagidae (*Wohlfahrtia* spp.). Obiettivo della presente relazione è quello di analizzare i diversi metodi diagnostici disponibili per queste parassitosi e la loro applicabilità in funzione delle loro caratteristiche epidemiologiche. Gli approcci considerati sono quello clinico, parassitologico diretto e tramite tecniche di laboratorio e ne vengono considerati applicabilità e limiti.

**ESTROSI** - L'estrosi, miasi nasale o respiratoria, è una parassitosi indotta da larve di *Oestrus ovis*, dittero appartenente alla famiglia Oestridae, i cui stadi larvali vivono obbligatoriamente nelle cavità nasali e nei seni frontali degli ovi-caprini allevati soprattutto nelle regioni caratterizzate da un clima temperato e caldo dell'emisfero nord (Dorchies e Alzieu, 1997; Martinez Cruz et al., 1999). Il ciclo di sviluppo della miasi è infatti correlato alla presenza di condizioni climatiche favorevoli. Nella cronobiologia si riconoscono quindi delle fasi più o meno costanti e distinte a seconda delle condizioni climatiche del territorio. Esse sono rappresentate dalla fase invernale, ove si può osservare rallentamento del ciclo sino alla diapausa delle larve di primo stadio a seconda della rigidità invernale; la fase primaverile-estiva, caratterizzata dallo sviluppo delle larve di secondo e terzo stadio; la fase espulsiva, tardo primaverile-estiva, quando l'ospite espelle le larve mature a cui segue lo sviluppo e l'attività degli insetti adulti. Le larve nelle cavità nasali e nei seni provocano lesioni e segni clinici anche severi, caratterizzati principalmente da difficoltà respiratorie e scolo nasale. Questi, sommati all'azione di disturbo sull'animale esercitata dagli insetti adulti, possono determinare riduzione delle performance produttive e quindi perdite economiche importanti (Dorchies et al., 1998, 2003). L'entità della malattia è in funzione di fattori diversi, alcuni di pertinenza del parassita, altri dell'ospite. Tra i primi l'intensità d'infestazione sembra essere importante ma non sempre è in relazione con l'entità dei sintomi, mentre il ceppo genetico del parassita sembra essere importante nel determinare quadri clinici diversi negli ovini o nei caprini. Nelle stesse regioni ovini e caprini sembrano infatti avere diversa suscettibilità, essendo i primi più frequentemente e intensamente infestati (Duranton e Dorchies, 1997; Papadopoulos et al., 2006). Nella stessa specie, soprattutto nell'ovino, è stata osservata una variabilità individuale che condiziona lo sviluppo della malattia in maniera indipendente rispetto alla carica infestante, probabilmente dovuta alla predisposizione genetica allo sviluppo di specifiche reazioni di ipersensibilità di tipo I (Angulo-Valadez et al., 2008). Oltre a questo si è visto come in animali giovani e debilitati la malattia si manifesta con maggiore gravità (Marchenko e Marchenko, 1991). Questi fattori sono quindi quelli che maggiormente rendono difficile la diagnosi a livello individuale. Nell'estrosi infatti la diagnosi certa può essere effettuata solo a livello autoptico con l'esame diretto delle cavità nasali e seni. In caso di animali morti con sintomatologia neurologica la ricerca delle larve dovrebbe interessare anche la cavità cranica. Nelle nostre esperienze il riscontro delle larve di secondo e terzo stadio risulta agevole all'esame macroscopico del setto, meati e cornetti nasali e del rinofaringe, mentre la loro localizzazione nei seni frontali e mascellari risulta ancora possibile ma più indaginoso. L'apertura di queste cavità dovrebbe prevedere infatti la loro completa visualizzazione e la minima alterazione delle superfici mucose. Questa pre-

cauzione è importante soprattutto per evidenziare le larve di primo stadio che richiedono sempre una maggiore attenzione nell'esame in quanto di ridotte dimensioni (1-2 mm). Queste risultano di più facile visualizzazione nelle parti della mucosa respiratoria prive di recessi e circonvoluzioni (setti, meati, ectoturbinati), mentre è più difficile individuarle tra le volute dell'etmoide, soprattutto in caso di presenza di catarro. Clinicamente sbruffi, starnuti e manifestazioni di irritabilità e nervosismo accompagnano rispettivamente l'espulsione delle larve di terzo stadio e la nuova infestazione. Il segno maggiormente costante dovuto alla presenza delle larve è comunque lo scolo nasale, da considerare in funzione della diagnosi differenziale verso altre affezioni respiratorie. Il rilievo di questi segni clinici nelle aree endemiche quando sono presenti in maniera eclatante, soprattutto nella tarda estate, è facilmente correlabile alla presenza della miasi nel gregge. La sintomatologia clinica spesso però fornisce poche indicazioni sulla presenza della miasi essendo anche correlata alla sensibilità individuale e alle complicazioni batteriche. Con un approccio "quantitativo" alcuni autori (Alzieu et al., 1995) hanno misurato l'entità del sintomo mediante l'assegnazione di un punteggio con numerazione da 1 a 5 in funzione della presenza di scolo sieroso, mucoso, purulento e difficoltà respiratorie. Quest'approccio è risultato valido come misura della remissione dei sintomi in seguito a trattamento terapeutico nei confronti di *O. ovis*, mentre a livello individuale non fornisce una misura della carica infestante. In alcuni nostri lavori (Mula et al., 2011, 2012) questo protocollo è stato modificato con l'aggiunta di punteggi intermedi in funzione dell'entità dello scolo. È stato visto come in un gregge infestato naturalmente esaminato in estate e che presentava bassi punteggi di score nasale le localizzazioni a livello dei seni frontali, seppur accompagnate da essudazione catarrale locale, erano poco evidenti come scolo nasale, mentre è stata vista una certa correlazione tra entità dello scolo e numero di larve di secondo stadio a livello etmoidale. In ogni caso la valutazione dello score dello scolo nasale è stata proposta per l'attuazione di trattamenti mirati selettivi su singoli capi nell'ambito del gregge interessato (Bath e van Wyk, 2009). La localizzazione sinusale è apparsa la più occulta a livello clinico. L'azione traumatica del movimento delle larve di primo stadio, dotate di spine sulla superficie ventrale della cuticola e i prodotti del metabolismo delle fasi di sviluppo (II e III stadio) evocano una risposta anticorpale, misurabile con la metodica Elisa. Nonostante non si disponga di tecniche standardizzate, in diversi protocolli sperimentali è stato impiegato l'antigene ottenuto sia da estratti delle ghiandole salivari delle larve che loro prodotti di secrezione/escrizione ottenuti in coltura (Tabouret et al., 2001, Scala et al., 2002, Alcaide et al., 2005; Suarez et al., 2005). La sensibilità della metodica appare buona, mentre la specificità ottimale si raggiunge quando viene usato per il test lo stesso stadio larvale presente negli animali testati (Alcaide et al., 2005). Con l'utilizzo di antigeni ottenuti da larve di II stadio i livelli di anticorpi della classe G appaiono più alti sia con il succedersi delle infestazioni, sia con lo sviluppo delle larve, mentre si abbassano nel periodo della diapausa (Suarez et al., 2005). Le IgM appaiono influenzate anche loro dallo sviluppo del parassita, ma durante la diapausa mantengono livelli più elevati rispetto alle IgG (Suarez et al., 2005). Romero et al. (2009) hanno rilevato come l'evidenziazione della riduzione della sieroprevalenza con l'utilizzo della metodica Elisa per le IgG e IgM può essere utilizzata per la valutazione dell'efficacia del trattamento terapeutico.

**MIASI SOTTOCUTANEA DEI CAPRINI** - L'infestazione è sostenuta da forme larvali di *Przhevalskiana silenus*. Otranto e Traversa (2004) hanno evidenziato attraverso studi molecolari come questa sia l'unica specie che comprende le altre fino ad allora prese in parallelo in considerazione (*P. aegagri* e *P. crossii*). *P. silenus* appartiene alla famiglia Oestridae ed è in grado di determinare importanti perdite economiche in seno agli allevamenti caprini colpiti (Papadopoulos et al., 1996). Il ciclo en-

dogeno si svolge obbligatoriamente e interamente nel sottocute (Otranto e Puccini, 2000), venendo quindi meno le tappe esofagee e rachidiane evidenziate invece rispettivamente per *Hypoderma lineatum* e *H. bovis*, agenti della miiasi sottocutanea del bovino. Nel sottocute le larve in accrescimento provocano tumefazioni fino a circa 2 cm di diametro, localizzate prevalentemente nelle regioni dorso-lombari dei caprini infestati. In Italia le larve di primo stadio si riscontrano nel sottocute tra la fine di dicembre e l'inizio di febbraio, maturano successivamente a terzo stadio e da questo mese sino ad aprile abbandonano l'ospite attraverso l'ostio respiratorio cutaneo, che nel frattempo si è formato all'apice di detta tumefazione. Il parassita ha un comportamento marcatamente ospite-specifico riscontrandosi raramente nell'ovino e risulta diffuso in Asia e in molti paesi che si affacciano sul bacino del Mediterraneo (Grecia, Turchia, Albania, Israele, ecc.), dove è presente con prevalenze variabili dal 20 al 94% (Giangaspero, 1996); in Spagna risulta descritto solo l'insetto adulto (Zumpt, 1965). In Italia l'infestazione è stata rilevata per la prima volta nel 1950 in Sicilia, mentre le successive segnalazioni ufficiali si sono avute solo dopo circa 30 anni con Pugliese e Zanchi (1984), che rilevano la miiasi sottocutanea in gruppi di capre originarie della Sicilia, Calabria e Puglia. Dopo di che la parassitosi veniva riscontrata con una certa continuità proprio in questi distretti: nell'Italia sud-orientale, in percentuali variabili dal 20 al 29%; in alcune greggi del Gargano, dove però stavolta l'infestazione arrivava ad interessare anche l'80% dei capi; in Calabria, dove la miiasi veniva rilevata con prevalenze nell'ambito delle singole greggi anche del 95% (Otranto e Puccini, 2000). In Sardegna le larve di *P. silenus* nelle greggi sono state rilevate dal 9,6% al 79,4% delle capre presenti, con cariche parassitarie variabili sino a 27 larve/capra (Scala et al., 1999). I sintomi talvolta possono essere poco appariscenti nelle infestazioni pauciparassitarie, mentre in quelle massive, le capre colpite sono irrequiete, diminuiscono le loro produzioni di latte e il peso corporeo (in 133 giorni medie ponderali inferiori di  $2,6 \pm 1,3$  Kg rispetto a capre non infestate (Liakos, 1986). La diagnosi clinica risulta agevole nel periodo dove sono evidenti i noduli. La miiasi evoca nelle capre una risposta immunitaria rilevabile anche con kit Elisa preparato con un antigene di *H. lineatum*. I più alti livelli di anticorpi sono stati rilevati a Ottobre, Novembre e Dicembre. Per la ormai confermata cross-reattività antigenica tra *H. lineatum* e *P. silenus*, e la semplicità e rapidità della tecnica, il kit ELISA può essere considerata a tutti gli effetti un valido strumento diagnostico (Otranto et al. 1999, Scala et al., 1999).

**LA MIASI CUTANEA DEGLI OVINI (BLOWFLY STRIKE)** - Le miiasi cutanee sono infestazioni parassitarie del mantello dermo-epidermico dell'ospite, talvolta del sottocutaneo, con possibilità, per qualche specie, di addentrarsi nei tessuti profondi. Le specie responsabili sono del genere *Lucilia* e *Calliphora*, della famiglia delle Calliphoridae, agenti di miiasi facoltativa, e del genere *Wohlfahrtia*, della famiglia delle Sarcophagidae agente di miiasi obbligatoria. Queste possono infestare le ferite superficiali o profonde di origine traumatica (lacerazioni da filo spinato o cornate), o da interventi operatori (castrazione, sterilizzazione); sono di preferenza interessate le ferite secernenti o suppuranti. La miiasi traumatica da *W. magnifica* spesso evolve in forma severa; i siti di penetrazione delle larve sono le mucose esterne, specialmente quelle genitali, tanto nei maschi quanto nelle femmine. La specie *W. magnifica* è parassita obbligatoria e necessita dell'ospite per lo sviluppo delle larve che, per contro, non sono in grado di utilizzare al riguardo, i tessuti in disfacimento (carogne). *L. sericata* invece, è da considerarsi un parassita facoltativo in quanto può utilizzare nel proprio ciclo biologico, tanto i tessuti in disfacimento quanto ospiti viventi. L'epidemiologia di queste miiasi dipende da fattori che influiscono sulla prevalenza degli insetti nell'ambiente e dalla suscettibilità degli ospiti. Esse costituiscono un fattore sanitario veramente importante in alcune aree in cui l'allevamento ovino, è dato soprattutto da razze merinizzate, quale l'Australia o alcuni paesi dell'Europa del nord. In Europa, *W. magnifica* rappresenta un problema soprattutto per le razze ovine d'importazione come ad esempio la Merino, Romney, Polwarth e Corriedale che sono molto sensibili all'infestazione (Lehrer e Verstraeten, 1991; Farkas et al., 1997). In Italia i casi riportati da Giangaspero et al. (2011) evidenziavano come ormai le infestazioni da *W. magnifica* siano da considerarsi endemiche e probabilmente l'origine della miiasi sarebbe da ascrivere proprio all'importazione di animali delle razze maggiormente sensibili. Le localizzazioni più frequentemente osservate erano prepuzio, vulva, base della coda e perineo, anche se altri distretti erano coinvolti (es. canto mediale di uno o entrambi gli occhi). La diagnosi di miiasi cutanea nel gregge è agevole nelle fasi avanzate dell'infestazione e risulta precoce so-

lo quando l'infestazione è localizzata in distretti esaminabili ad un semplice rilievo esterno: talvolta il cattivo odore causato dalla alterazione dei tessuti provocata dalle larve è il primo segno rilevabile nelle infestazioni "nascoste", che possono essere accompagnate da manifestazioni di malessere degli animali. Alcuni autori australiani, per facilitare la diagnosi precoce hanno messo a punto, a livello sperimentale, un rilevatore elettronico di odori, in grado di discriminare l'odore delle infestazioni già nelle prime 24h, quando le conseguenze dell'infestazione sono ancora poco importanti (Cramp et al., 2009). L'identificazione degli insetti adulti eventualmente catturati è invece abbastanza indaginosa e può essere eseguita principalmente attraverso l'esame delle venature delle ali. La diagnosi definitiva può essere effettuata solamente dopo l'estrazione ed identificazione delle larve nelle ferite, sulle quali esse si dispongono a palizzata nello spessore della cute con gli spiracoli rivolti verso l'esterno. Si dovrebbero esaminare le estremità caudali delle larve di terzo stadio estratte dalle lesioni utilizzando le chiavi morfometriche dicotomiche disponibili in letteratura (Zumpt, 1965). Essendo spesso le ferite infestate soggette ad ulteriori attacchi da parte di altre miiasi secondarie, è buona norma prelevare diversi esemplari dalla ferita per identificare le specie presenti. Per *W. magnifica*, caratteristica distintiva è data dalla presenza di spiracoli posteriori localizzati profondamente dentro una cavità, mentre *L. sericata* si distingue per l'assenza di scleriti pigmentati accessori nello scheletro cefalo-faringeo.

## ■ Diagnostic approach to the myiasis in small ruminants

**Key words:** myiasis, small ruminants, diagnosis.

## Bibliografia

- Alcaide M., Reina D., Frontera E., Navarrete I. (2005), Analysis of larval antigens of *Oestrus ovis* for the diagnosis of oestrosis by enzyme-linked immunosorbent assay. *Med Vet. Entomol.*, 19(2): 151-7.
- Alzieu J.P., Dorchie P., Donat F., Chiaritoli O. (1995), Nuovi dati epidemiologici dell'estrosi ovina, prevenzione tramite il closantel. *Summa*, 19(6), 19-26.
- Angulo-Valadez C.E., Scala A., Grisez C., Prevot F., Bergeaud J.P., Carta A., Cepeda-Palacios R., Ascencio F., Terefe G., Dorchie Ph., Jacquiet, Ph. (2008), Specific IgG antibody responses in *Oestrus ovis* L. (Diptera:Oestridae) infected sheep: associations with intensity of infection and larval development. *Vet. Parasitol.*, 155, 257-263.
- Bath G.F., van Wyk J.A. (2009), The Five Point Check® for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 86 (1-3), 6-13.
- Cramp A.P., Sohn J.H., James P. J (2009), Detection of cutaneous myiasis in sheep using an 'electronic nose'. *Vet. Parasitol.*, 166, 293-298.
- Dorchie P., Alzieu J.P., (1997), L'Oestrose ovine: revue. *Revue Med. Vet.*, 148(7), 565-574.
- Dorchie P., Duranton C., Jacquiet, P. (1998). Pathophysiology of *Oestrus ovis* infection in sheep and goats: a review. *Vet. Rec.*, 142, 487-489.
- Dorchie P., Wahetra S., Lepetitcolin E., Prevot F., Grisez C., Bergeaud J.P., Hoste H., Jacquiet P. (2003), The relationship between nasal myiasis and the prevalence of enzootic nasal tumours and the effects of treatment of *Oestrus ovis* and milk production in dairy ewes of Roquefort cheese area. *Vet. Parasitol.*, 113, 169-174.
- Duranton, C., Dorchie, P. (1997), In vitro culture of *Oestrus ovis* (Linne 1761) first instar larvae: its application to antiparasitic drug screening. *Int. J. Parasitol.*, 27, 125-128.
- Farkas R., Hall M.J.R., Kelemen F. (1997), Wound myiasis of sheep in Hungary. *Vet. Parasitol.*, 69 (1-2), 133-144.
- Giangaspero A. (1996), Goat warble fly infestation. *Parassitologia*, 38, 397.
- Lehrer A.Z., Verstraeten C. (1991), Expansion parasitologique et géographique de *Wohlfahrtia magnifica* (Schiner) (Diptera: Sarcophagidae) en Roumanie. *Bull. Rech. Agric. Gembloux*, 26, 563-567.
- Giangaspero A., Traversa D., Trentini R., Scala A., Otranto D. (2011), Traumatic myiasis by *Wohlfahrtia magnifica* in Italy. *Veterinary Parasitology*, 175(1-2), 109-112.
- Liakos B.D. (1986), Consequences of hypodermosis to the body weight of young goat. *Bull. Hell. Vet. Soc.*, 37, 8-12.
- Marchenko V.A., Marchenko V.P. (1991), Kinetics of specific serum antibodies in sheep infested with *Oestrus ovis* larvae. *Parasitologia*, 25, 297-304.
- Martinez Cruz S., Moreno Montanez T., Becerra Martell C. (1999), Estrosis. In *Parasitologia Veterinaria*, Cordero del Campillo M., Rojo Vazquez F., McGraw-Hill-Interamericana de España, Aravaca (Madrid).
- Mula P., Carta A., Coronas G., Sechi S., Arias Vázquez M., Sánchez -Andrade R., Solinas C., Scala A. (2011), Preliminary study of IgM and IgG an-

- tibody response and nasal discharge score in a *Oestrus ovis* naturally infested flock of Sarda sheep. 19th Congress FeMeSPRum May 25-28, Belgrade, Serbia.
- Mula P., Sánchez-Andrade R., Arias M.S., Solinas C., Sanna G., Dore F., Pira M.G., Pipia A.P., Varcasia A. and Scala A. (2012), Anatomical distribution of *Oestrus ovis* instars, macroscopic lesions, nasal discharge and IgG immune response in a naturally infested flock of Sarda sheep. *Mappe Parassitologiche*, 18, 204.
- Otranto D., Boulard C., Giangaspero A., Caringella M.P., Rimmele D., Puccini V. (1999), Serodiagnosis of goat warble fly infestation by *Przhevalskiana silenus* with a commercial ELISA kit. *Veterinary Record*, 144(26), 726-729.
- Otranto D., Puccini V. (2000), Further evidence on the internal life cycle of *Przhevalskiana silenus* (Diptera, Oestridae). *Veterinary Parasitology*, 88, 321-328.
- Otranto D., Traversa D. (2004), Molecular evidence indicating that *Przhevalskiana silenus*, *P. aegagri* and *P. crossii* (Diptera, Oestridae) are one species. *Acta Parasitologica*, 49(2), 173-176.
- Papadopoulos E., Himonas C., Boulard C. (1996), The prevalence of goat hypodermosis in Greece. *Parassitologia*, 38: 405, 1996.
- Papadopoulos E., Prevot F., Diakou A., Dorchie Ph. (2006), Comparison of infection rates of *Oestrus ovis* between sheep and goats kept in mixed flocks. *Vet. Parasitol.*, 138, 382-383.
- Pugliese A., Zanchi R. (1984), Ipodermosi della capra. *Il Vergaro*, 7/8: 5-8.
- Scala A., Otranto D., Pintori A., Falchi B., Espa A. (1999), Miasi sottocutanea caprina in Italia: rilievi in Sardegna. 7<sup>a</sup> Congress of Mediterranean Federation for Health and Production of Ruminants, Santarem (Portogallo), 457-460.
- Scala A., Paz-Silva A., Suárez J.L., López C., Díaz P., Díez-Baños P., Sánchez-Andrade, Fernández R. (2002), Chronobiology of *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae) in Sardinia, Italy: guidelines to chemoprophylaxis. *J. Med. Entomol.*, 39, 652-657.
- Sotiraki S., Hall M.J.R. (2012) A review of comparative aspects of myiasis in goats and sheep in Europe. *Small Ruminant Research*, 103, 75-83.
- Suárez J.L., Scala A., Romero J.A., Paz-Silva A., Pedreira J., Arias M., Díaz P., Morrondo P., Díez-Baños P., Sánchez-Andrade R. (2005), Analysis of the humoral immune response to *Oestrus ovis* in ovine. *Veterinary Parasitology*, 134, 153-158.
- Tabouret G., Prevot F., Bergeaud J.P., Dorchie P., Jacquiet P. (2001), *Oestrus ovis* (Diptera: Oestridae): sheep humoral immune response to purified excreted/secreted salivary gland 28 kDa antigen complex from second and third instar larvae. *Vet. Parasitol.*, 101(1), 53-66.
- Zumpt F. (1965), *Myiasis in Man and Animals in the Old World*. Butterworths, London, 225.

**Miglioramento genetico  
e controllo delle malattie**

## 3SR: Sustainable Solutions for Small Ruminants



A. CARTA<sup>1</sup>, S. CASU<sup>1</sup>, J.J. ARRANZ<sup>7</sup>, G. BANOS<sup>5</sup>, S. BISHOP<sup>3</sup>, L. BODIN<sup>2</sup>, N. COCKETT<sup>6</sup>, B. DALRYMPLE<sup>11</sup>, G. FTHENAKIS<sup>8</sup>, O. KEANE<sup>9</sup>, E. MARTYNIUK<sup>10</sup>, C. MORENO<sup>2</sup>, R. RUPP<sup>2</sup>, A. STELLA<sup>4</sup>, S.H. ZHAO<sup>12</sup>, H. JONES<sup>13</sup>

<sup>1</sup> AGRIS-Sardegna, Italy; <sup>2</sup> Institut National de la Recherche Agronomique, France

<sup>3</sup> University of Edinburgh, United Kingdom; <sup>4</sup> Parco Tecnologico Padano, Italy

<sup>5</sup> Aristotle University of Thessaloniki, Greece; <sup>6</sup> Utah State University, USA; <sup>7</sup> Universidad de Leon, Spain

<sup>8</sup> University of Thessaly, Greece; <sup>9</sup> Teagasc, Ireland; <sup>10</sup> Warsaw University of Life Sciences, Poland

<sup>11</sup> Commonwealth Scientific and Industrial Research Organisation, Australia

<sup>12</sup> Huazhong Agricultural University, People's Republic of China

<sup>13</sup> Biosciences Knowledge Transfer Network, United Kingdom

**Parole chiave:** resistenza genetica, SNP, mastiti, nematodi gastrointestinali, paratubercolosi.

**INTRODUZIONE** - 3SR è un progetto finanziato dalla UE nell'ambito del 7<sup>o</sup> FP che coinvolge un forte ed esclusivo consorzio internazionale di 14 partners per contribuire, attraverso le informazioni genomiche sugli ovini e caprini, alla comprensione delle basi genetiche dei caratteri che stanno alla base di una produzione sostenibile e della sanità degli animali e dei prodotti da essi derivati e fornire strumenti per il loro miglioramento. I caratteri oggetto di studio sono la suscettibilità/resistenza alle mastiti, ai nematodi e alla paratubercolosi, patologie di grande impatto sulle popolazioni ovine e caprine europee per i costi dei trattamenti farmacologici, la riduzione delle performances e i possibili effetti negativi sulla qualità igienico-sanitaria delle produzioni. L'altro carattere studiato è il tasso di ovulazione negli ovini, uno dei fattori di maggior importanza per la redditività dell'allevamento da carne. Obiettivo finale è quello di identificare dei marcatori genetici (o i geni stessi) che possano essere utilizzati nella selezione al fine di migliorare la sanità e il benessere animale concorrendo a incrementare la competitività delle filiere produttive dei piccoli ruminanti in Europa. Nel progetto vengono applicate le ultime tecnologie di genomica "high-throughput", la genomica comparata e quella funzionale, combinate con il sequenziamento del genoma al fine non solo di identificare le componenti genetiche che controllano questi caratteri ma di sviluppare strumenti e risorse per le future ricerche di genomica nei piccoli ruminanti. Il progetto ha stretti legami sia con l'International Sheep Genome Consortium e l'International Goat Genome Consortium, che si occupano rispettivamente dello studio del genoma degli ovini e dei caprini, che con altri progetti internazionali quali Quantomics. Il progetto prevede l'utilizzo di popolazioni e basi sperimentali già a disposizione dei partner per scoprire e validare poi nelle popolazioni commerciali i marcatori genetici (o le mutazioni causative) di interesse. La principale attività di 3SR si è concentrata sugli ovini, dei quali si riferisce in questa sede, ma nel progetto sono incluse attività di ricerca sulla capra i cui risultati si avvantaggeranno di un'analisi comparata con quelli dell'altra specie.

**MATERIALI e METODI** - Il progetto coinvolge 29 popolazioni ovine e più di 15000 animali sui quali sono stati misurati i diversi caratteri di interesse. Circa 8000 tra questi sono stati genotipizzati con l'Illumina<sup>®</sup> Ovine 50SNP BeadChip. Per quanto riguarda la ricerca di regioni cromosomiche (QTL) associate alla resistenza alle mastiti sono state attualmente analizzate 4 popolazioni sperimentali: 2375 pecore derivanti da successivi incroci di ritorno della razza Sarda su una popolazione backcross SardaxLacaune (S), 1630 pecore di razza Churra (CH), 1013 arieti e 334 pecore Lacaune (L). Il carattere comune analizzato è stato il contenuto in cellule somatiche del latte (CCS). Per la resistenza ai nematodi gastrointestinali sono invece state considerate oltre alla popolazione S, 752 ovini Blackface (BF) e circa 1000 agnelli Martinique Blackbelly x Romane. Il carattere comune analizzato è stato la conta in uova nelle feci (FEC), anche se altre misure sono disponibili per le diverse popolazioni (ematocrito, concentrazione di pepsinogeno, conta di eosino-

nofili, livelli di IgA). Infine la ricerca di QTL per la suscettibilità alla paratubercolosi ha interessato la popolazione S e l'analisi ha riguardato il risultato della sierologia.

**RISULTATI** - Le analisi statistiche, realizzate con diversi metodi (LA, LDLA, LD) hanno portato ad identificare più di 30 regioni cromosomiche associate con la variabilità del CCS nelle diverse popolazioni delle quali 3 (OAR3, 14 e 20) comuni. Per la resistenza ai nematodi invece sono state identificate (con diversi caratteri e metodi) 36, 14 e 37 associazioni significative nella popolazione S, MBR e BF rispettivamente. Tra queste, particolarmente significativa e ben localizzata risulta quella su OAR12 in MBR. Le prime analisi per la resistenza alla paratubercolosi hanno identificato numerosi QTL in 17 cromosomi, i più significativi dei quali su OAR20. Il passo successivo sarà identificare gruppi di animali (triplette) supposti portare, sulla base delle informazioni genotipiche e fenotipiche disponibili, il QTL allo stato eterozigote o omozigote e procedere al loro completo sequenziamento (12x) al fine di identificare altri polimorfismi più strettamente associati alla mutazione di interesse o la mutazione causativa stessa. I nuovi polimorfismi identificati verranno validati su popolazioni indipendenti. Ancora più incoraggianti risultati sono stati ottenuti nella ricerca di mutazioni associate al tasso di ovulazione in popolazioni in cui era nota a priori la segregazione di geni che influenzano questo carattere (Bodin et al., 2012). In particolare, nella popolazione Cambridge, sono state identificate due regioni (di 112kb e 1.2Mb) su OAR2 che ospitano probabilmente la mutazione causativa e che sono attualmente in via di sequenziamento. Concluso è invece il sequenziamento del gene BMP15 sul OARX, indicato come candidato dalle analisi di associazione nelle popolazioni Grivette e Olkuskka. In entrambe due mutazioni non conservative (T317I in Grivette and N337H in Olkuskka) sono già state identificate.

**CONCLUSIONI** - I risultati del progetto 3SR consentiranno una migliore comprensione dei meccanismi di controllo genetico dei processi che regolano la resistenza dell'ospite alle mastiti, ai nematodi e alla paratubercolosi, così come la definizione di un gruppo di marcatori che potranno essere di supporto agli allevatori nella selezione di animali con una maggiore resistenza genetica verso tali patologie. Simili risultati sono inoltre attesi per molti altri caratteri produttivi (quantità di latte, fertilità prolificità, accrescimenti), di qualità (tenori in grasso e proteina, composizione acidica del grasso del latte) o legati al contenimento dei costi di produzione (attitudine alla mungitura meccanica) che sono misurati sulle popolazioni sperimentali analizzate.

**Key words:** genetic resistance, paratuberculosis, mastitis, nematodes.

### Bibliografia

Bodin L., Demars J., Drobik W., Fabre S., Hanrahan J. P., Keane O., Martyniuk E., Mulsant P., Nowak Z., Persani L., Rossetti R., Sarry J. and G. Tosser-Klopp, 2012. Novel mutations controlling ovulation rate in sheep, 33rd ISAG Conference, Cairns, Australia.

# Selezione genetica per la riduzione del contenuto in cellule somatiche del latte ovino



V. RIGGIO

The Roslin Institute and R(D)SVS, University of Edinburgh, Easter Bush, Midlothian EH25 9RG, Scotland, UK; Dipartimento DEMETRA, Università di Palermo, Parco d'Orleans, 90128, Palermo, Italy

**Parole chiave:** mastiti, selezione genetica, conta di cellule somatiche, ovini.

La mastite è un'infiammazione della mammella, di solito causata da patogeni. I micro-organismi causa di mastite sono principalmente batteri, quali *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp. o coliformi, come ad esempio *Escherichia coli* (Smith & Hogan, 2001), che possono essere classificati come maggiori (come *Streptococci* e *S. aureus*) e minori (come gli *Staphylococci* coagulase-negativi), in base alla severità dei segni clinici.

Le mastiti rappresentano una delle patologie più importanti negli allevamenti delle razze ovine da latte. Tale patologia infatti può comportare la quota più ingente delle perdite economiche, sia per i trattamenti che si rendono necessari sugli animali che per gli effetti che tale patologia ha sulla produzione quanti-qualitativa del latte.

La resistenza alle mastiti è un carattere complesso, influenzato sia da fattori genetici che ambientali. La selezione in favore di soggetti maggiormente resistenti alle mastiti può rappresentare un valido strumento di profilassi e di contenimento dei costi imputabili al controllo manageriale di tale patologia. La selezione può essere sia diretta che indiretta, a seconda del carattere per cui si seleziona (de Haas, 2003). Il metodo considerato più efficace è l'esame batteriologico, che è spesso usato come "golden standard" per i metodi indiretti. Tuttavia, l'esame batteriologico ha delle limitazioni poiché richiede il supporto di un laboratorio, per i tempi di attesa per la realizzazione delle colture e dei costi associati proprio all'esame batteriologico (McDougall et al., 2001). In alternativa all'esame batteriologico, sono stati sperimentati diversi metodi indiretti, per la diagnosi delle mastiti; tra questi metodi, quello maggiormente adoperato è la valutazione del contenuto in cellule somatiche nel latte (CCS). L'incremento delle cellule somatiche è infatti chiara indicazione di un'infezione a livello della mammella.

Il vantaggio di utilizzare il CCS sta nel fatto che è più semplice da misurare (viene routinariamente misurato durante i controlli funzionali) e ha un'ereditabilità più alta del carattere diretto (stato sanitario della mammella).

Benché nei bovini un CCS di 250-300 x 10<sup>3</sup> cellule/mL sia universalmente riconosciuto come valore soglia per distinguere individui sani da individui infetti, la situazione è diversa negli ovini. I valori riportati in bibliografia sono infatti poco coerenti. Alcuni autori (De la Cruz et al. 1994) hanno evidenziato che un valore soglia simile a quello usato nei bovini sia adeguato a distinguere individui infetti da individui sani. Altri autori, invece, hanno evidenziato che gli ovini, anche se sani, presentano un valore di CCS più alto di quello dei bovini (Fthenakis et al., 1991; González-Rodríguez et al., 1995), indicando la necessità di utilizzare valori soglia più elevati.

La bibliografia per gli ovini riporta valori di ereditabilità per SCS (somatic cell score, trasformazione logaritmica di CCS) compresi tra 0.04 e 0.16 utilizzando modelli test-day (Baro et al., 1994; Hamann et al., 2004) e tra 0.11 e 0.15 utilizzando modelli a lattazione (Bergonier et al., 2003). Ciò conferma che selezionare per ridurre SCS sia più conveniente che selezionare per il carattere mastite, caratterizzato da un valore di ereditabilità più basso (Riggio et al., 2010).

Nei programmi di selezione genetica, si assume che SCS sia correlato geneticamente in maniera lineare con la mastite o con gli altri caratteri produttivi. Ciò implica che CCS di individui sani e infetti seguano la stessa distribuzione. Nonostante ciò, è stato riportato che CCS (e pertanto SCS) di individui sani e infetti dovrebbero essere considerati come caratteri diversi (Detilleux & Leroy, 2000). È stato infatti dimostrato che CCS di individui sani e infetti hanno una distribuzione diversa sia nei bovini (ten Napel et al., 2009) che negli ovini (Riggio et al., 2010).

Riggio et al. (2010) hanno riportato che la correlazione genetica tra SCS in individui sani (negativi per la presenza di batteri nel latte) e lo stato sanitario della mammella nella razza ovina Valle del Belice è positiva e moderatamente alta (0.51). Precedentemente, Rupp et al. (2009) hanno mostrato, nella razza Lacaune, che animali con basso valore di SCS mostrano una più bassa incidenza di mastiti e una maggiore abilità a reagire alle infezioni intramammarie contratte durante la lattazione. Pertanto, benché i risultati sull'uso del SCS come indicatore di mastiti negli ovini siano controversi in bibliografia, e benché il management degli allevamenti ovini sia diverso da quello degli allevamenti bovini (caratterizzati da maggiore uniformità), sembra possibile concludere che la selezione per ridurre SCS può aiutare a ridurre l'incidenza di mastiti negli ovini.

Uno dei problemi per la messa a punto di un programma di selezione negli ovini è che, attualmente, la selezione è fatta principalmente entro allevamento e sulla base delle *performances* degli animali. In tale situazione, dato il basso valore di ereditabilità, è improbabile che la selezione per SCS come indicatore di mastite possa avere successo. Pertanto, sarebbe necessario garantire delle affidabili registrazioni delle genealogie e delle *performances* produttive e la messa a punto di uno schema piramidale di gestione delle popolazioni.

Un'alternativa potrebbe essere l'uso di marcatori genetici e selezione genomica per la resistenza alle mastiti. Attualmente la selezione genomica è principalmente utilizzata nei bovini, mentre ci sono notevoli limitazioni per il suo utilizzo negli ovini. Comunque, al giorno d'oggi, grazie alla diffusione dei chip di SNP, la ricerca si sta muovendo nella direzione della selezione genomica anche negli ovini.

## Genetic selection for reduced somatic cell count in sheep milk

**Key words:** mastitis, genetic selection, somatic cell count, sheep.

## Bibliografia

- Baro J.A., Carriedo J.A., San Primitivo F. (1994). Journal of Dairy Science, 77:2658-2662.
- Bergonier D., de Cremoux R., Rupp R., Lagriffoul G., Berthelot X. (2003). Veterinary Research, 34:689-716.
- De Haas Y. (2003). PhD Thesis. Wageningen University.
- De la Cruz M., Serrano E., Montoro V., Marco J., Romeo M., Baselga R., Albizu I., Amorena B. (1994). Small Ruminant Research, 14:175-180.
- Detilleux J., Leroy P.L. (2000). Journal of Dairy Science, 83:2341-2349.
- Fthenakis G.C., El-Masannat E.T.S., Booth J.M., Jones J.E.T. (1991). British Veterinary Journal, 147:575-581.
- González-Rodríguez M.C., Gonzalo C., San Primitivo F., Cármenes P. (1995). Journal of Dairy Science, 78:2753-2759.
- Hamann H., Horstick A., Wessels A., Distl O. (2004). Livestock Production Science, 87:153-160.
- McDougall S., Murdough P., Pankey W., Delaney C., Barlow J., Scruton D. (2001). Small Ruminant Research, 40:245-254.
- Riggio V., Portolano B., Bovenhuis H., Bishop S.C. (2010). Genetics Selection Evolution, 42:30.
- Rupp R., Bergonier D., Dion S., Hygonenq M.C., Aurel M.R., Robert-Granié C., Foucras G. (2009). Journal of Dairy Science, 92:1203-1219.
- Smith, K.L., Hogan, J.S. (2001). 2nd International Symposium on Mastitis and Milk Quality. 13-15 Settembre 2001. Vancouver.
- ten Napel J., de Haas Y., de Jong G., Lam J.G.M., Ouweltjes W., Windig J.J. (2009). Journal of Dairy Science, 92:1253-1264.

# Prospettive della selezione genetica per la resistenza alla scrapie nei caprini



C. LIGIOS<sup>1</sup>, M. MASIA<sup>1</sup>, S. SECHI<sup>2</sup>, A. CARTA<sup>2</sup>, M.G. CANCEDDA<sup>1</sup>, D. PINTUS<sup>1</sup>, C. CONTU<sup>1</sup>, C. MAESTRALE<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna - Sassari

<sup>2</sup> Settore Genetica e Biotecnologie, DIRPA, AGRIS Sardegna - Olmedo

**Parole chiave:** scrapie, capra, polimorfismo, selezione.

La Scrapie è una neuropatologia degenerativa ad esito fatale che colpisce la pecora, la capra ed il muflone ed appartiene alla famiglia delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE). Le TSE sono caratterizzate dall'accumulo nel tessuto nervoso (SNC), nel caso della scrapie anche nel tessuto linfatico (SRL), della forma patologica (PrP<sup>Sc</sup>) della proteina prionica cellulare (PrP<sup>C</sup>), presente nella membrana di molti tipi di cellule.

La suscettibilità, il periodo d'incubazione e la manifestazione clinica della malattia nell'ovino sono strettamente modulate dal gene che codifica per tale proteina (PRNP). In pecore di varie razze sono stati descritti numerosi polimorfismi con sostituzioni nucleotidiche ai codoni 112, 136, 137, 138, 141, 151, 154, 171, 176 e 211. Tra questi, le mutazioni ai codoni 136 (A-V), 154 (R-H) e 171 (Q-R-H) danno origine a differenti alleli che sono stati associati alla presenza/assenza di malattia.

Nella capra, nonostante la scrapie sia da tempo stata segnalata in questa specie in condizioni naturali in diverse parti del mondo, Italia compresa, le conoscenze relative ai fattori genetici capaci di modulare la sensibilità/resistenza alla malattia non sono paragonabili per quantità e significatività a quelle relative agli ovini.

Tuttavia, studi d'infezione sperimentale hanno permesso di ipotizzare che anche nella capra i periodi d'incubazione della malattia potrebbero essere controllati da alcuni polimorfismi del PRNP. L'Open Reading Frame (ORF) che codifica per la PrP ovina e caprina è per entrambe le specie di 256 codoni e la PrP matura è di 210 amminocidi con un peso molecolare di 33-35 kD, rivelando una elevata omologia (oltre il 90%) ed una conservazione genetica tra le due specie.

Nonostante questa omologia, per le capre, il carattere di suscettibilità/resistenza alla scrapie non sembra essere correlato agli stessi codoni che modulano la malattia nelle pecore. I polimorfismi del gene caprino sinora noti sono stati rilevati ai codoni: 21 (V-A), 23 (L-P), 37 (G-V), 49 (G-S), 102 (W-G), 110 (T-P), 127 (G-S), 133 (L-Q), 137 (M-I), 142 (I-T-M), 143 (H-R), 146 (N-S), 154 (R-H), 168 (P-Q), 211 (R-Q), 218 (I-L), 220 (Q-H), 222 (Q-K) e 240 (S-P).

Goldmann e collaboratori, nel 1996, per la prima volta hanno studiato l'associazione tra malattia e genotipo delle capre, mediante infezione sperimentale con differenti ceppi di scrapie (CH1641 e ME7) e con il ceppo della BSE. I dati ottenuti hanno rilevato l'associazione tra la mutazione al codone 142 (I-M), sia in forma omozigote che in quella eterozigote, e l'allungamento del tempo d'incubazione dell'infezione.

Nel 2002 Billinis *et al.*, con uno studio di campo, evidenziarono che le sostituzioni a carico dei codoni 143 e 154 potevano conferire protezione nelle capre riducendo il rischio di malattia. In Italia, Vaccari e collaboratori, nel 2006, in uno studio condotto su 100 capre provenienti da greggi infetti da scrapie, hanno rilevato una significativa associazione tra la mutazione al codone 222 e la resistenza alla malattia nonché l'effetto protettivo indotto dalle sostituzioni ai codoni 143 e 154. Tali risultati sono stati confermati da Acutis e colleghi (2006).

In Sardegna la variabilità genetica nelle capre è relativa ai codoni 37, 142, 143, 154, 168, 211, 222 e 240, inoltre è stato rilevato un nuovo dimorfismo (G145D), segnalato sinora solo in questa regione con una frequenza nella popolazione del 1,43% (Tabella 1). Degno di nota il fatto che tale dimorfismo (G145D) rimane sinora, dai dati a nostra disposizione, associato alle capre sane.

A questo proposito, interessanti risultati stanno scaturendo da un nostro studio, ancora in corso, nel quale capretti con differente genotipo sono stati inoculati oralmente con omogenato di cervello proveniente da pecore ARQ/ARQ<sub>wildtype</sub> affette da scrapie.

**Tabella 1** - Frequenza di alcuni dimorfismi del gene PRNP in un gruppo di 35 becchi appartenenti alla popolazione caprina della Sardegna.

Mutazione	G37V	H143R	G145D	R154H
Frequenza	12,86%	0%	1,43%	10%
Mutazione	P168Q	R211Q	Q222K	S240P
Frequenza	1,43%	1,43%	4,28%	45,71%

In questo studio tutti i caprini *wildtype* e quelli con una o due delle seguenti mutazioni: G37V, Q168Q e S240P, hanno manifestato clinicamente la scrapie dopo un periodo di incubazione medio rispettivamente di 712 (DS ± 84) e 726 (DS ± 40) giorni. Le capre con le mutazioni R154H e H154H si sono ammalate dopo un periodo di incubazione più lungo (1057 giorni, DS ± 72).

Di particolare interesse il fatto che una delle 3 capre Q211R-S240P e tutte quelle con Q211R, D145D e Q222K erano ancora sane a 1482 giorni post-infezione.

Una nostra indagine sulla frequenza dei vari alleli riscontrati nella popolazione caprina della Sardegna è stata effettuata sequenziando il gene PRNP di 35 becchi scelti a random. I risultati sono esposti nella Tabella 1. Da questi risultati si evidenzia che alcuni dei dimorfismi associati ad un più lungo tempo d'incubazione o alla resistenza alla scrapie (Q222K, G145D, Q211R e R154H) hanno una frequenza bassa.

**CONCLUSIONI** - Allo stato attuale delle conoscenze e sulla base d'infezioni sperimentali ancora in corso possiamo concludere che le varianti genetiche ai codoni 145, 154, 211 e 222 sono associate nella capra ad un più lungo periodo d'incubazione e, almeno per quello al codone 222, ad un rischio minore di scrapie. Resta da definire, ai fini di una concreta valutazione della fattibilità di un piano di selezione genetica per la resistenza alla scrapie, una più precisa frequenza di queste mutazioni nella popolazione caprina delle varie regioni.

## Outlooks of genetic selection for scrapie resistance in goats

**Key words:** scrapie, goat, polymorphism, selection.

## Bibliografia

- Acutis PL, et al. Genetic variability of the PRNP gene in goat breeds from Northern and Southern Italy (2008) *J Appl Microbiol.*
- Baylis, M., and W. Goldmann. The Genetics of scrapie in sheep and Goats (2004) *Curr. Mol. Med.* 4: 385-396.
- Billinis C, et al. Prion protein gene polymorphisms in natural goat scrapie (2002) *J Gen Virol.* 83:713-21.
- Goldmann, et al. Novel polymorphisms in the caprine PrP gene: a codon 142 mutation associated with scrapie incubation period (1996) *J Gen Virol* 77, 2885-2891.
- Vaccari G, et al. State-of-the-art review of goat TSE in the European Union, with special emphasis on PRNP genetics and epidemiology (2009) *Vet Res* 40(5):48.
- Vaccari G, et al. Identification of an allelic variant of the goat PrP gene associated with resistance to scrapie (2006) *J Gen Virol* 87:1395-1402.

# La selezione genetica per la scrapie a salvaguardia della biodiversità in Sicilia



M. VITALE, V. DI MARCO LO PRESTI

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia A. Mirri, Palermo

**Parole chiave:** selezione genetica, biodiversità, scrapie.

La scelta dei riproduttori tra i soggetti che mostrano le migliori performance fenotipiche in termini di produzioni (latte o carne), di salute (i più resistenti, i più grandi etc.) e morfologiche, operata da sempre dagli allevatori è già una forma di selezione genetica "empirica" che "accelera" un processo di "selezione naturale" per caratteri vantaggiosi che, nel corso dell'evoluzione, ha portato all'affermazione di quegli individui caratterizzati da elevate performance in termini di adattamento e capacità riproduttive. La scoperta dei meccanismi molecolari alla base dell'eredità genica ha identificato nel genotipo il responsabile di un determinato fenotipo. La possibilità di utilizzare la selezione genetica anche per ridurre la suscettibilità a malattie a carattere infettivo e diffusivo è un approccio sempre più auspicabile, soprattutto nell'era attuale, caratterizzata dalla possibilità di studi veloci sul patrimonio genetico degli individui, sull'espressione genica e sulle proteine (genomica, transcriptomica e proteomica). La resistenza o tolleranza genetica ad una determinata malattia è una caratteristica particolarmente ricercata quando si parla di razze zootecniche, perché la lotta contro le malattie infettive attraverso i farmaci o attraverso sostanze chimiche per il controllo dei vettori, ha sempre numerose controindicazioni quali:

- (1) possibile impatto ambientale o sugli alimenti,
- (2) costi eccessivi per i paesi poveri
- (3) sviluppo delle farmaco-resistenze nei patogeni.

La selezione genetica per la resistenza o la tolleranza ad una malattia dovrebbe tener conto anche dei fattori di adattabilità al proprio ambiente naturale di una razza indigena che ne aumenta la performance riproduttiva. Questo fattore è importantissimo e sconsiglia la sostituzione completa di una razza autoctona, con una razza esterna, non idonea all'ambiente, sottolineando l'importanza del mantenimento di una biodiversità genetica. È conveniente, procedere alla selezione di individui delle razze meglio adattate all'ambiente operando sulla selezione dei riproduttori interni, piuttosto che importare razze animali da aree geografiche diverse. I vantaggi di questa strategia sono notevoli perché la selezione all'interno della razza indigena ha effetti duraturi, riduce i costi e il numero di trattamenti terapeutici e aumenta la possibilità di un effetto ad ampio spettro (aumentata resistenza a più di una malattia). Alcune razze animali sembrano essere "naturalmente" più resistenti ad alcune malattie ma in molti casi mancano studi scientifici appropriati. La storia della scrapie sugli ovini è un esempio di applicazione pratica di selezione per la resistenza alla malattia associata ai polimorfismi di un solo gene e, contemporaneamente, con la scoperta dei casi atipici, anche degli imprevedibili "effetti collaterali" e della necessità di mantenere un patrimonio genetico diversificato, ovvero mantenere anche una biodiversità genomica. La Scrapie fa parte delle Encefalopatie Spongiformi Trasmissibili (TSE), patologie neurali caratterizzate da lungo periodo di incubazione e dalla degenerazione irreversibile delle cellule neuronali<sup>1</sup>. L'epidemia di BSE nei bovini e la correlazione alla variante della malattia di Creutzfeldt-Jakob nell'uomo, ha scatenato la grande Emergenza BSE con un enorme impatto sulla tematica della sicurezza alimentare e sull'economia nel settore zootecnico. Le prove sperimentali hanno dimostrato che anche gli ovini possono essere infettati dal ceppo bovino e il primo caso di BSE "naturale" in una capra è stato confermato ufficialmente il 28 gennaio 2005 in Francia. Per l'eradicazione del prione bovino, pericoloso per l'uomo, si deve considerare, quindi, la potenziale circolazione di questo negli allevamenti ovini e caprini, perché la sintomatologia, la trasmissibilità e la distribuzione dell'agente infettante sono identiche al ceppo scrapie. La resistenza alla scrapie negli ovini è associata alla presenza di alcuni aminoacidi alla posizione 136 (A/V), 154 (H/R) e 172 (Q/R) della proteina prionica. Anche nelle capre sono stati identificati diversi polimorfismi<sup>2</sup>. La scoperta delle cosiddette forme atipiche di scrapie, che presenta una loca-

**Tabella 1** - Le percentuali dei genotipi omozigoti ed eterozigoti con l'allele ARR delle due razze autoctone siciliane più rappresentative, ottenute su circa 1100 animali di entrambe le razze<sup>5</sup>.

Genotipi	Valle del Belice	Comisana
ARR/ARR	9,4	15,8
ARR/AHQ	3,8	2,1
ARR/ARH	0,2	1,5
ARR/ARQ	41	48
ARR/VRQ	1	2,9

lizzazione preferenziale a livello del cervello<sup>3</sup> e nelle quali l'allele ARR più resistente alla scrapie classica risulta più suscettibile ha portato a nuove considerazioni riguardo la selezione genetica. Il rischio che la selezione per la resistenza alla scrapie classica crei una pressione selettiva favorevole alla diffusione dei "ceppi atipici" e la presenza di razze ovine, con una bassa frequenza dell'allele di resistenza ARR, hanno portato i legislatori a valutare norme specifiche per la gestione alternativa della profilassi e del controllo delle TSE (Reg. CE 999/01 e successive modifiche). In Italia ad esempio le pecore di razza biellese hanno una percentuale di ARR inferiore all'8% nei riproduttori selezionati dagli allevatori<sup>4</sup>. Le indagini fatte sulle razze ovine autoctone siciliane *Comisana* e *Valle del Belice* hanno mostrato una buona percentuale dei genotipi contenenti l'allele di resistenza ARR (ved. Tab. 1).

In Sicilia sono stati registrati negli anni diversi focolai di scrapie negli ovini e nei caprini e considerando la lunga persistenza del prione nell'ambiente, l'attuazione della selezione genetica è auspicabile per la salvaguardia del patrimonio zootecnico.

## ■ Genetic Selection and biodiversity preservation

**SUMMARY** - The genetic selection for disease resistance is considered a good tool to control infectious disease particularly in developing countries to preserve breeds biodiversity since the indigenous animals are well adapted to the original environment. The application of genetic resistance selection for scrapie in sheep is a practical example of the many aspects to take in account in a plan for genetic selection. The presence of previously not identified strains (atypical) of the pathogen and the low presence of the resistance markers within an autochthon breed are aspects that need to be always evaluated to assure genomic biodiversity.

**Key words:** genetic selection, biodiversity, scrapie.

## Bibliografia

1. Prusiner S. B. (1991) Molecular biology of prion diseases. *Science*, 252:1515-1522.
2. Vaccari G., Di Bari M. A., Morelli L., Nonno R., Chiappini B., Antonucci G., Marcon S., Esposito E., Fazzi P., Palazzini N., Troiano P., Petrella A., Di Guardo G., Agrimi U. (2006) *J. Gen. Virol.*, 87: 1395-1402.
3. Lühken G., Buschmann A., Brandt H., Eiden M., Groschup M. J., Erhardt G. (2007) *Vet. Res.*, 38: 65-80.
4. Acutis PL, Sbaiz L, Verburg F, Riina MV, Ru G, Moda G, Caramelli M, Bossers A. *J Gen Virol.* 2004 Oct;85(Pt 10):3165-72.
5. Van Kaam J.B.C.H.M., Finocchiaro R., Vitale M., Pinelli F., Scimonelli M., Vitale F., Portolano B., Oltenacu P. A., Caracappa S. 2008-Ital. *J. Anim. Sci.* Vol. 7, 87-94.



**Le distomatosi  
dei piccoli ruminanti:  
realtà e strategie di controllo**

## Aggiornamenti sulla fasciolosi



M.T. MANFREDI, S.A. ZANZANI

Dipartimento di Scienze veterinarie e Sanità Pubblica; Università degli Studi di Milano

**Parole chiave:** elminti, *Fasciola hepatica*, epidemiologia, prevalenza.

**INTRODUZIONE** - La fasciolosi è una malattia parassitaria causata da trematodi digenei del genere *Fasciola* che comprende attualmente solo quattro specie valide, *F. hepatica*, *F. gigantica*, *F. nyanzae* e *F. jacksoni* (Mas-Coma et al. 2005). *F. hepatica* è tipica dei dotti biliari e vescicola biliare dei ruminanti specialmente pecora, capra, bovino e bufalo; infesta anche numerosi altri animali domestici (cavallo, asino, mulo, camelidi del Vecchio e Nuovo Mondo, suino) e selvatici (cervidi, pecore selvatiche, cinghiale, marsupiali, conigli, lepri, nutria). *F. gigantica* è riscontrata nei dotti biliari e vescicola biliare di erbivori domestici e selvatici in Africa e Asia, pecora, capra, bovino, bufalo, cammello, suini, cavalli, asini, grandi antilopi, cervidi, giraffe e zebre. *F. nyanzae* è presente nei dotti biliari esclusivamente di *Hippopotamus amphibius* in Africa, mentre *F. jacksoni* è stata riscontrata nel fegato degli elefanti asiatici in India, Burma, Sri Lanka e Indocina. *F. hepatica* e *F. gigantica* condividono lo stesso areale geografico, mentre *F. hepatica* risulta la più diffusa; ha, infatti, una distribuzione cosmopolita che si è conquistata al seguito dell'espansione delle popolazioni ospiti (bovidi selvatici e successivamente bovidi addomesticati) e all'adattamento agli ospiti intermedi presenti nelle terre colonizzate (Mas Coma et al. 2009). *F. hepatica* è un parassita storicamente conosciuto ma il primo riferimento preciso sembra essere quello di Jehan de la Brie (1379) che nel suo trattato *Le bon berger* metteva in guardia gli allevatori di pecore circa il rischio dei pascoli ricchi di ranuncolo giallo d'acqua e accennava al distoma epatico e alle lesioni associate a questo parassita. Nella storia di *Fasciola hepatica* un notevole contributo è stato quello del fisiologo italiano Gabuccini (1547) che ha descritto dei vermi nei vasi ematici di pecore e capre in grado di alimentarsi di sangue. Successivamente, un altro italiano, Francesco Redi, fisiologo alla corte di Firenze, ha pubblicato, per la prima volta, l'immagine del parassita e ha demolito l'ipotesi della generazione spontanea con la dimostrazione che il parassita deponeva uova (1668). Il ciclo di sviluppo è stato delineato però solo verso la fine del 1800 (Leukart, Thomas).

La fasciolosi è tra le più importanti infestazioni elmintiche degli animali al pascolo; colpisce il bovino con prevalenze dal 30 al 90% soprattutto nelle aree tropicali ma è molto più patogena nella pecora (Armour 1991). La capra appare avere una suscettibilità all'infestazione da *F. hepatica* simile a quella della pecora; entrambi non manifestano resistenza alle reinfestazioni (Giradi et al. 1979, Reddington et al. 1986). La fasciolosi costituisce un problema veterinario importante per le perdite produttive (carne, latte, lana) e quindi per le rilevanti ripercussioni economiche (Torgenson e Claxton 1999, Charlier et al. 2009). Fino al 1930 la fasciolosi era caratterizzata soprattutto dalla comparsa di gravi episodi di forme croniche; successivamente con l'aumentato uso di antielmintici queste sono diventate sempre meno frequenti e progressivamente sono state sostituite da forme subcliniche.

**Ciclo di sviluppo** - Gli adulti di *F. hepatica* si stabiliscono nei dotti biliari dei mammiferi ospiti in cui depongono le uova che giungono nell'intestino con la bile. Le uova, ovoidali, opercolate, di colore bruno-giallastro e con dimensioni di 130-150 x 63-90 µm, nell'acqua embrionano in 10-15 gg se la temperatura è di 23-25°C. Esse rimangono vitali per un lungo periodo, anche mesi, se il clima è abbastanza umido.

L'embrione, il miracidio, stimolato dalla luce produce un enzima di schiusa che attacca la sostanza cementante l'opercolo e una volta rilasciato dall'uovo nuota attivamente nell'acqua e prova ad infestare varie specie di molluschi della famiglia Lymnaeidae. Nel mollusco, in genere un polmonato, gli stadi larvali evolvono in circa 56-86 gg a 15°C passando dallo stadio di miracidio a quello di sporocisti, redia e cercaria. In condizioni ambientali avverse, quando il clima è particolarmente freddo, la redia può formare una seconda generazione di redie, esponendo la produzione di cercarie e aggiungendo ancora una altra gene-

razione larvale. La formazione di una seconda generazione di redie appare un ottimo escamotage per superare il periodo invernale (overwintering device). Le cercarie prodotte lasciano il mollusco in qualsiasi momento ma preferibilmente nelle ore serali o addirittura in quelle notturne. L'emissione delle cercarie avviene già a partire dal 38° g dall'infestazione a 25°C; dal 45° al 70° giorno se la temperatura varia da 16 a 22°C; dal 50° a 80° giorno a 22°C. Nei climi temperati, la massima emergenza di cercarie si ha in Agosto e Settembre, e molluschi contenenti cercarie sono stati trovati a Marzo, dimostrando che gli stadi larvali sopravvivono al clima dell'inverno. Le cercarie si incistano rapidamente sulla vegetazione acquatica o molte si depositano sul fondo dell'acqua. I mammiferi, uomo incluso, contraggono l'infestazione consumando vegetazione acquatica o bevendo acqua contaminata proveniente dall'habitat del mollusco.

Le metacercarie subito dopo l'ingestione schiudono nel piccolo intestino dell'ospite definitivo e i distomi immaturi raggiungono la capsula epatica attraverso la cavità addominale dopo la penetrazione della parete intestinale. Si reperiscono nella cavità addominale da 1 a 3 giorni dopo l'ingestione. Vagano intorno ai visceri e possono insediarsi in siti ectopici diversi dal fegato oppure se riescono a penetrare nei vasi sanguigni vengono trasportati anche in sedi molto distanti come nei linfonodi e nei polmoni.

Appena arrivati alla capsula epatica i giovani distomi invadono il parenchima epatico e migrano fino nei dotti biliari impiegando circa 6-8 settimane. Complessivamente il ciclo endogeno si compie nell'arco di 12 settimane sia nel bovino che nei piccoli ruminanti con la differenza che nel bovino il parassita adulto ha una vita media di circa un anno mentre nella pecora è in grado di sopravvivere diversi anni (Malek 1980).

**Epidemiologia** - La diffusione di *F. hepatica* è strettamente correlata a quella dei molluschi lymnaeidi che rappresentano gli ospiti intermedi e in particolare a quelli del genere *Galba*; *F. gigantica*, al contrario, segue la distribuzione dei molluschi del genere *Radix*. Tuttavia entrambi i parassiti sono in grado di adattarsi a diverse specie di lymnaeidi come dimostrano le segnalazioni in nuove aree. Attualmente l'areale distribuito di *F. hepatica* è quello in cui si riscontra *Galba truncatula* (in precedenza *Lymnaea truncatula*), vettore principale in Europa e *Pseudosuccinea columella*, vettore sussidiario nelle Americhe; è quindi presente nelle aree temperate e subtropicali quali Europa, Americhe (Nord, Centro e Sud), Asia centrale e settentrionale, Oceania, Africa (Nord, Sud e parte orientale), nelle grandi isole (Nuova Zelanda, Tasmania, Gran Bretagna, Islanda, Cipro, Corsica, Sardegna e Sicilia, Giappone, Papua Nuova Guinea, Filippine, isole dei Caraibi) (Mas-Coma 2009b).

*G. truncatula* è un mollusco polmonato d'acqua dolce che vive nelle acque dolci di laghi, stagni, paludi, piccoli corsi d'acqua e fossi dove lo si riscontra soprattutto in prossimità delle rive. È in grado di adattarsi a un limitato numero di ambienti in quanto il pH deve essere superiore a 5 nelle regioni con terreni acidi e l'acqua deve essere particolarmente dolce con meno di 5 mg<sup>l</sup><sup>-1</sup> di calcio disciolto. Le popolazioni di *G. truncatula* sono ritrovate su terreni pesanti la cui superficie è bagnata per la gran parte dell'anno ma la maggioranza degli habitat di questo mollusco sono concentrati in maniera irregolare nelle zone periferiche di un bacino idrografico o fonte d'acqua come all'estremità dei canali di drenaggio o delle risorgive. *G. truncatula* spesso colonizza i bordi dei fossi o altre aree paludose o fangose. In Europa occidentale il mollusco lo si trova in tutti quei siti umidi, instabili dal punto di vista ecologico e ricchi di alghe che vengono utilizzate come alimenti e privi di organismi antagonisti. Generalmente, gli habitat di *G. truncatula* vengono distinti in permanenti in quanto caratterizzati da una presenza d'acqua costante e habitat temporanei rappresentati da quei terreni impermeabili o che trattengono grandi quantità meteorica o di altra origine (es. prati irrigabili, marcite) consentendo il ciclo del mol-

lusco (Ambrosi 1995). Questi siti, nella maggior parte dei casi, sono colonizzati da diverse specie di piante come il gramignone natante (*Glyceria fluitans*) che vive sulle rive, gli alvei e negli ambienti umidi e la coda di topo ginocchiata (*Alopecurus geniculatus*), una pianta perenne che colonizza gli ambienti umidi. Recentemente è stata osservata una stretta associazione tra il giunco dai fiori acuti (*Juncus acutiflorus*) e la distribuzione del mollusco soprattutto a livello all'estremità dei canali di drenaggio (98% dei siti con presenza di *G. truncatula*) o delle risorgive (98,7%). Per altro, nelle aree colonizzate da questa specie di pianta si riscontrano le maggiori densità delle popolazioni del mollusco. Da questo studio risulta che *J. acutiflorus*, in suoli acidi, rappresenta un buon indicatore della presenza del mollusco nei prati e lungo le rive dei fossi in tutta l'Europa occidentale a condizione che l'equilibrio ecologico sia conservato; infatti, le modificazioni ambientali indotte dall'agricoltura intensiva alterano la distribuzione dei giunchi; in modo particolare, l'eccesso di nitrato induce clorosi in *J. acutiflorus* e quello di fosforo favorisce la diffusione di *J. effusus*.

Tali riscontri possono essere particolarmente utili per identificare i siti a rischio, soprattutto a livello della singola azienda e quindi prevenire l'infestazione da *Fasciola* negli ospiti definitivi impedendo loro l'accesso a queste aree o per esempio effettuando il controllo degli ospiti intermedi (mediante drenaggio o controllo biologico) (Rondeaud et al., 2011).

*G. truncatula* ha la capacità di adattarsi localmente e quindi nel suo ciclo di sviluppo si possono osservare differenze morfologiche e fisiologiche a seconda che i molluschi vivano in siti temporanei o permanenti; infatti, gli individui provenienti da siti temporanei raggiungono la maturità a una età maggiore, sono di dimensioni maggiori e meno fecondi rispetto ai molluschi che vivono in habitat permanenti (Chapuis et al 2007).

**La situazione in Italia** - Nel 2000 nell'ambito del progetto Giasone *F. hepatica* non era stata riscontrata in nessuno degli ovini testati mediante esami copromicroscopici mentre alla necropsia il 30% dei soggetti controllati albergava il parassita a livello epatico. Gli animali positivi provenivano da Campania, Calabria e Basilicata.

Negli ovini le prevalenze d'infestazione variano da 2,4-3 al 12% in soggetti provenienti dalla Campania e provincia di Latina (Garippa et al. 2008). In una indagine che ha coinvolto 3 regioni, Campania, Puglia e Basilicata, 8 su 197 aziende ovine (4,1%) sono risultate positive per *F. hepatica* e 133 (67,5%) per *D. dendriticum*. Solo il 2,3% dei campioni di feci ovine (pool) sono risultati positive per *F. hepatica*, e il 52,3% per *D. dendriticum*. In questo studio, per altro, negli ovini l'escrezione di uova di *F. hepatica* era superiore rispetto ai bovini della stessa area (Cringoli et al., 2002).

In uno studio più recente condotto a livello di mattatoio sono state riscontrate le seguenti prevalenze d'infestazione: 22,99% (4897 pecore su 21299) in pecore a fine carriera provenienti dalle province toscane di Grosseto (29%), Siena (27%), Arezzo (24%), Pisa (9%). Il rimanente 11% erano capi provenienti dalle province di Viterbo, Roma, Pesaro, Macerata e Bologna (Bio et al. 2005). In Umbria, l'infestazione da *F. hepatica* è stata riscontrata in allevamenti biologici con prevalenze modeste (5%) (Piergili-Fioretti et al., 2004). In Toscana, in un gregge di pecore di razza zerasca la prevalenza di soggetti eliminatori nel corso dell'anno variava dal 15,6 al 40% (Perrucci et al., 2005).

Per quanto attiene il Nord Italia e in particolare le aree della Pianura Padana o quelle pedemontane in cui venivano segnalate prevalenze consistenti almeno nel bovino variabili dal 28,4% al 50% e oltre (Ollershaw 1973, Balbo et al. 1978, Genchi e Giugni 1981), i dati relativi ai piccoli ruminanti sono piuttosto scarsi e non aggiornati. Per altro, le prevalenze riportate erano nettamente inferiori rispetto a quelle segnalate nel bovino attestandosi infatti intorno al 2,65%-8,8% (Pavoncelli e Tampieri 1978, Julini 1978). Indagini effettuate recentemente in Lombardia hanno confermato la presenza del parassita nel 6% degli allevamenti ovini controllati (Manfredi 2012, dati non pubblicati). A fronte di questa scarsità di informazioni relativamente all'infestazione degli ovini e dei caprini, studi recenti effettuati sul bovino attestano ancora la presenza consistente del parassita, per lo meno localmente, in alcune aree del Nord Italia e dimostrano l'esistenza di un rischio reale anche per le greggi (Citterio et al. 2005, Perrucci et al. 2007, Reist et al. 2011).

**Fasciola hepatica e cambiamenti climatici** - Negli ultimi anni sono riportati un aumento dei casi di fasciolosi sia umana sia animale imputabile ai cambiamenti climatici (Mas-Coma et al. 2009a). In alcune aree, come in Gran Bretagna e Irlanda, gli episodi di fasciolosi risultano fino a 12 volte più frequenti rispetto al passato. Per altro, sempre in

Gran Bretagna, numerose sono le forme acute segnalate nelle pecore a partire da metà estate (de Waal, 2007, Van Dijk et al. 2008). Gli inverni più miti consentono lo sviluppo delle larve e l'infestazione invernale dei molluschi con il risultato che i casi di fasciolosi acuta compaiono più precocemente (Taylor 2012). Le forme di fasciolosi acuta, di norma osservate nelle pecore, recentemente sono state segnalate anche nei vitelli e nei suini (van Dijk et al., 2010).

**Aspetti zoonosici** - La fasciolosi umana è attualmente riconosciuta una patologia riemergente; dati epidemiologici indicano che almeno 17 milioni di individui possono essere considerati infetti e 180 milioni sono a rischio di infestazione. In alcune regioni del mondo come in Bolivia e Perù le prevalenze d'infestazione sono molto elevate (Mas-Coma et al. 2009b).

L'Italia è compresa tra le aree in cui è diffusa la fasciolosi umana e, sebbene questa malattia attualmente sia da considerare poco rilevante e prevalentemente diffusa in centro e sud Italia, recentemente sono stati segnalati alcuni casi al di fuori dell'areale abituale (Suter et al. 1979, Banna et al. 1980, Pandolfo et al. 1991, Chianura et al. 2006, Caturelli et al. 2008).

**CONCLUSIONI** - Le infestazioni parassitarie degli animali di interesse zootecnico, e la fasciolosi nello specifico, negli ultimi anni hanno subito modificazioni epidemiologiche che hanno portato ad un aumento della loro incidenza nelle popolazioni ospiti. Le cause che hanno originato questo fenomeno sono diverse: la movimentazione degli animali, i fenomeni di farmaco resistenza, i cambiamenti climatici. Questi ultimi hanno degli effetti non trascurabili sull'epidemiologia della fasciolosi, il cui ciclo di sviluppo, sebbene il parassita si avvalga di un ospite intermedio, è profondamente influenzato dalla temperatura e dall'umidità. Diventa pertanto imprescindibile la necessità di vigilare e monitorare tale parassitosi al fine di poter mettere in atto adeguate strategie di controllo e contribuire a sostenere la produttività di un settore come quello ovino e caprino che ha una importanza rilevante per l'economia locale.

## ■ Updates on fasciolosis

**key words:** helminths, *Fasciola hepatica*, epidemiology, prevalence.

## Bibliografia

- Ambrosi M (1995). Parassitologia zootecnica. Edagricole, 389 pp.
- Armour, J., 1991. In: Martin, W.B., Aitken, I.D. (Eds.), Liver Fluke Diseases of Sheep., 2nd edition. Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 115-121.
- Balbo T, Lanfranchi P, Gallo MG (1978). Parassitologia 20: 23-28.
- Banna, P, Gulisano G, Musco A, Saggio A, Privitera G (1980). Minerva Medica 36: 2555-2564.
- Bio C, Bio R, Corrias F, Brajon G (2005). Atti del 13° Congresso della Fe.Me.S.P.Rum.: 111.
- Caturelli E, Dell'Isola S, Ialungo AM, Ghittoni G, Roselli P (2008). Gut 57:4.
- Chapuis E, Trouve S, Facon B, Degen L, Goudet J (2007). Molecular Ecology 16: 3484-3496.
- Chianura L, Lipreri R, Moretti C (2006). Giornale Italiano di Medicina Tropicale 11: 29-33.
- Citterio C. V.1, Marconi P.2, Timini M. (2005). Quaderno SOZOOALP n° 2: 127-129.
- Cringoli G, Rinaldi L, Veneziano V, Capelli G, Malone JB (2002). Vet Parasitol 108:137-143.
- De Waal T, Relf V, Good B, Gray J, Murphy T, et al. (2007). In: Holden NM, Hochstrasser T, Schulte RPO, Walsh S, eds. Making Science Work on the Farm: A workshop on Decision Support Systems for Irish Agriculture. pp 60-63.
- Fioretti DP, Sacconi G, Diaferia M, Arcaro R, Veronesi F; Mancini S (2004). Obiettivi e Documenti Veterinari 25: 35-44.
- Fox NJ, White PCL, McClean CJ, Marion G, Evans A, Hutchings MR (2011). PLoS ONE, www.plosone.org 6: 1-9.
- Garippa G, Bufano G, Caroli A, Carta A, Cringoli G, De Nardo F, Filippini G, Leori SG, moniello G, Ronchi B (2008). Large Animal Review 14: 40-43.
- Genchi C, Giugni MF (1981). Rivista di Zootecnia e Veterinaria 9: 15-19.
- Girardi C, Lanfranchi P, Abate O, Pau (1979). Ann Fac di Torino 26: 3-17.
- Julini M (1973). Nuovo Progresso Veterinario 3: 822-823.
- Kenyon F, Sargison ND, Skuce PJ, Jackson F (2009). Vet Parasitol 163: 293-297.
- Malek E. (1980). Snail transmitted parasitic disease. Vol. II. CRC Press.
- Mas-Coma S, Bargues MD, Valero MA (2005). Int. J. Parasitol. 35: 1255-1278.

- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009a). *Vet Parasitol* 163: 264-280.
- Mas-Coma S, Valero MA, Bargues MD (2009b). *Advance Parasitol* 69:41-146.
- Ollerenshaw CB (1973). *Annali della Facolta Medicina Veterinaria di Torino* 20: 83-121.
- Pandolfo I, Zimbaro G, Bartiromo G, Genitori A, Taccone M, Gaeta M, Ioli A, Giudice L lo (1991). *Journal of Clinical Ultrasound* 19:505-507.
- Pavoncelli R, Tampieri MP (1978). *Parassitologia* 20: 217-220.
- Perrucci S, Bianchi C, Benvenuti N, Goracci J, Giuliotti L (2005). *Annali Fac. Med. Vet.*, 58: 77-83.
- Perrucci S, Pinello, E, Fichi G, Ciardi E, Barberi P, Moonen C, Ragolini G, Bibbiani C (2007). *Veterinaria Italiana* 43: 415-424.
- Reddington JJ, Leid RW, Wescott Rb (1986). *Vet Parasitol* 19:145-150.
- Reist M, Forbes A B, Bonfanti M, Beretta W, Pfister K (2011). *Veterinary Record* 168: 484-488.
- Rondelaud D, Hourdin P, Vignoles P, Dreyfuss G, Cabaret J (2011). *Vet Parasitol* 181: 166-173.
- Suter F, Scaglia M, Scevola D, Carosi G (1979). *Rivista di Parassitologia* 40: 159-165.
- Torgenson O, Claxton J (1999). In: Dalton JP (ed), CAB INTERNATIONAL, 113-149.
- Van Dijk J, David GP, Baird G, Morgan ER (2008). *Vet Parasitol* 158: 73-84.
- van Dijk J, Sargison ND, Kenyon F, Skuce PJ (2010). *Animal* 4(3): 377-392.

# La Paramfistomatosi dei piccoli ruminanti



A. SCALA, G. CRINGOLI, G. SANNA<sup>1</sup>

CIRPAR Centro Interuniversitario per gli studi in parassitologia, <sup>1</sup> CREMOPAR, Campania, Italia

**Parole chiave:** Paramfistomatosi, ovino, caprino.

**INTRODUZIONE** - La Paramfistomatosi dei ruminanti è causata da trematodi della famiglia *Paramphistomidae* a cui appartengono i generi *Paramphistomum*, *Cotylophoron*, *Calicophoron* e *Gigantocotyle*, caratterizzati da una ventosa acetabulare subterminale molto grande munita di piega anulare (Boch e Supperer, 1980). Questi trematodi colpiscono il tratto gastro-intestinale, riscontrandosi da adulti nel rumine e nel reticolo, mentre allo stadio larvale nel primo tratto del duodeno.

**MORFOBIOLOGIA** - La Paramfistomatosi è legata ad un circuito biologico strettamente specifico, che trova le sue basi al limite tra due biotopi, il pascolo e gli ambienti umidi, che formano al loro limite un ecotono particolare in cui si sviluppano gli ospiti intermedi (molluschi dei generi *Bulinus*, *Planorbis*, *Limnea*, ecc.) e si riscontrano le metacercarie infestanti nelle erbe.

I parassiti adulti hanno una forma conica di color rosso-roseo lunghi dai 5 sino a 14 mm, con atrio genitale fornito o meno di sfintere genitale e/o papillare a seconda dei generi e/o specie considerati. Questi vivono "fissati" con una robusta e ampia ventosa acetabulare soprattutto alla parete del rumine e del reticolo nutrendosi di detriti vegetali, batteri e protozoi in essi contenuti. Questo tipo di alimentazione ha fatto sì che i paramphistomidi adulti fossero talvolta ritenuti non dei parassiti, ma degli agenti commensali dei ruminanti.

La fase esterna del ciclo dei Paramphistomidi è simile a quella di *Fasciola hepatica*. Le uova eliminate opercolate, lunghe 120-150 micron e larghe 60-80 micron, maturano nell'ambiente esterno a temperature di 24-27 gradi in 10-15 giorni dando origine ad un miracidio ciliato, che fuoriuscito dall'uovo può sopravvivere per massimo 24 ore nell'ambiente esterno. Questo deve penetrare nei molluschi ospiti intermedi, perde quindi il rivestimento ciliato e si trasforma in sporocisti che dopo 1-2 settimane diventano redie (Horak, 1971); possibile anche una seconda generazione di redie che daranno origine alle cercarie, caratterizzate da una particolare pigmentazione scura e da 2 occhi (Sey, 1991). Le cercarie una volta abbandonato il mollusco ospite intermedio, soprattutto sotto l'effetto di una forte illuminazione che perdura per almeno 10 minuti (Euzéby, 1975); si incistano nelle erbe, trasformandosi in metacercarie di circa 300 micron di diametro, visibili quindi ad occhio nudo, di colorito scuro (marron/nero). Le metacercarie possono sopravvivere dai 3 ai 9 mesi in condizioni di umidità (Horak, 1962) e generalmente non superano i rigori invernali. I piccoli ruminanti, ospiti definitivi, si infestano per ingestione delle metacercarie con le erbe. Dopo la fase di disincistamento che avviene nell'abomaso e nel duodeno, le forme larvali aderiscono all'epitelio della prima parte dell'intestino tenue, che poi attraversano localizzandosi in posizione sottomucosa; successivamente migrano quindi verso l'abomaso 10-35 giorni prima di stabilirsi nella sede definitiva, il rumine e il reticolo, dove diventeranno parassiti adulti. Secondo Deiana e Arru (1963) le adolescentarie che si repertano nell'intestino tenue sono da considerare parassiti erratici i quali sono eliminati attraverso il canale digerente prima che abbiano raggiunto la maturità sessuale; la forma intestinale si verificherebbe quindi, secondo questi Autori, al seguito di infestazioni massive del rumine di soggetti che al pascolo abbiano ingerito eccessive quantità di metacercarie. Tuttavia successive prove sperimentali effettuate sempre dagli stessi Autori (Arru et al., 1970) confermavano in effetti la presenza "obbligatoria" di una fase intestinale.

Il periodo di prepatenza varia tra 3 e 3,5 mesi nelle pecore. La durata di vita dei parassiti può arrivare anche fino a 4 anni, tuttavia non si hanno dei dati precisi in merito, mentre un dato certo è che, con il passare dei mesi, i parassiti perdono gradatamente la loro fertilità, pur sopravvivendo anche per diverso tempo (talvolta anche anni) nella loro sede di localizzazione definitiva (Rojo-Vázquez et al., 2012).

**NOTE EPIDEMIOLOGICHE** - La Paramfistomatosi si riscontra con una certa frequenza nei paesi del bacino del mediterraneo (Arru e Deiana, 1969). Nel corso degli ultimi decenni sono aumentate le segnalazioni di infestazioni miste causate da diverse specie di trematodi in un certo numero di paesi dell'Europa occidentale, probabilmente a causa di una aumentata movimentazione dei piccoli ruminanti e dei cambiamenti climatici che rendono gli ambienti frequentati dagli animali idonei allo sviluppo dei loro ospiti intermedi (Taylor, 2010).

Anche alcuni cambiamenti di management aziendale, quale il ridotto uso di erbicidi e l'incidenza crescente di inondazioni che facilitano l'accesso degli animali ad aree a rischio, possono spiegare i livelli di infestazione più elevati recentemente riportati in paesi come la Gran Bretagna e l'Irlanda (Foster et al., 2008; Murray et al., 2010).

Nella Francia orientale l'infestazione da *Calicophoron daubneyi* veniva rilevata in allevamenti di capre in tutta l'area. 58,1% delle aziende ha presentato almeno un animale che eliminava uova di *C. daubneyi* con prevalenze medie del 35% che variavano dal 7% al 93%. 72,5% delle capre positive eliminavano meno di 100 Uova Per Grammo di feci (UPG) (Paraud et al., 2009).

Sempre in Francia, Ambrous et al. (1999) indicavano delle variazioni di prevalenza all'interno delle greggi di pecora variabili dal 16 al 75% e notarono che la prevalenza era correlata positivamente ai livelli medi di UPG del gregge.

In Italia la Paramfistomatosi è stata segnalata in varie regioni (Piemonte, Lombardia, Veneto, Emilia Romagna, Marche, Umbria, Lazio, Campania, Puglia e Basilicata); sugli animali della Sardegna la parassitosi veniva segnalata forse per la prima volta da Civinini (1842), che evidenziava *Paramphistomum cervi* nel rumine di bovini della Maremma Toscana, ma è soprattutto nei caprini che è stata studiata nella sua forma acuta intestinale (Deiana et al., 1962). Nell'isola sono stati inoltre condotti diversi studi sulla presenza e distribuzione nel territorio dei molluschi ospiti intermedi, identificati in *Bulinus contortus* e *Planorbis planorbis*, in cui peraltro venivano analizzate le % di infestazione con le forme larvali del trematode nell'arco dell'anno (Deiana et al., 1966; Arru e Deiana, 1969).

Giannetto et al. (1994) segnalano presenza di *Calicophoron microbothrium* in ovini e caprini della Sicilia. Cringoli et al. (2004), riscontrano la Paramfistomatosi da *C. daubneyi* nel 16,2% delle aziende ovine degli appennini meridionali tra la Campania, la Puglia e la Basilicata, con livelli medi di UPG di 52; le analisi condotte evidenziavano inoltre alcune correlazioni tra le aziende positive a questo trematode ed alcuni fattori ambientali.

In Sardegna Sey e Arru (1977), segnalavano la presenza di *P. microbothrium* e di *P. daubneyi*. Sempre nell'isola, indagini copromicroscopiche ancora in corso, da noi condotte nel corso del biennio 2011/2012, hanno rilevato l'infestazione nel 9% delle aziende ovine monitorate (15/166) e più precisamente con percentuali del 10,2% nel 2011 (12/118) e del 6,3% nel 2012 (3/48). Sempre in Sardegna, indagini biomolecolari attuate su esemplari di paramphistomidi dei ruminanti hanno consentito il solo riscontro di *C. daubneyi*; questo dato conferma quanto riportato in precedenza da Sey e Arru (1977) che segnalavano la presenza di *P. daubneyi* e "sconfessavano" quanto riportato da Deiana e Arru (1963), che riferivano invece della esclusiva presenza di *P. cervi* quale agente della Paramfistomatosi dei piccoli ruminanti nell'isola. Ancora la nostra segnalazione di *C. daubneyi* conferma inoltre quanto recentemente riscontrato in altri territori nazionali da Cringoli et al. (2004) ed europei da Paraud et al. (2009). Bisogna però ricordare che la classificazione effettuata su basi morfometriche, quale quella attuata prima dell'avvento della biologia molecolare, nell'ambito dei paramphistomidi presenta non poche difficoltà, per cui non possiamo escludere che le specie indicate nelle indagini tassonomiche condotte prima degli anni '90 debbano, o possano, essere prese in considerazione.

ne con molta prudenza. In ogni caso la presenza nel territorio nazionale della specie *C. daubneyi*, comporta parallelamente anche una revisione di alcune caratteristiche epidemiologiche della parassitosi, in quanto usufruendo tale specie dello stesso mollusco ospite intermedio di *F. hepatica*, cioè *Limnea truncatula*, queste due distomatosi tendono a sovrapporsi nello stesso areale. Infatti la Paramphistomatosi può quindi diffondersi non solo in habitat permanenti, più facilmente colonizzati soprattutto da popolazioni di molluschi dei generi *Planorbis* e *Bulinus*, ma anche in habitat temporanei in cui la *Limnea truncatula* può facilmente svilupparsi. Per questo motivo la Paramphistomatosi sembrerebbe sovravanzare la Fasciolosi, così come ipotizzato per alcune aree laziali e lombarde, in cui la Fasciolosi che esisteva in purezza sta lasciando il passo alla Paramphistomatosi (Ambrosi, 1995); anche le nostre esperienze personali maturate in Sardegna sembrerebbero confermare tali ipotesi. In questo senso quindi la Paramphistomatosi potrebbe essere considerata una parassitosi emergente, così come anche recentemente riportato anche da Taylor (2012) per alcuni distretti del nord Europa.

Gli studi condotti per valutare eventuali relazioni tra l'età dei ruminanti e il livello di infestazione e/o livello di eliminazione di uova hanno fornito risultati non uniformi. Szmidski-Adjidé et al. (2000) non hanno evidenziato in bovini controllati al mattatoio alcuna correlazione tra età e Paramphistomatosi, al contrario, Dorchies et al. (1998), così come anche González-Warleta et al. (2008), hanno rilevato che bovini più anziani risultano maggiormente infestati. In certi casi l'assenza di tale relazione potrebbe essere posta in rapporto con i numerosi trattamenti annuali di routine effettuati nei confronti della parassitosi nei territori monitorati. Secondo Horak (1971) il bovino gioca un ruolo importante quale contaminatore ambientale per l'ovino, attraverso l'eliminazione delle uova, infatti anche secondo Silvestre et al. (2000), i fattori di rischio più importanti per l'insorgenza della parassitosi nelle capre sono dati dal pascolo in promiscuità con i bovini e dalla presenza di pascoli umidi.

Nell'ovino l'infestazione risulterebbe quindi meno frequente rispetto al bovino che pascola nelle stesse aree (Simón-Vicente, 1966), così come riportato in Spagna, nelle zone di Córdoba e nell'area Basca (Martínez Gómez e Hernández Rodríguez, 1971; García Pérez et al., 1993). Infine la capra, sembrerebbe più sensibile dell'ovino alla Paramphistomatosi, in quanto consentirebbe uno sviluppo di parassiti di dimensioni maggiori, così come rilevato in riproduzioni sperimentali della malattia contemporaneamente in queste due specie animali (Deiana et al., 1962).

**SINTOMATOLOGIA E LESIONI** - Dal punto di vista clinico si distinguono due forme: 1) acuta-subacuta intestinale, causata dalle forme giovanili (adolescarie) nel primo tratto del duodeno; 2) cronica ruminoreticolare provocata dai trematodi adulti.

La prima, che si può evidenziare nelle infestazioni massive a partire dal 10° giorno dall'ingestione delle metacercarie (Euzéby, 1975), si caratterizza per l'insorgenza di una improvvisa diarrea fetida, con dimagrimento, ipoproteinemia e anemizzazione, con edemi nelle parti declivi del corpo, in particolare nelle infestazioni gravi da *Calicophoron* spp. con forme sottomandibolari (bottle jaw) (Reinecke, 1983) con mortalità spesso anche elevata (10-20%). In certe aree quali l'India, il Sud Africa e l'Australia la mortalità poteva raggiungere negli ovini anche valori dell'80% (Boray, 1959; Soulsby, 1987).

I parassiti immaturi nel piccolo intestino possono causare erosioni, pecchie, aree necrotiche e un'eccessiva produzione di muco con un infiltrato eosinofilo (Rojo-Vázquez et al., 2012). Nell'ovino secondo Boray (1971) l'azione meccanica-aspirante dell'acetabulo dei giovani parassiti sulla mucosa intestinale ed abomasale determina problemi di irrorazione; tutto questo porterebbe alla formazione di aree di necrosi e di piccole emorragie che possono aggravarsi in seguito ai movimenti peristaltici dei visceri, conducendo talvolta così anche ai fenomeni di anemia. Presenti inoltre lesioni ai linfonodi meseraici, che si presentano ingrossati ed edematosi; in questi casi i giovani elminti di color rosa/marron si riscontrano sulla superficie o inglobati nella mucosa dei primi 3 metri del piccolo intestino, che si può presentare in preda ad una infiammazione catarrale e/o emorragica, con possibili aree necrotiche ed ispessimento progressivo della parete (Rolfe et al., 1994; Rojo-Vázquez et al., 2012).

La seconda forma invece si rende manifesta solo nei casi di infestazioni di una certa entità che porta a diminuzione dell'appetito con dimagrimento, anemia, leucopenia, turbe della funzionalità dei prestomaci e talvolta emissione di feci diarroidiche picee particolarmente maleodoranti (Ambrosi, 1995; Vercruyse et al., 1998; Rolfe and Boray, 1993); se-

gnalata inoltre anche una riduzione importante della produzione di latte (Spence et al., 1996). Nella forma cronica può essere rilevata una ruminite ulcerativa con atrofia delle papille del ruminale (Rojo-Vázquez et al., 2012), con la formazione di lesioni a poppatoio derivanti da un'azione di "strangolamento" causata dalla potente ventosa acetabulare che "ancora" il parassita alla parete dei prestomaci. Rari i casi in cui si può parallelamente evidenziare una degenerazione torbido-grassa del fegato con aumento del volume dell'organo (Ambrosi, 1995).

In seguito ad una prima infestazione gli animali risultano parzialmente protetti contro le reinfezioni, in quanto riducono il numero di elminti presenti e l'importanza dei segni clinici (Rojo-Vázquez et al., 2012).

**DIAGNOSI** - I punti cardine della diagnosi si identificano con un'attenta analisi dei dati epidemiologici e dei sintomi, anche se talvolta questi soprattutto nelle forme croniche risultano assai poco specifici (Rieu et al., 2007). Per questo motivo l'analisi copromicroscopica volta alla ricerca e quantizzazione delle uova rappresenta sicuramente lo strumento più valido, insieme al dato anatomo-patologico e/o alla ricerca delle forme immature nelle feci (adolescarie rosate di 2-4 mm di diametro), che nel corso della forma acuta possono raggiungere nell'ovino numeri veramente elevati (più di 30.000 nel duodeno e fino a 4.000 nell'abomaso) (Euzéby, 1975). Altrettanto utile risulterebbe l'acquisizione di dati su animali regolarmente macellati di greggi sospetti, dato che però purtroppo spesso viene "dimenticato", in quanto l'esame dei prestomaci, soprattutto nei piccoli ruminanti in sede di visita post-macellazione viene spesso omesso.

La ricerca delle uova dei paramphistomidi deve essere effettuata secondo tecniche appropriate in grado di rilevare le caratteristiche uova "pesanti" dei trematodi. Nel caso specifico quindi la sedimentazione semplice o "ripetuta", può rappresentare un buon approccio diagnostico, in quanto la grandezza delle uova permette una loro non difficoltosa evidenziazione allo stereomicroscopio o al microscopio ottico a piccolo ingrandimento. Piuttosto appare essenziale la differenziazione delle uova dei paramphistomidi da quelle di *F. hepatica*, per via delle caratteristiche morfologiche abbastanza sovrapponibili. Le uova dei paramphistomidi hanno un aspetto grigio/trasparente, mentre quelle di *F. hepatica* hanno una caratteristica colorazione giallastra; tale caratteristica tuttavia può essere difficile da percepire da un occhio non allenato, soprattutto in caso di singole infestazioni, mentre in infestazioni miste con presenza di entrambi i tipi di uova tale differenza risulta sicuramente più facilmente apprezzabile. L'uso di appositi filtri può aiutare la differenziazione microscopica di queste forme di propagazione. Ulteriori particolari morfologici differenziali sono dati da particolari più difficilmente rilevabili o meno oggettivi, quali ad esempio l'evidente nucleo germinativo centrale nelle uova dei paramphistomidi che invece risulta difficilmente apprezzabile nel caso di quelle di *F. hepatica*, o la forma di norma regolarmente ovale delle uova dei paramphistomidi rispetto alla forma ellittica di quelle di *F. hepatica*.

Importante inoltre, come suggerito da Ambrosi (1995), procedere anche ad un'analisi che possa quantizzare il numero delle UPG, in quanto esisterebbe una buona correlazione tra livelli di UPG e numero di parassiti adulti in localizzazione: secondo Rieu et al. (2007) livelli maggiori di 100 UPG indicano almeno 100 parassiti adulti in localizzazione. Purtroppo però tale correlazione è stata studiata soprattutto nel bovino, mentre i dati relativi ai piccoli ruminanti "languono"; in ogni caso, sempre secondo Ambrosi (1995), valori di UPG medi di 250-300, con punte di 600-700 sarebbero indice di colonizzazione da parte di parassiti adulti in grado di determinare delle alterazioni subcliniche da non sottovalutare. Negli ovini la presenza di un numero di parassiti adulti inferiore alle cento unità sembrerebbe evidenziabile già coprologicamente (Ambrosi, 1995). Le nostre esperienze maturate in laboratorio su campioni fecali positivi di ovini, molto raramente hanno consentito di rilevare infestazioni caratterizzate da livelli di UPG superiori a quelli indice di alterazioni subcliniche. Purtroppo l'elevato peso specifico delle uova dei trematodi prevede per le tecniche che implicano per la fase di flottazione l'uso di soluzioni "pesanti" talvolta costose, corrosive, tossiche e/o cancerogene, che impongono particolari norme per il loro smaltimento e per la sicurezza dell'operatore tali da essere state bandite da molti laboratori. Appare in ogni caso evidente che la diagnosi copromicroscopica nei confronti della Paramphistomatosi debba essere specificatamente richiesta ai laboratori che normalmente non la attuano di routine. Tutte queste situazioni, insieme ai mancati controlli dei prestomaci, generalmente rendono questa parassitosi sottostimata. Il ricorso a nuove tecniche copromicroscopiche, quali quelle che prevedono l'uso del Flotac®, potrebbero in questi casi aiutare a risolvere ta-

li problemi diagnostici in virtù della loro maggior sensibilità (Cringoli, comunicazione personale).

Interessanti sviluppi potrebbero derivare dalla messa a punto di tecniche immunodiagnostiche volte alla ricerca di IgG in ELISA tramite l'uso di antigeni di escrezione/secrezione attualmente valide soprattutto per indagini epidemiologiche, in quanto non ancora in grado di identificare con sicurezza il singolo soggetto (Diaz et al., 2006).

L'analisi biochimica della componente muscolare in giovani ovini con Paramphistomatosi cronica evidenzia una diminuzione dell'azoto totale e del fosforo, mentre aumenta il tenore in acqua (Mikhailova et al., 1972).

**TRATTAMENTO** - La molecola di prima scelta disponibile attualmente sul mercato in Italia è l'oxyclozanide, somministrata alla dose di 15 mg/kg (Boray, 1986), anche perché la niclosamide, che nell'ovino al dosaggio variabile da 50 a 100 mg/kg p.v. era dotata di un'eccellente attività soprattutto sui parassiti immaturi (Euzeby, 1975; Ambrosi, 1995), non è più disponibile in commercio. Secondo Rolfe e Boray (1987) l'oxyclozanide in combinazione con il levamisolo è l'antielmintico più efficace per il trattamento delle forme acute-subacute, somministrato per due volte a distanza di due giorni.

L'efficacia dell'oxyclozanide alla dose di 15 mg/kg p.v., viene anche confermata da Sahai et al. (1983), che ottengono la riduzione del 100% dei parassiti in localizzazione in capretti indiani infestati sperimentalmente con *P. cervi* e da Paraud et al. (2009) su capre francesi infestate sperimentalmente con *C. daubneyi* che notano una riduzione superiore al 95% del numero dei parassiti adulti. In Francia tuttavia esistono dei problemi di somministrazione di tale farmaco nelle capre, in quanto a tale dosaggio si supererebbero, in questa specie animale, i limiti che le normative impongono, perché il volume somministrato supererebbe la denominata "Stop-dose" che risulta pari a 20 ml della soluzione di 3,4% per tutti gli animali oltre 45 kg; ciò comporterebbe, essendo tale regolamento seguito dalla maggior parte degli agricoltori, un sotto-dosaggio nelle capre più pesanti (Paraud et al., 2009), che potrebbe comportare l'insorgenza di fenomeni di farmacoresistenza.

Proprio per ovviare anche a questi inconvenienti, oltre che per evidenti questioni economiche, per il trattamento della Paramphistomatosi acuta degli ovini, Bath, van Wyk (2009) propongono di trattare esclusivamente i soggetti con l'edema sottomandibolare (trattamento mirato selettivo), così come per altre parassitosi in cui viene suggerito il trattamento dei soggetti in base alla valutazione degli score di alcuni sintomi, quali la presenza dell'edema sottomandibolare per fasciolosi acute, per nematodi ematofagi (es. *Haemochus*) o lo score dello scolo nasale nell'Estrosi, quello del grado di anemia con il sistema FAMACHA sempre per i parassiti ematofagi, della diarrea per le infestazioni intestinali tramite il sistema DAG SCORECARD, o ancora il riscontro del Body Condition Score soprattutto per le parassitosi debilitanti.

In Italia, purtroppo, mancano i dati derivanti da *trial* di campo nel settore ovino che possano confermare le percentuali di efficacia dell'oxyclozanide associato al levamisolo; tali risultati tuttavia sono stati recentemente acquisiti in Sardegna nel settore bovino, in cui si è evidenziato un livello di efficacia massima non elevata pari all'85,6% (Sanna et al., 2012). Appare quindi evidente che un *trial* di campo attuato sull'ovino nel nostro territorio potrebbe consentire di acquisire dei dati importanti per una conferma o meno dell'efficacia di questa associazione farmacologica anche nell'ovino in Italia.

**PROFILASSI** - La profilassi nei confronti di questa distomatosi si sovrappone, a causa delle analogie esistenti anche con il ciclo esogeno di *Calicophoron daubneyi*, l'agente della Paramphistomatosi che sembrerebbe presente in molte aree nazionali ed europee (nelle altre non sono state condotte indagini tassonomiche specifiche) a quella della Fasciolosi (Szmidsz-Adjide et al., 2000). Gli interventi ambientali costituiscono quindi un tassello essenziale. Appare importante il controllo dell'abbeverata soprattutto in ambienti non stanziali nei quali si fa ricorso generalmente ad ambienti acquatici spontanei (quali quelli che spesso riguardano gli ovini in Sardegna). Ovviamente di difficile o impossibile applicazione pratica è la lotta ai molluschi ospiti intermedi attraverso l'uso di malacocidi a causa delle normative vigenti relative alle molecole utilizzabili e delle possibili contaminazioni ambientali derivanti. Da qui l'importanza dell'applicazione di trattamenti chemio-profilattici sugli animali in grado di limitare i danni causati dalla parassitosi e l'inquinamento ambientale dei capi fortemente positivi, anche perché, purtroppo, la somministrazione di preparati a base di metacercarie irradiate, pur dimostrando una certa efficacia immunizzante (Haffez e Rao, 1986; Gill e Bali, 1988), non sono ancora disponibili in commercio.

## ■ The Paramphistomosis of small ruminants

**Key words:** Paramphistomosis, sheep, goat.

## Bibliografia

- Abrous M., Rondelaud D., Dreyfuss G., Cabaret J. (1999), Infection of *Lymnaea truncatula* and *Lymnaea glabra* by *Fasciola hepatica* and *Paramphistomum daubneyi* in farms of central France. *Vet. Res.* 30, 113-118.
- Ambrosi M. (1995), *Parassitologia Zootecnica*. Edizioni Edagricole, Bologna.
- Arru E., Deiana S. (1969), Gli ospiti intermedi di *Paramphistomum* (*P. cervi*) in Sardegna. *Atti S.I.S.Vet.*, 23, 909-911.
- Arru E., Deiana S., Muzzetto P. (1970), Paramphistomosi intestinale dei ruminanti. Infestazione sperimentale degli ovini con metacercarie ed esemplari immaturi di *Paramphistomum cervi* (Schränk, 1790). *Rivista di Parassitologia*, 31(1), 33-42.
- Bath G.E., van Wyk J.A. (2009), The Five Point Check® for targeted selective treatment of internal parasites in small ruminants. *Small Ruminant Research*, 86 (1-3), 6-13.
- Boch J., Supperer R. (1980), *Parassitologia Clinica Veterinaria*. Editrice ES-SEGIVI, Piacenza.
- Boray J.C. (1959), Studies on intestinal paramphistomosis in cattle. *Australian Veterinary Journal*, 35, 282-287.
- Boray J.C. (1971), The pathogenesis of ovine intestinal paramphistomosis due to *P. ichikawai*, in Gaafar, Pathology of parasitic diseases, Pardue University Studies, Lafayette, p. 209.
- Boray J.C. (1986), Trematode infections of domestic animals. In: Boray, J.C., Martin, P.J., Roush, R.T. (Eds.), *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. Plenum Press, New York, pp. 401-425.
- Civinini F. (1908), citato da Giannetto S. et al. (1994) - Reperto di *Calicophoron microbothrium* in ovi-caprini della provincia di Messina. *Atti S.I.P.A.O.C.*, 11, 307.
- Cringoli, G., Taddei, R., Rinaldi, L., Veneziano, V., Musella, V., Cascone, C., Sibilio, G., Malone, J.B., 2004. Use of remote sensing and geographical information systems to identify environmental features that influence the distribution of paramphistomosis in sheep from the southern Italian Apennines. *Veterinary Parasitology*. 122, 15-26.
- Diaz P., Lomba C., Pedreira J., Arias M., Sánchez-Andrade R., Suárez J.L., Díez-Banos P., Morrondo P., Paz-Silva A. (2006), Analysis of the IgG antibody response against *Paramphistomidae* trematoda in naturally infected cattle. Application to serological surveys. *Veterinary Parasitology*, 140, 281-288.
- Deiana S., Lei G.M., Arru E. (1962), Paramphistomosi intestinale in capre della Sardegna. *Veterinaria Italiana* 13, 1029-1039.
- Deiana S., Arru E. (1963), Ulteriori indagini sulla paramphistomiasi in Sardegna. *La Ricerca Scientifica*, 33(II-b), 449-458.
- Deiana S., Arru E., Nuvole A. (1966) - L'infestazione di *Bulinus contortus* da cercarie di *Schistosoma bovis* e di *Paramphistomum cervi* in Sardegna. *Bollettino della Società Italiana di Biologia Sperimentale*, 42(14), 902.
- Dorchies P., Bergeaud J.P., Duranton C., Prévot F., Tessier P. (1998), Extension de la paramphistomose bovine en France: résultats d'une enquête coproscopique sur 465 bovins dans treize départements. *Rev. Med. Vet.*, 149(11), 1029-1032.
- Euzeby J. (1975), Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tomo II, *Maladies dues aux plathelminthes, troisième fascicule: trematodes*, livre 2, Vigot Freres Editeurs, Paris. Pagg 28-29.
- Foster A.P., Otter A., O'Sullivan T., Cranwell M.P., Twomey D.F., Millar M.F., Taylor M.A. (2008), Rumen fluke (paramphistomosis) in Britain. *Cattle. Vet. Rec.*, 162, 528.
- Gill J.S., Bali H.S. (1988), Immunization of sheep with gamma-irradiated metacercariae of *Paramphistomum cervi* (Zeder, 1790), Fischroeder, 1901. *Cheiron* 17, 79-82.
- González-Warleta M., García-Precedo I., Castro-Hermida J.A., Miñambres B., González-Lanza C., Mezo M., Manga-González Y. (2008), Cattle slaughterhouse and field studies on the *Calicophoron daubneyi* (Dinik 1962; Eduardo, 1983) infection (NW Spain). In: Xth European Multicolloquium of Parasitology, Paris, 24-29 August 2008..
- García Pérez A.L., Juste Jordán R.A., Povedano Fernandez I. (1993), Diez años de Parasitología en el SIMA (1982-1992): relación de especies y hospedadores. Informe para el Índice-Catálogo de Zooparásitos ábricos.
- Giannetto S., Niuatta P.P., Giudice E. (1994), Reperto di *Calicophoron microbothrium* in ovi-caprini della provincia di Messina. *Atti S.I.P.A.O.C.*, 11, 307.
- Haffez M.D., Rao B.V. (1986), Effect of single vaccination on the longevity of immunity produced by gamma irradiated amphistomemetacercariae (*Cercariaeindicae*, XXVI). *Indian Vet. J.*, 63, 106-108.

- Horak I.G. (1962), Studies on Paramphistomiasis III: a method of testing the viability of paramphistome metacercariae. *J. Vet. Res.*, 29, 197-202.
- Horak I.G. (1971), Paramphistomiasis of domestic animals. *Adv. Parasitol.*, 9, 33-72.
- Martínez Gómez F., Hernández Rodríguez S. (1971), Helminth parasites from sheep (*Ovis aries*) in Cordoba (Spain). *Arch. Zootec.*, 20, 249.
- Mikhailova et al. (1972), citato da Euzeby J. (1975), Les maladies vermineuses des animaux domestiques et leurs incidences sur la pathologie humaine. Tomo II, Maladies dues aux plathelminthes, troisième fascicule : trematodes, livre 2, Vigot Freres Editeurs, Paris. Pag.37.
- Murray G., Joyce C., Fagan J., O'Donovan J., Gaffney K., Casey M., Hanna R., Sammin D. (2010), Clinical paramphistome infestation in ruminants in Ireland. Abstract 41; Association of Veterinary Teaching and Research Work. In: 64th Annual Meeting, York 29th-31st, March 2010.
- Parad C., Fournier E., Robergeot V., Kulo A., Pors I., Baudry C., Chartier (2009), *Calicophoron daubneyi* infection in grazing goats: Results from a cross-sectional coprological survey in France. *Small Ruminant Research* 82, 66-68.
- Reinecke R.K. (1983), *Veterinary Helminthology*. Butterworths, Durban.
- Rieu E., Recca A., Béné J.J., Saana M., Dorchies P., Guillot J. (2007), Reliability of coprological diagnosis of *Paramphistomum* sp. infection in cows. *Veterinary Parasitology*, 146, 249-253
- Rolfe P.F., Boray J.C. (1993), Comparative efficacy of moxidectin, an ivermectin/clorsulon combination and closantel against immature paramphistomes in cattle. *Aust. Vet. J.*, 70, 265-267.
- Rolfe P.F., Boray J.C., Collins G.H. (1994), Pathology of infection with *Paramphistomum ichikawai* in sheep. *Int. J. Parasitol.*, 24, 995-1004.
- Rojo-Vázquez F.A., Meana A., Valcárcel F., Martínez-Valladares M. (2012), Update on trematode infections in sheep. *Veterinary Parasitology*. In press.
- Sahai B.N., Ansari M.Z., Singh R.P., Prasad K.D. (1983), Anthelmintic efficacy of ivermectin and ivermectin against experimental paramphistomiasis in goats. *Indian J. Vet. Med.*, 3 (1), 27-32.
- Sanna G., Laconi P., Varcasia A., Serra S., Pipia A.P., Dore F., Maurelli M.P., Cringoli G., Scala A. (2012), Cattle Paramphistomosis: taxonomical, epidemiological updates in Sardinia and therapeutic field trials. *Mappe Parassitologiche*, 18, 88.
- Sey O., Arru E. (1977), A review of species of *Paramphistomum* (fishoeder, 1901) occurring in Sardinian domestic ruminants. *Rivista di Parassitologia*, 38(2/3), 295-301.
- Sey O. (1991), *Handbook of the Zoology of Amphistomes*. CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Silvestre, A., Sauve, C., Cabaret, J. (2000), Caprine *Paramphistomum daubneyi* (Trematoda) infection in Europe. *Vet. Rec.*, 146, 674-675.
- Simón Vicente F. (1966), Las helmintosis ovinas en el pastoreo extensivo. *Rev. Ibér. Parasitol.*, 26, 203-222.
- Soulsby E.J.L. (1987), *Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos*. I. *Helminths Interamericana México*, D.F., 823.
- Spence S.A., Fraser G.C., Chang S. (1996), Responses in milk production to control of gastrointestinal nematode and paramphistome parasites in dairy cattle. *Aust. Vet. J.*, 74, 456-459.
- Szmidt-Adjidé V., Abrous M., Adjidé C.C., Dreyfuss G., Lecompte A., Cabaret J., Rondelaud D. (2000), Prevalence of *Paramphistomum daubneyi* infection in cattle in central France. *Vet. Parasitol.*, 87, 133-138.
- Taylor M.A. (2012), Emerging parasitic diseases of sheep *Veterinary Parasitology*, In Press.
- Vercruyse J., Taraschewski H., Voigt W.P. (1998), Main clinical and pathological signs of parasitic infections in domestic animals. In: Mehlhorn, H. (Ed.), *Parasitology in Focus*. Springer-Verlag, New York, pp. 477-532.

# Un "Questionnaire survey" sui trattamenti antielmintici contro la dicroceliosi in una realtà ad alta vocazione per l'allevamento ovino quale la Sardegna



A. SCALA, P. MARON<sup>1</sup>, V. SALAMINA<sup>2</sup>, G. SANNA

CIRPAR Centro Interuniversitario per gli studi in parassitologia

<sup>1</sup> Manager Pfizer animal health, Italia

<sup>2</sup> Area Veterinary Manager Pfizer animal health, Italia

**Parole chiave:** *Dicrocoelium dendriticum*, ovino, trattamenti antielmintici

**INTRODUZIONE** - L'allevamento ovino in Sardegna, come ormai noto, rappresenta un settore zootecnico ed economico di importanza primaria, che tuttavia necessita, per un suo ottimale sviluppo, di una razionale gestione sanitaria. Sotto questo aspetto le parassitosi costituiscono senza dubbio un fattore rilevante e tra queste la distomatosi da *Dicrocoelium dendriticum* costituisce senza dubbio una infestazione difficile da controllare. Infatti il suo ciclo biologico che prevede la presenza di due ospiti intermedi difficilmente aggredibili sotto l'aspetto profittabile ambientale (molluschi gasteropodi xerofili e serviformiche), la sintomatologia subdola e scarsamente patognomonica, le difficoltà diagnostiche in vita e i protocolli terapeutici non sempre applicati razionalmente, rendono il controllo della Dicroceliosi non sempre ottimale. Tutto questo nonostante questa parassitosi sia, insieme alle strongilosi gastro-intestinali, quella più diffusa nel territorio nazionale compresa la Sardegna (Ambrosi, 1995). Nell'isola la Dicroceliosi purtroppo risulta, in base ai dati copromicroscopici ottenuti nel nostro laboratorio, particolarmente presente in alcuni distretti le cui caratteristiche pedoclimatiche favoriscono lo sviluppo degli ospiti intermedi. Le indagini copromicroscopiche condotte nel triennio 1985/87 hanno consentito di evidenziare le uova di questo trematode in percentuali variabili dal 5,5% al 24,5% negli agnelli e dal 12,5% al 38% negli ovini adulti allevati in aree del centro Sardegna (Sanna et al., 1989). Altre indagini condotte nel 1991 su fegati di ovini regolarmente macellati allevati in aree pascolative di comuni in provincia di Sassari hanno consentito di rilevare la presenza di esemplari di *D. dendriticum* nel 31,1% dei soggetti allevati in agro di Porto Torres e nel 58,6% di quelli di Ploaghe, per un totale complessivo dei tassi di prevalenza pari al 50,3%, con cariche parassitarie medie di 137,8 esemplari/capo (range da 16 a 828) (Scala, 1991). In questo studio, le indagini non evidenziavano alterazioni patologiche dei valori degli acidi biliari, delle Gamma GT e della ALP, anche se questi risultavano superiori nei soggetti positivi rispetto a quelli negativi al parassita (Scala, 1991). Indagini analoghe condotte su ovini allevati in provincia di Cagliari regolarmente macellati nel corso del 1998 consentivano di rilevare il trematode nel 10% dei soggetti controllati, nei quali nel 57,1% dei casi si riscontravano meno di 100 esemplari in localizzazione (Scala et al., 2000). Gli ultimi dati copromicroscopici ottenuti presso il nostro laboratorio di Parassitologia nel corso del 2012 hanno consentito di rilevare uova di *D. dendriticum* nel 12,5% di campioni di feci di ovini provenienti da 48 allevamenti a noi recapitati per analisi di controllo. Diversi veterinari che operano sul territorio, con cui abbiamo un rapporto di collaborazione, spesso manifestano la loro difficoltà nel controllare in modo ottimale sotto l'aspetto terapeutico l'infestazione, soprattutto in greggi in cui è presente una forte pressione parassitaria, a causa di varie problematiche relative al trattamento stesso (scelta del principio attivo, del protocollo da utilizzare, problemi relativi ai tempi di sospensione per il latte, ecc.).

Considerando quindi quanto soprariportato abbiamo ritenuto interessante mettere a punto un questionario sui trattamenti antiparassitari effettuati in Sardegna dai veterinari che operano sul campo, in cui sono riportati quesiti inerenti soprattutto le modalità di diagnosi attuate, le motivazioni che comportano l'attuazione del trattamento, la scelta del principio attivo, le modalità del trattamento (dosaggio e numero di somministrazioni) e verifica della sua efficacia. I risultati dell'elaborazione dei dati ottenuti pensiamo possano essere di aiuto ad individuare

dei "punti critici" nella filiera del trattamento antielmintico nei confronti della Dicroceliosi ovina, utili quindi per una condotta terapeutica più razionale e, di conseguenza, maggiormente efficace.

**MATERIALI E METODI** - Il questionario elaborato prevede 10 domande riportabili a tre diverse sezioni:

- nella prima sono riportati quesiti: sul numero e consistenza delle aziende seguite dal veterinario "compilatore"; sul tasso di prevalenza dell'infestazione che lui ritiene presente nei greggi da lui seguiti; sul parere che hanno gli allevatori sull'importanza della Dicroceliosi.
- nella seconda sono riportati quesiti sulle modalità diagnostiche seguite;
- nella terza si riportano quesiti sulle basi su cui si effettuano i trattamenti e le modalità di attuazione degli stessi (scelta del principio attivo, protocollo terapeutico utilizzato e verifica dell'efficacia dello stesso).

Non si è voluto procedere all'allestimento di un questionario più articolato e quindi più informativo, per evitare di "stancare" il veterinario compilatore ed ottenere quindi delle risposte meno affidabili.

I questionari compilati completamente sono risultati 39 nel periodo maggio-luglio 2012.

Le domande contenute nel questionario venivano poste al veterinario sempre direttamente da uno di noi che le riportava materialmente sul supporto cartaceo, onde uniformare la presentazione delle stesse. Si è optato per questa soluzione, in quanto la consegna del questionario al Veterinario avrebbe potuto consentire allo stesso l'esame dei foglietti illustrativi o di altro materiale divulgativo e/o scientifico dei vari farmaci in cui erano riportate le modalità di trattamento e i dosaggi specifici per il *D. dendriticum*, falsando evidentemente quello che effettivamente era successo sul campo e rendendo quindi meno attendibile il risultato finale.

I dati ottenuti sono stati riportati su un foglio elettronico (Excel - Microsoft) ed elaborati successivamente tramite il software EpiInfo vers. 6.04.

**RISULTATI** - *Prima sezione.* I veterinari intervistati seguivano in media 65 aziende ciascuno (range da 20 a 150), che corrispondevano ad una media di 15.913 ovini (range da 2.000 a 35.000), mentre la consistenza media dei greggi era di 293,9 (Dev.St. 111,3). Secondo i veterinari la prevalenza media dell'infestazione da *D. dendriticum* nelle loro greggi era la seguente: < al 5% per il 5,1% (n°2); < al 10% per il 10,2% (n°4); 10% per il 28,2% (n°11); 20% per il 15,4% (n°6); 30% per il 17,9% (n°7); 40% per il 5,1% (n°2); 50% per 10,2% (n°4); 70% per il 2,6% (n°1); 90% per il 5,1% (n°2).

Gli Allevatori, per i Veterinari intervistati, considerano la Dicroceliosi scarsamente importante nel 17,9% dei casi (n°7); di media importanza nel 20,5% dei casi (n°8); di molta importanza nel 61,5% dei casi (n°24).

*Seconda sezione* - La diagnosi della Dicroceliosi veniva eseguita attraverso delle analisi coprologiche volte alla ricerca delle uova del trematode dal 74,4% dei veterinari; queste analisi venivano svolte: nell'8,3% dei casi presso laboratori diagnostici privati (n°2); nel 12,5% dei casi (n°3) direttamente nei loro ambulatori; nel 20,8% dei casi presso il laboratorio di parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari (n°5); nel 50% dei casi (n°12) presso i laboratori dell'IZS della Sardegna; nell'8,3% dei casi (n°2) infine i veterinari si rivolgevano indifferentemente al laboratorio di Parassitologia del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università di Sassari o ai laboratori dell'IZS della Sardegna. Solo un Veterinario intervistato è stato in grado di riportare il livello di Uova per Grammo di feci (UPG) riscontrato nei confronti della parassitosi, che era intorno alle 50 UPG.

Tabella 1

Sintomi	Numero	%
edema sottomandibolare / edema	23/39	59%
dimagrimento/deperimento	20/39	51,3%
diminuzione produzione latte	8/39	20,5%
diarrea	5/39	7,7%
ittero	2/39	5,1%
subittero	1/39	2,6%
abbattimento	1/39	2,6%
morte	1/39	2,6%

Il 66,7% dei veterinari (n°26) ricorre per la diagnosi anche all'esame anatomopatologico che svolge direttamente nel 19,2% (n°5), il 34,6% (n°9) ricorre ai laboratori dell'IZS, il 7,7% (n°2) ai laboratori del Dipartimento di Medicina Veterinaria dell'Università, il 7,7% (n°2) ricorre indifferentemente ai laboratori dell'IZS o del Dipartimento di Medicina Veterinaria e sempre il 7,7% (n°2) ai laboratori dell'IZS o ad esami anatomopatologici svolti direttamente in prima persona. Nel 33,3% dei casi la diagnosi talvolta viene effettuata esclusivamente in base ai sintomi che per i veterinari risultavano essere quelli riportati nella tabella 1.

Per 3 Veterinari intervistati (7,7%), la Dicroceliosi nelle greggi da loro seguite non determina l'insorgenza di alcun sintomo clinicamente evidente.

**Terza sezione** - Il trattamento antiparassitario viene attuato dai Veterinari in base ai seguenti parametri (dato rilevato su 58 risposte fornite in quanto ogni veterinario esprimeva talvolta più parametri): trattamento strategico 32,8% (n°19); diagnosi coprologica 25,7% (n°15); sintomatologia clinica evidente 17,2% (n°10); stagionalità 24,1% (n°14). Per trattamenti strategici si intendono quelli attuati in particolari circostanze, come per esempio prima del cambio di un pascolo, prima delle vaccinazioni, in ogni caso sempre alla comparsa di manifestazioni cliniche.

I trattamenti venivano attuati con i seguenti principi attivi (dato rilevato su 49 risposte fornite): netobimin 36,7% (n°18); albendazolo micronizzato 1,9% 34,9% (n°17); albendazolo micronizzato al 10% 22,4% (n°11); albendazolo sulfossido 2% (n°1); mebendazolo 2% (n°1); closantel/clorsulon 2% (n°1).

Per ciò che concerne invece le modalità di trattamento sono state riferite le seguenti: il 15,4% (n°6) propongono un singolo trattamento attuato con la dose "standard" indicata nel foglio illustrativo per i nematodi e cestodi gastro-intestinali; sempre il 15,4% (n°6) attua invece un singolo trattamento con il dosaggio "doppio" indicato generalmente come efficace nel foglio illustrativo dei farmaci per i distomi epatici; il 38,5% (n°15) utilizza un duplice trattamento con la dose "standard"; il 30,8% (n°12) effettua un doppio trattamento con il dosaggio "doppio". Nel caso dei duplici trattamenti il periodo tra un intervallo e l'altro appare alquanto variabile, in quanto questi venivano attuati nel totale dei 27 casi riportati secondo i seguenti intervalli: tra i 7 e 10 giorni 22,2% (n°6); tra gli 11 e 15 giorni 18,5% (n°5); tra i 16 e 20 giorni 18,5% (n°5); tra i 21 e 30 giorni il 25,9% (n°7); oltre i 30 giorni il 7,4% (n°2); il 74,4% dei Veterinari (n°2) non ricordava il periodo di intervallo suggerito tra un trattamento e l'altro. Da rilevare che tra i 25 casi in totale in cui è stato utilizzato l'albendazolo micronizzato, in cui la casa produttrice indica per la terapia della Dicroceliosi l'attuazione di un doppio trattamento a distanza di 7 giorni uno dall'altro, tale intervallo è stato rispettato nel 20% dei casi (n°5); solo in un caso in cui sono state utilizzate altre molecole il trattamento è stato ripetuto entro l'intervallo di 7-10 giorni. I veterinari nel 61,5% dei casi (n°24) dichiarano di effettuare una verifica dell'efficacia del trattamento.

**CONSIDERAZIONI** - I questionari esaminati, seppur numericamente non elevati, evidenziano in ogni caso, in base ai risultati della prima sezione (es. numero di allevamenti e di capi ovisi seguiti), come i Veterinari che hanno collaborato a questa indagine siano professionisti che si dedichino in modo importante a questo settore zootecnico e che quindi le informazioni acquisite possano essere uno specchio fedele di quanto attualmente si attua nella maggior parte del territorio isolano nei confronti della terapia della Dicroceliosi ovina. Le risposte inerenti la

diffusione di questa distomatosi epatica in effetti confermano la sua diffusione non uniforme sul territorio, anche se per oltre il 40% dei veterinari l'infestione si attesta massimo sul 10% dei capi presente nella zona di sua attività. Tale ipotetica prevalenza in effetti non si discosta molto da quanto da noi recentemente rilevato nei nostri laboratori (12,5%). Si presume che questo dato possa essere stato acquisito dai veterinari in seguito al numero di positività riscontrate alle analisi copromicroscopiche e/o anatomopatologiche effettuate. Tuttavia, questa situazione seppure di pressione parassitaria apparentemente definibile non proprio grave, porta oltre il 60% degli allevatori a definire la dicroceliosi come una parassitosi molto importante.

Riguardo le modalità di diagnosi attuate, quella copromicroscopica è risultata più praticata, anche se "meraviglia" il fatto che un veterinario su 4 non ne faccia ricorso. La maggior parte dei professionisti fa riferimento a laboratori "istituzionali" (IZS) o dell'Università, mentre è risultato decisamente contenuto il ricorso ad analisi svolte direttamente dal veterinario (12,5%), che a nostro avviso potrebbe essere incrementato, non fosse altro che per abbreviare i tempi di diagnosi. Decisamente di difficile interpretazione è il dato relativo alle cariche parassitarie presenti misurate attraverso delle analisi copromicroscopiche quantitative (valutazione delle UPG): solo un professionista riporta il livello di UPG presente negli ovini degli allevamenti seguiti. È indubbio quindi che si renda maggiormente necessario richiedere con maggior "convinzione" un esame coprologico quantitativo ai laboratori, per acquisire un dato essenziale per una corretta valutazione nella pianificazione o meno di un intervento antelmintico; in tal senso quindi preoccupa questa carenza di informazione tra i veterinari. Abbastanza buono il ricorso all'esame anatomo-patologico (66,7% dei casi), anche se forse, considerando soprattutto il limite dell'analisi coprologica nel caso di infestioni causate da un numero non elevato di elminti ( $\leq$  a 100) (Ambrosi, 1995), sarebbe opportuno incrementare anche questo tipo di indagine. Soprattutto a riguardo preoccupa la totale assenza di informazioni acquisite al mattatoio, che per questa parassitosi dovrebbe confermare il suo ruolo di osservatorio epidemiologico privilegiato in quanto a costo zero, assolutamente affidabile e attuabile in tempo reale. Purtroppo però in Sardegna la presenza di altre infestioni, quali l'Echinococcosi cistica, che comporta l'esclusione "automatica" del fegato dell'ovino adulto dal commercio, rende impossibile l'acquisizione di tale dato (il fegato viene direttamente avviato alla distruzione senza talvolta essere esaminato in modo appropriato per il riscontro di questa parassitosi dal veterinario ispettore). Così, come già auspicato in altre sedi (Scala, 2006), si renderebbe opportuno intraprendere delle relazioni "più forti" tra veterinario ispettore e veterinario aziendale per l'acquisizione di questi dati utili per la pianificazione di interventi antiparassitari razionali.

La diagnosi effettuata esclusivamente su basi sintomatiche appare, in considerazione della pressione parassitaria presente sul territorio (Scala, 1991; Scala, 2000) forse un po' azzardata, soprattutto in assenza di ulteriori riscontri diagnostici. Inoltre il riportare quale sintomo principale l'edema sottomandibolare ci lascia, anche in base alla nostra esperienza, quantomeno un po' perplessi sul riconoscimento su basi esclusivamente sintomatiche della parassitosi! In questo senso potrebbero essere interpretati a nostro avviso anche i sintomi tipo ittero e subittero riportati dai veterinari intervistati.

Per ciò che riguarda invece la scelta del principio attivo ci troviamo effettivamente di fronte al momento attuale a delle scelte per certi versi "obbligate", non essendo molte le molecole efficaci a disposizione sul mercato italiano. Si è passati infatti dall'uso negli anni '60/'70 del tiabendazolo che alla dose di 110 mg/kg pv aveva per Arru et al. (1967) un'"azione evidente", diminuendo notevolmente gli esemplari del trematode a livello epatico, mentre aveva un effetto "quasi completo" al dosaggio di 210 mg/kg pv, eliminando in questo caso i parassiti da quasi tutti gli ovini trattati. Successivamente l'arma efficace era data dal tiofanato, probenzimidazolico che già alla dose di 50 mg/kg pv era risolutivo (Ambrosi, 1995), ma attualmente non è più disponibile in commercio. La terapia nei confronti di questa parassitosi viene per cui ristretta a l'uso dell'albendazolo o del netobimin, probenzimidazolico che viene trasformato in albendazolo e che secondo Veneziano et al. (2006) risulterebbe efficace al 96,4%, o del closantel, che sembrerebbe attivo nei confronti di *D. dendriticum* già alla dose normale di 5 mg/kg pv (Ambrosi 1995). Non è invece proponibile l'uso di altre molecole quali il mebendazolo, febendazolo, febantel e praziquantel che agirebbero nei confronti del trematode esclusivamente a dosi elevatissime non praticabili.

In Sardegna i trattamenti antielmintici per la Dicroceliosi risultano attuati perlopiù "strategicamente" (32,8%) e solo in ¼ circa dei casi (25,7%) in base ai rilievi copromicroscopici, forse anche a causa delle difficoltà inerenti il riscontro delle uova vista la "pesantezza" dell'uovo, che risponde in modo differente alle varie metodiche utilizzate (Cringoli et al., 2004) e alle dinamiche legate alla scarsa o nulla eliminazione di uova in infestioni date da meno di 100 elminti in localizzazione. Appare corretto l'uso della molecola ad eccezione di un trattamento attuato con mebendazolo e di un altro "poco chiaro" a base di clorsulon/closantel.

Piuttosto appaiono estremamente variegati i protocolli attuati che prevedono l'uso di tali molecole nei confronti della Dicroceliosi a dosi nettamente più elevate rispetto a quelle standard che agiscono nei confronti dei nematodi gastro-intestinali e che, come nel caso dell'albendazolo micronizzato prevede un ulteriore trattamento a distanza di 7 giorni dal primo per ottimizzare il grado di efficacia (Bosco et al., 2012). In effetti l'albendazolo micronizzato raggiunge a 30 giorni dal trattamento una efficacia pari al 96,5%, mentre nel caso della ripetizione dello stesso a 7 giorni si raggiunge un'efficacia, sempre a 30 giorni del 99% (Bosco et al., 2012). In molti casi si opta per un trattamento a dosi corrette, ma non si procede al secondo trattamento, o se lo si fa solo nel 22,2% dei casi avviene entro i termini appropriati indicati dal produttore del farmaco utilizzato (7 giorni). È evidente che i protocolli terapeutici attuati in molti casi non risultino ottimali sotto l'aspetto epidemiologico, in quanto allevatore e veterinario si convincono di avere a che fare dopo i trattamenti con delle greggi "pulite" per il *D. dendriticum*, ma che a livello pratico continuano invece a eliminare nell'ambiente un ampio numero di uova, rendendo quindi i pascoli più pericolosi.

**CONCLUSIONI** - Concludendo possiamo affermare, visti i risultati ottenuti, che per una maggior razionalizzazione degli interventi antielmintici nei confronti della Dicroceliosi ovina attuati in Sardegna sarebbe auspicabile approntare delle linee guida più chiare e scientificamente più complete da sottoporre con più determinazione all'attenzione dei veterinari che operano sul campo. In effetti non a tutti i professionisti risulta noto del perché l'albendazolo micronizzato necessita secondo il foglietto illustrativo di un ulteriore trattamento dopo una settimana, mentre tale raccomandazione non esiste per l'albendazolo sulfossido e per il netobimin. In effetti non è a tutti noto il fatto che nell'ovino la farmacocinetica dell'albendazolo micronizzato a 10 mg/kg p.v. per via orale è caratterizzata dalla comparsa di un picco ematico a 20 ore dalla somministrazione, che scompare completamente a 72 ore, tuttavia segue a questo trend una riserva ruminale di molecola attiva che segue per altre 72 ore. Quindi, alla luce di quanto riportato, ripetere il trattamento dopo 7 giorni dal primo "potenzerebbe" in modo significativo l'azione di questa molecola. Sarebbe inoltre necessario proporre con maggior chiarezza e convinzione ai laboratoristi la richiesta specifica di analisi per *D. dendriticum* in modo da utilizzare metodiche copromicroscopiche quantitative che possano meglio "fotografare" lo stato sani-

tario del gregge in quel momento e incoraggiare sempre di più l'uso del referto anatomico-patologico acquisito anche al mattatoio. In questo modo, in considerazione anche del fatto che in Sardegna per il momento non sono stati rilevati fenomeni di antielmintico resistenza nel settore ovino (Scala et al., 2006), ai dubbi dei veterinari pratici inerenti il trattamento di questa "difficile" parassitosi possano essere forniti degli strumenti conoscitivi più appropriati.

*Si ringraziano per la collaborazione i Veterinari che hanno consentito la compilazione dei questionari indispensabili per l'attuazione della presente indagine.*

#### ■ A questionnaire survey on anthelmintic treatments against Dicrocoeliosis in sheep breeding countries like Sardinia

**Key words:** *Dicrocoelium dendriticum*, sheep, anthelmintic treatments.

#### Bibliografia

- Ambrosi M. (1995), Parassitologia Zootecnica. Edagricole, Bologna.
- Arru E., Deiana S., Casu S. (1967), Azione del tibenazolo nella strongilosi gastro-intestinale e nella dicroceliosi degli ovini. *Veterinaria italiana*, 18, 536-562.
- Cringoli G., Rinaldi L., Veneziano V., Capelli G., Scala A. (2004), The influence of flotation solution, sample dilution and the choice of McMaster slide area (volume) on the reliability of the McMaster technique in estimating the faecal egg counts of gastrointestinal strongyles and *Dicrocoelium dendriticum* in sheep. *Veterinary Parasitology*, 123, 121-131.
- Bosco A., Rinaldi L., Salamina V., Santaniello M., Morgoglione M. E., Guariglia I., Cappelli G., Cringoli G. (2012), Prova controllata di campo sull'efficacia dell'albendazolo micronizzato verso *Dicrocoelium dendriticum* in ovini naturalmente parassitati, Congresso SIPAOC. In press.
- Sanna E., Garippa G., Asoni G. (1989), Attuale diffusione delle parassitosi ovine in Sardegna. *Atti SISVET*, 43, 1299-1302.
- Scala A. (1991), Dicrocoeliosi ovina in Sardegna: tassi di prevalenza, lesioni anatomo-istopatologiche e tests ematochimici. *Atti FEMESPRUM*, 1, 209-214.
- Scala A., Espa A., Miculan A., Barbieri A. (2000), A parasitological survey on sheep slaughtered in the province of Cagliari (Italy). *Book of proceedings 8th International Congress FEMESPRUM*, 8, 239-243.
- Scala A. (2006), L'esame parassitologico diretto e la sua razionale applicazione. *Atti SIPAOC*, 17, 134-137.
- Scala A., Nieddu M.S., Urrai G., Maricosu G., Contini L., Polinas L., Tanda B., Basciu M., Sanna-Coccone G.N., Fiori I., Pilo C. (2006), Evaluation of the efficacy of anthelmintic treatments against sheep gastro-intestinal nematodes in Sardinia. *Parassitologia*, 48(1-2), 199.
- Veneziano V., Santaniello M., Schippi M., Morgoglione M.E., Rufrano D., Cringoli G. (2006), Field trial on the efficacy of netobimin against *Dicrocoelium dendriticum* in naturally infected sheep. *Parassitologia*, 48(1-2), 202.



**Strategie alimentari e  
problematiche associate  
alla destagionalizzazione del ciclo  
riproduttivo nei piccoli ruminanti**

# La destagionalizzazione della produzione di latte ovino e caprino: aspetti economici, tecnici ed alimentari



A. CANNAS<sup>1</sup>, A. MEREU<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Agraria, Sezione di Scienze Zootecniche, Università di Sassari, Italia

<sup>2</sup> Attuale indirizzo: LUCTA SA, Ctra. Masnou - Granollers, km. 12,400. Montornés del Vallés, Spagna

**Parole chiave:** destagionalizzazione, latte, ovini, caprini.

**INTRODUZIONE** - Negli ultimi decenni il settore ovino e caprino italiano ha mostrato notevoli avanzamenti tecnici, quali quelli indotti dal miglioramento delle tecniche di selezione genetica, di alimentazione, riproduttive, dal miglioramento della prevenzione e del trattamento delle principali patologie, dalla diffusione della mungitura meccanica e della refrigerazione del latte.

A fronte di questi avanzamenti non si è però riscontrato un significativo miglioramento dei cicli produttivi, quasi sempre stagionali e limitati al solo periodo autunno-primaverile. Ciò comporta una serie di limitazioni nel miglioramento della redditività di questo settore.

**LA STAGIONALITÀ DELLA PRODUZIONE DEL LATTE** - L'allevamento ovino e caprino da latte italiano, ed in particolare quello delle aree più meridionali, è caratterizzato principalmente da aziende che attuano un sistema di allevamento semi-intensivo o semi-estensivo, contraddistinto da due condizioni: I) ricorso sistematico al pascolamento per gran parte dell'anno; II) elevata concentrazione stagionale dei parti (novembre-dicembre per le pluripare e febbraio-marzo per le primipare). In questo sistema le produzioni di latte vanno dall'inizio dell'inverno fino ad inizio-metà estate, con una durata della lattazione che si aggira, nel caso degli ovini, intorno ai 210-240 giorni per le pluripare e di 120-150 giorni per le primipare (Fois e al., 1999). La produzione di latte segue quindi un andamento parallelo alla naturale produzione foraggera dei pascoli in ambiente mediterraneo asciutto.

In Sardegna, ad esempio, il 75% del latte viene conferito ai caseifici nel periodo gennaio-maggio, con picchi particolarmente elevati nei mesi di marzo ed aprile (35% del totale dei conferimenti) (ARA Sardegna, 2008).

L'utilizzazione diretta dell'erba inizia durante il periodo autunnale, in corrispondenza del primo picco di produzione di erba. Durante la stagione invernale la produzione foraggera subisce un rallentamento strettamente legato alle temperature. Durante questo periodo anche le produzioni di latte subiscono spesso una flessione, soprattutto se l'alimentazione al pascolo non viene integrata correttamente con l'uso di concentrati e foraggi conservati. La produzione di latte prosegue poi durante la primavera, stagione durante la quale si verificano contemporaneamente la più alta produzione di latte (dovuta anche all'apporto delle pecore primipare) e le massime produzioni quanti-qualitative dei pascoli. Con il progressivo decadimento qualitativo dei pascoli la produzione di latte diminuisce fino al periodo estivo, durante il quale inizia la fase di asciutta e l'alimentazione è basata sul pascolamento di stoppie. Questo ciclo di produzione descritto non è quello naturale delle pecore allevate in ambiente mediterraneo. Infatti, l'originaria tecnica di allevamento si basava su una stagione di accoppiamento autunnale con parti a fine inverno-inizio primavera, più ritardati nel caso delle capre. Il sistema seguiva quindi il naturale ciclo sessuale delle pecore e delle capre, con poliostro stagionale discontinuo caratterizzato da un'attività sessuale favorita nelle stagioni a fotoperiodo decrescente. Dalla fine del XIX secolo, con l'aumentare della domanda di prodotti trasformati e con la progressiva industrializzazione del processo produttivo, si è sentita l'esigenza di rivedere questo modello di riproduzione, che limitava le produzioni al solo periodo primaverile-estivo (Paoli, 1997). L'attuale modello di produzione è stato reso possibile dalla posizione geografica dell'Italia (latitudine intermedia), dal miglioramento dei regimi alimentari e, molto più recentemente, dall'avvento dei progestageni per la sincronizzazione dei calori (Fois e al., 1999).

Un caso diverso è quello degli allevamenti caprini intensivi specializzati, dove è comune la destagionalizzazione delle produzioni, con parti autunnali e tardo-primaverili od estivi.

## PRINCIPALI PROBLEMI TECNICI ED ECONOMICI LEGATI ALLA STAGIONALITÀ DELLE PRODUZIONI

- Il sistema di produzione stagionale ha mostrato nel tempo dei limiti, riguardo all'efficienza delle strutture di trasformazione, alla commercializzazione dei prodotti ed all'organizzazione aziendale, che rischiano di rallentare lo sviluppo dell'intero settore ovi-caprino e di renderlo meno competitivo rispetto ad altre nazioni che propongono latte e prodotti trasformati durante tutto l'anno.

**Problemi per le industrie di trasformazione** - La ciclicità della produzione comporta elevati conferimenti di latte per 4-5 mesi all'anno, bassi conferimenti per altri 3-4 mesi ed interruzione degli stessi per almeno 4 mesi (da inizio-metà estate a parte dell'autunno). Di conseguenza le industrie di trasformazione sono costrette, in questo periodo, ad operare a regimi molto ridotti, fatto che genera delle pesanti disconomie. Queste sono fortemente legate alla necessità di dimensionare le macchine e gli impianti per far fronte al periodo di massima raccolta e trasformazione di latte (primavera), per cui il loro sfruttamento a pieno regime, e quindi nelle condizioni economicamente più efficienti, è limitato ai pochi mesi primaverili. Ciò comporta che per litro di latte trasformato si abbiano elevati costi di ammortamento e di manutenzione, nonché costi elevati di esercizio nei mesi con conferimenti medio-bassi. Questo sistema favorisce anche la tendenza a produrre formaggi a lunga maturazione, per ridurre i problemi connessi alla commercializzazione di quantità ingenti di formaggi in periodi ristretti. A questo si aggiunge la precarizzazione del lavoro, causata dall'elevato ricorso al manodopera stagionale poco qualificata.

Per far fronte alla forte stagionalità dei conferimenti alcune aziende casearie congelano il latte o le cagliate nei mesi di massimo conferimento, per utilizzarle poi quando la disponibilità di materia prima è limitata. Ciò comporta però costi di investimento ed energetici molto elevati e produzione di formaggi da latte congelato spesso per lunghi periodi, con perdite qualitative talvolta consistenti.

Problemi simili vengono affrontati anche da tutte le altre attività economiche che contribuiscono alla filiera (ad es. industrie mangimistiche, fornitori di beni e servizi agricoli).

## Problemi legati alla commercializzazione dei prodotti caseari

- Come noto, negli ultimi decenni i consumatori hanno sempre più privilegiato prodotti caseari freschi o a breve maturazione, soprattutto nei periodi più caldi dell'anno. Benché esistano fasce di consumatori che invece privilegiano prodotti a lunga maturazione, di fatto il consumo di queste tipologie di formaggi è troppo basso per garantire un adeguato sbocco commerciale alla grande quantità di latte ovino e caprino prodotto in Italia. In questo scenario la necessità di assicurare la continuità di produzione di latte ovino e caprino durante l'anno appare una condizione fondamentale per assecondare le preferenze della maggioranza consumatori.

La produzione di latte destagionalizzata consentirebbe di sfruttare il ricco mercato turistico estivo di prodotti caseari freschi o a breve maturazione. È abbastanza paradossale che proprio nel periodo di maggiore richiesta di queste tipologie di prodotti caseari da parte dei turisti non siano disponibili in quantità sufficienti quelli ottenuti con latte ovino e caprino. Queste tipologie di prodotti sono quelle che hanno fatto la fortuna del settore ovino e caprino della Grecia e della Spagna, che producono pochissimi formaggi a lunga maturazione e che pagano il latte con prezzi notevolmente superiori a quelli medi italiani. Il consumo di prodotti caseari ovini e caprini durante l'estate beneficia grandemente la filiera anche in termini pubblicitari, perché li fa conoscere a consumatori che poi nelle loro località di origine li cercheranno e consumeranno anche nel resto dell'anno. Questo presuppone la disponibilità per tutto l'anno di prodotti caseari freschi o a breve maturazione fatti con latte

ovino e caprino, fatto particolarmente importante anche per garantire l'approvvigionamento della grande distribuzione organizzata, che ormai detiene le quote di mercato maggiori anche nel caso dei formaggi ovis e caprini.

**Problemi dovuti al decadimento della qualità del latte** - Secondo il modello tradizionale di produzione di latte ovino e caprino, la stagione estiva coincide con la fine della lattazione e la produzione di un latte con caratteristiche organolettiche differenti rispetto al latte prodotto all'inizio della lattazione. Il decadimento della qualità e della produzione del latte è dato da fattori di natura fisiologica e di natura alimentare. L'asciugamento che si verifica in corrispondenza del sopraggiungere dell'estate è determinato dalla prevalenza del processo di involuzione cellulare su quello di differenziazione ed è controllato dal processo enzimatico plasmina-plasminogeno, che produce lo scollamento delle cellule dell'epitelio secretivo e la loro stasi secretiva (Cannas et al., 2002). Questo processo riduce l'integrità dell'epitelio mammario, causando l'ingresso di lattosio nel sangue e di sieralbumina nel latte. Questo scambio tra sangue e latte determina un'alterazione dell'equilibrio ionico del latte, che si riflette negativamente sulla sua attitudine casearia, già aggravata dall'attività proteolitica della plasmina. Se è quindi vero che questo processo di involuzione cellulare è inevitabile, è altrettanto vero però che questo può essere accelerato da vari fattori, tra i quali il più importante è l'errata o insufficiente alimentazione (Pulina et al., 1996; Cannas et al., 2002). Negli allevamenti ovis e caprini spesso la fase finale della lattazione coincide con l'estate, periodo di scarsa disponibilità alimentare. L'alterazione della qualità del latte prodotto a fine lattazione dipende anche da un'altra serie di ragioni:

- nei mesi di giugno-luglio, corrispondenti al periodo di fine lattazione, le erbe dei pascoli e degli erbai non irrigui raggiungono lo stadio di maturità, caratterizzato da elevate concentrazioni di fibra poco digeribile e da basse concentrazioni di proteine. La carenza energetica delle diete e, soprattutto, quella proteica, determinano una alterazione della caseina, con peggioramento complessivo delle caratteristiche casearie del latte. Nelle aziende dotate di irrigazione, invece, il latte prodotto a fine lattazione è generalmente di buona qualità, perché l'elevata ingestione di erba verde garantisce un buon apporto di energia e proteine;
- per effetto dei bassi livelli produttivi tipici della fase finale di lattazione, il latte ha un'elevata concentrazione di grasso ed un rapporto grasso: proteine superiore ad uno. Ciò comporta che i formaggi prodotti in questa fase abbiano una forte tendenza a manifestare l'irrandimento del grasso, fatto che ne deprezza notevolmente le caratteristiche organolettiche ed il valore commerciale. Ciò accade perché parte del grasso non viene incapsulato dalla caseina al momento della formazione della cagliata. Un'altra concausa è, nelle aziende che producono latte in estate usando razioni secche, la carenza di vitamina E, generalmente apportata dall'erba verde, che con le sue proprietà antiossidanti riduce i fenomeni di irrandimento;
- basse concentrazioni, derivate dall'uso di razioni secche, di sostanze a funzione nutraceutica, come gli isomeri dell'acido linoleico coniugato (CLA). I CLA sono una famiglia di acidi grassi insaturi che hanno mostrato in modelli animali di avere numerosi effetti positivi, fra cui una forte azione anti-carcinogenica, sia quando ingeriti col latte che col formaggio. Tuttavia questi acidi grassi sono presenti nel latte in elevate concentrazioni quando la dieta è costituita prevalentemente da erba verde (che è ricca di acidi grassi polinsaturi, precursori dei CLA) o quando nella dieta sono inclusi oli ricchi di acido linoleico e linolenico (ad. es. olio di soia o di girasole);
- nella fase finale di lattazione aumenta la concentrazione in cellule somatiche del latte, che notoriamente influenzano negativamente la coagulazione del latte e lo spurgo del siero e quindi la qualità dei formaggi (Pulina et al., 2006).

**Problemi per le aziende ovine e caprine** - L'attuale ciclo produttivo ha permesso alle aziende ovine e caprine di dilatare nel tempo la produzione di latte dal periodo primaverile-estivo a quello autunnale-estivo. Tuttavia la gestione del gregge e la distribuzione del lavoro durante l'anno non sono esenti da problematiche che, allo stato attuale, possono incidere considerevolmente sui risultati economici delle aziende.

Innanzitutto questo tipo di sistema di allevamento si basa sulla gestione di due diversi "gruppi" di animali, le pluripare e le primipare. Questo comporta la presenza nel gregge di stagioni riproduttive diverse, una autunnale e una primaverile. Tuttavia, da questo punto di vista la stagione che richiede il maggior impegno lavorativo da parte dell'allevatore è quella autunnale, quando si verificano circa l'80% dei parti, con

un'intensità di lavoro che spesso costringe gli allevatori a ricorrere a manodopera esterna.

Inoltre, l'elevata concentrazione dei parti di pluripare in autunno-inizio inverno porta ad una elevatissima disponibilità di agnelli da macello nel periodo invernale, con un valore commerciale che si deprezza fortemente e molto velocemente subito dopo Natale, quando inevitabilmente, per la scalarità dei parti, ci sono ancora molti agnelli da latte in età da macello. Paradossalmente, durante il periodo estivo, quando il mercato turistico ed agri-turistico richiede quantità molto elevate di agnelli da latte, che verrebbero pagati a prezzi elevati, sono disponibili quasi esclusivamente agnelli congelati o di importazione.

Un altro problema strettamente legato alla stagionalità della produzione di latte ovino è il lungo periodo di improduttività (circa 4 mesi), durante il quale l'azienda sostiene molti costi senza però avere dei ricavi. Fatto aggravato dalla necessità di sostenere i costi di coltivazione tipici dell'inizio dell'annata agraria. Tutto ciò favorisce l'indebitamento delle aziende ed il ricorso a prestiti spesso molto onerosi.

#### **POSSIBILI SOLUZIONI TECNICHE PER LE AZIENDE OVINE E CAPRINE**

Le soluzioni tecniche al problema della stagionalità del ciclo di produzione e dei conferimenti del latte ed alla possibilità di attuare una produzione continua di latte per tutto l'anno sono principalmente tre: migliorare la produzione di latte di fine lattazione; far partorire parte del gregge in primavera; far partorire parte del gregge in estate.

Le diverse tecniche sono state esplorate in Italia da numerosi gruppi di ricerca. Per brevità, di seguito verranno valutati alcuni aspetti delle tecniche proposte. Per una trattazione più esaustiva si rimanda alle altre pubblicazioni presentate su questo tema in questo convegno.

**Allungamento della lattazione** - Il miglioramento quanti-qualitativo della produzione di latte in estate, mediante un migliore sfruttamento della parte finale della lattazione di animali partoriti nell'autunno o inverno precedenti, consentirebbe di aumentare la produzione estiva di latte senza modificare i sistemi di allevamento e riproduzione tradizionali. La fattibilità tecnica ed economica della produzione di latte a fine lattazione durante l'estate è stata studiata dal nostro gruppo di ricerca in quattro aziende, tre in asciutto ed una in irriguo, della provincia di Oristano, nell'ambito di un progetto di ricerca finalizzato a favorire la destagionalizzazione della produzione di latte ovino (Cannas et al., 2008). I risultati di questa ricerca (Carta, 2007; Cannas et al., 2008) hanno messo in evidenza che nelle aziende in asciutto per avere buone produzioni di latte a fine lattazione (mesi di luglio ed agosto) era necessario ricorrere ad elevate integrazioni alimentari (foraggi conservati e concentrati). Ciò ha però comportato costi di alimentazione e di produzione del latte troppo elevati rispetto al valore commerciale del latte, con ricavi al netto dei costi alimentari vicini a zero, in particolare nel mese di agosto. Questi costi potrebbero essere in parte ridotti utilizzando per la produzione di latte estivo solo gli animali più produttivi di ciascun gregge, posto però che le produzioni totali delle aziende siano sufficienti per giustificare i costi di raccolta del latte. Migliori, anche se non esaltanti, sono stati i risultati economici dell'azienda dotata di irrigazione, e quindi di foraggi verdi durante l'estate, con ricavi al netto dei costi alimentari intorno a 0.25 €/kg di latte prodotto. In questa ricerca sono stati evidenziati anche l'elevato tenore in grasso del latte prodotto a fine lattazione, squilibrato in rapporto al suo contenuto proteico, e la scarsa attitudine alla caseificazione dello stesso latte.

**Produzione di latte con parti primaverili** - Un'altra possibilità per destagionalizzare la produzione di latte si basa sul ritardare a fine inverno il parto di parte delle pecore pluripare, sincronizzandolo con quello delle primipare. In questo modo si potrebbero avere nelle aziende ovine e caprine due greggi numericamente abbastanza omogenee, uno con parto autunnale, l'altro con parto primaverile. Quest'ultimo verrebbe utilizzato per produrre latte anche in estate, periodo nel quale si troverebbe in fase intermedia di lattazione.

Questa tecnica è stata ampiamente studiata su ovis di razza Sarda da Piras (2006) dell'agenzia AGRIS, che ha evidenziato come fosse possibile avere produzioni di latte piuttosto elevate per tutta l'estate facendo partorire le pecore ad inizio primavera. Il punto di forza di questo modello produttivo si basa sul fatto che il picco di lattazione coincide perfettamente con la stagione di massima produzione foraggera (piena primavera), per cui in questa fase i costi alimentari sono molto bassi. Il principale limite del modello consiste nel fatto che, destinando una parte delle pluripare del gregge al parto in periodo primaverile, si aumentano ulteriormente i conferimenti di latte alle aziende casearie proprio nel periodo in cui lavorano le maggiori quantità di latte. Inoltre, negli anni con la festività della Pasqua anticipata, si corre il

rischio di dover vendere agnelli dopo questa festività, con valori di mercato molto bassi.

**Produzione di latte con parti estivi** - Un'altra possibile soluzione al problema della stagionalità della produzione di latte ovino è rappresentata dall'inseminare parte del gregge ad inizio inverno (dicembre-gennaio), per avere parti ad inizio estate. Ciò permetterebbe di avere una vera e propria destagionalizzazione delle produzioni, con due periodi di mungitura complementari: quello tradizionale, da dicembre a luglio, e quello destagionalizzato, da luglio-agosto ad aprile. In alcune regioni italiane (Toscana, Lazio e Basilicata) questa è una tecnica abbastanza diffusa, come anche in Spagna e in Israele (Cannas e Mereu, 2006). In Sardegna ed in Sicilia, le regioni col maggiore numero di pecore da latte, essa è invece raramente utilizzata per gli ovini ed i caprini da latte estensivi, mentre è abbastanza diffusa negli allevamenti caprini da latte di tipo intensivo.

La valutazione della fattibilità tecnico-economica della produzione destagionalizzata di latte ovino nelle condizioni della Sardegna è stata studiata in un'azienda in asciutto della provincia di Oristano (Cannas et al., 2008; Mura, 2008). Quest'azienda attuava volontariamente, già prima dell'inizio delle ricerche, un ciclo produttivo destagionalizzato, con parte del gregge che seguiva il ciclo tradizionale (parti autunnali, circa 200 pecore) e parte che invece partoriva nel mese di luglio (circa 100 pecore) e quindi produceva latte prevalentemente in estate e in autunno. L'azienda è stata monitorata per due anni, al fine di raccogliere i dati necessari per la stima analitica della sua produzione lorda vendibile (PLV) e dei suoi costi di produzione. I due greggi aziendali (di seguito chiamati autunnale ed estivo) erano gestiti dal solo proprietario, che faceva ricorso a manodopera esterna solo in maniera del tutto occasionale. Le stime economiche sono state condotte con i prezzi del 2008, abbastanza simili a quelli del 2012 per quanto riguarda il costo degli alimenti zootecnici ed il valore del latte. L'azienda studiata era socia di una cooperativa della provincia di Oristano, che nel 2008 pagava il latte conferito da agosto a novembre 10 centesimi di euro in più (0.83 €/kg latte) rispetto al latte conferito nel resto dell'anno (0.73 €/kg latte).

I risultati della ricerca hanno evidenziato che:

- la fecondazione di pecore di razza Sarda nei mesi invernali, ed il conseguente parto ad inizio estate, non ha evidenziato impedimenti biologici e tecnici; anzi gli animali del gregge estivo sono arrivati al parto con uno stato di ingrassamento corporeo ottimale, poiché negli ultimi mesi della gravidanza hanno avuto a disposizione l'erba dei pascoli primaverili;
- la produzione di latte munto per pecora in lattazione era mediamente di circa 220 kg/lattazione, senza rilevanti differenze associabili alla stagione di parto;
- i costi di produzione per litro di latte (inclusivi di tutti i costi fissi e variabili dell'azienda) sono stati superiori nel gregge estivo rispetto a quello autunnale (1.13 €/litro vs. 1.01 €/litro), per effetto del maggior ricorso ad alimenti concentrati e a fieno durante la fase iniziale di lattazione, solo parzialmente compensata dai bassi costi alimentari (per la elevata disponibilità autunnale di erba) per il resto della lattazione;
- il ricavo lordo per litro di latte (inclusi i benefici derivanti dalla vendita degli agnelli e delle pecore di scarto e le contribuzioni comunitarie e regionali) è stato superiore nel gregge estivo rispetto a quello invernale (1.25 €/litro vs. 1.13 €/litro), per effetto della maggiore PLV derivante dal maggiore valore commerciale del latte e dal maggior valore degli agnelli venduti a carne nel periodo estivo;
- in entrambe le greggi il ricavo lordo per litro di latte munto è stato superiore al costo di produzione del latte (0.12 €/litro per entrambi i greggi) solo per effetto delle contribuzioni comunitarie e regionali ricevute dall'azienda. Quando queste sono state detratte dai conteggi, la differenza ricavi-costi di produzione è risultata negativa (-8 e -10 centesimi di €/litro per il gregge estivo ed autunnale, rispettivamente);
- siccome l'azienda non era dotata di aree irrigue, i costi di alimentazione durante il periodo estivo sono stati particolarmente elevati, per la necessità di dover alimentare gli animali con alimenti conservati per i primi 4 mesi di lattazione. Per questa ragione è stata fatta una simulazione, ipotizzando che per ogni 100 capi fosse disponibile 1 ha di prato di medica irriguo, da utilizzare col pascolamento. I dati ottenuti hanno dimostrato che ciò consentirebbe di ridurre di 10 centesimi di € al litro (media di lattazione) il costo di produzione del lat-

te, portando in pareggio la differenza tra ricavi al netto dei sussidi e costo di produzione del latte;

- l'allevatore ha segnalato che per lui uno dei principali vantaggi della coesistenza di un gregge estivo e di uno autunnale era quello di consentire una migliore distribuzione del lavoro nell'arco dell'anno, riducendo i periodi nei quali potrebbe essere necessario ricorrere a manodopera esterna. Per evidenziare l'incidenza del costo del lavoro sull'efficienza economica dell'azienda, i costi di produzione del latte sono stati ricalcolati ipotizzando l'assunzione di un operaio (la cui retribuzione è stata calcolata sulla base del contratto nazionale per operai generici) per 6 mesi all'anno. I risultati hanno evidenziato che il costo di questa manodopera aggiuntiva determinerebbe un aumento considerevole del costo di produzione del latte (circa 10-12 centesimi di € per litro di latte), sino a renderlo veramente eccessivo sia nel gregge estivo che in quello autunnale.

**CONCLUSIONI** - L'introduzione nelle aziende ovine e caprine di cicli produttivi destagionalizzati potrebbe consentire di migliorare la redditività delle aziende, portando a vantaggi tecnici ed economici per tutta la filiera.

Questa tecnica non pone problemi di tipo biologico, ma la sua introduzione deve comunque essere attentamente ponderata. Andrebbe applicata principalmente nelle aziende che già manifestano le migliori capacità manageriali e che hanno a disposizione delle superfici in irriguo, da utilizzare durante la stagione secca. In aggiunta, è necessario che le industrie private e le cooperative casearie di trasformazione garantiscano premi specifici per il latte conferito nel periodo estivo-autunnale. Questi maggiori oneri a carico delle industrie casearie verrebbero ampiamente compensati dai vantaggi derivanti dalla più regolare utilizzazione degli impianti di trasformazione e dalla possibilità di garantire per tutto l'anno la disponibilità di prodotti caseari freschi o a breve maturazione.

#### ■ Aseasonal sheep and goat milk production: economical, technical and nutritional insights

**Key words:** aseasonality, milk production, sheep, goats.

#### Bibliografia

- ARA Sardegna (1998). Annuario. ARA Sardegna, Cagliari.
- Cannas R., Mereu A. (2006). Relazione Preliminare del progetto di ricerca "Individuazione di nuove tipologie di produzioni casearie destagionalizzate che integrino le attuali e che siano da un lato richieste dal mercato e dall'altro compatibili con le caratteristiche tecniche della produzione del latte". SIL, Oristano.
- Cannas R., Mereu A., Campus R. (2008). Relazione Finale del progetto di ricerca "Individuazione di nuove tipologie di produzioni casearie destagionalizzate che integrino le attuali e che siano da un lato richieste dal mercato e dall'altro compatibili con le caratteristiche tecniche della produzione del latte". SIL Oristano.
- Cannas A., Nudda A., Pulina G. (2002). Nutritional strategies to improve lactation persistency in dairy ewes. *Proceed. of the 8th Great Lakes Dairy Sheep Symposium, Cornell University, Ithaca, New York*: 17-59.
- Carta D. (2007). Prove di destagionalizzazione della produzione di latte ovino. Tesi di laurea, Facoltà Agraria dell'Università di Sassari.
- Fois N., Rattu S.P.G., Ligios S., Nudda A., Pulina G. (1999). La destagionalizzazione della produzione di latte ovino. *L'Informatore Agrario*, 25: 43-47.
- Mura I. (2008). Destagionalizzazione della produzione di latte ovino in un'azienda della Provincia di Oristano. Tesi di laurea, Facoltà Agraria dell'Università Sassari.
- Paoli J.C. (1997). *Patrons et bergers sardes: origine et transformation d'un élevage ovin méditerranéen*. Tesi dottorato, Institut National Agronomique, Paris-Grignon.
- Piras M. (2006). Continuous sheep milk production in Sardinia. Tesi di dottorato, Università di Sassari.
- Pulina G., Nudda A., Battacone G., Cannas A. (2006). Effects of nutrition on the contents of fat, protein, somatic cells, aromatic compounds, and undesirable substances in sheep milk. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 131: 255-291.
- Pulina G., Nudda A., Casoli C., Duranti E., Ranucci S., Morgante M., Campus L. (1996) - Fattori responsabili del decadimento della caseificabilità del latte ovino. *L'Informatore Agrario* 52(17): 35-41.

# Alcuni esempi di tecniche di destagionalizzazione dei calori negli ovini di razza sarda con particolare riferimento alla gestione dei maschi



M. DATTENA, G. MELONI, L. FALCHI, I.M. MAYORGA, M. GALLUS, S. SALARIS

Agenzia regionale per la ricerca in Agricoltura - Sardegna

**Parole chiave:** destagionalizzazione, pecore, allevamento, effetto maschio.

All'inizio del '900 l'allevamento ovino in Sardegna seguiva ancora il ciclo riproduttivo naturale con la stagione della monta in Autunno (Settembre-Ottobre) e i parti concentrati in tardo inverno (Febbraio-Marzo) (Fois et al., 1999).

Invece, al giorno d'oggi, in un allevamento convenzionale i parti tardo autunnali (Ottobre-Novembre) sono conseguenza di una stagione di monta che inizia a Maggio-Giugno in coincidenza della fisiologica ripresa dell'attività riproduttiva della pecora Sarda che, in Sardegna (40°-41° parallelo Nord), ha un periodo anaestrale breve, ma molto marcato (circa 60 giorni) compreso tra Marzo e Aprile (Manunta e Casu, 1968). Questi cambiamenti stagionali dell'attività riproduttiva della pecora sono stati conseguenza dell'industrializzazione del sistema (Paoli, 1997) che ha compreso tra le altre cose i) un cospicuo aumento del numero dei capi per azienda, ii) la sostituzione della mungitura manuale con quella meccanica, iii) un notevole allungamento dei giorni di mungitura da 120 fino anche a 240), iv) l'utilizzo degli ormoni per la sincronizzazione dei calori per il miglioramento genetico della razza ed infine come già detto v) lo spostamento dei parti in tardo autunno.

Questi cambiamenti, di per sé positivi, talvolta combinati con pratiche aziendali inefficienti hanno, negli anni, portato a diverse problematiche tra cui la difficoltà di gestire una buona concentrazione dei parti entro ottobre-novembre periodo entro il quale il ritorno economico è positivo.

L'Agris - Sardegna è stata coinvolta dalle associazioni degli allevatori (APA), per tentare di risolvere il su detto problema. È iniziata così un'indagine conoscitiva sulle pratiche di allevamento da cui è risultato, tra le altre cose, una carenza nella gestione degli arieti e del loro ridotto numero in rapporto alle femmine con addirittura una riduzione del numero dei maschi all'aumentare del numero delle pecore (dati non pubblicati).

Così dopo diversi incontri con gli allevatori, nel 2009 abbiamo iniziato un lavoro preliminare concordando con alcuni allevatori un protocollo di gestione dei maschi e delle femmine chiamato "Effetto Maschio" (Dattena et al. 2009) basato sull'isolamento dei maschi dalle femmine per almeno sei settimane prima della stagione riproduttiva, un aumento della concentrazione dei maschi nei gruppi di monta e un maggior monitoraggio dei salti (per esempio uso del pastello).

Questo protocollo è stato adattato e modificato a seconda delle diverse esigenze degli allevatori che hanno partecipato alla prova nel seguente modo: allevatore numero 1) gestione razionale dei maschi per avere circa la metà dei parti dell'allevamento entro la fine di Settembre per poter avere l'agnello di 30 giorni pronto per la vendita di "tuttisanti"; allevatore numero 2) gestione razionale dei maschi per avere parti a Novembre "agnello di natale"; allevatore numero 3) gestione dei maschi riproduttori per controllare la paternità; allevatore numero 4) gestione dei maschi per sincronizzare i calori e poter fare l'inseminazione artificiale per il miglioramento genetico.

Inoltre benché non fosse obiettivo della nostra indagine, al momento della presentazione dei risultati, abbiamo deciso di attuare un programma di divulgazione dei dati che potesse essere di impatto per gli allevatori con la presenza del così detto "allevatore -testimonial" ossia un allevatore che avendo, con il nostro protocollo, provato a concentrare le date dei parti nella sua azienda secondo le sue aspettative potesse alla fine della esposizione della relazione fornire ai colleghi suggerimenti e soluzioni. Questo metodo di divulgazione ha dato ottimi risultati ed è stato molto apprezzato dagli allevatori che per la stagione di monta 2011-2012 si sono prenotati numerosi per aderire al programma chiamato "Effetto maschio".

In conclusione un'attenta analisi dei dati, importanti modifiche di gestione dei maschi e non ultimo un metodo efficace di divulgazione dei risultati ha dato inizio ad una campagna di miglioramento nelle pratiche di gestione dei parti molto incoraggiante.

Ancora molto resta da fare per quanto riguarda studi sul comportamento degli arieti nel gregge e sulle capacità individuali dei maschi alla disponibilità alla monta e conseguente fertilità e sulla preparazione degli allevatori all'utilizzo di queste pratiche.

## Bibliografia

- Dattena M, Mayorga I, Mara L, Gallus M, Meloni G, Lai A, Cabiddu A, Salaris S (2010).  
 Inseminazione artificiale in un allevamento biologico ovino XIX 22-25 Settembre Congresso Nazionale S.I.P.A.O.C Pesaro, Coriano, Rimini (Italia) (Oral Communication and Abstract pg. 73).  
 Fois N. et al. (1999) *Informatore Agrario* 25/99 45-46.  
 Manunta G e Casu S (1968) *Zoot. Vet.*;23:249-256.  
 Paoli et al (1997).

## Lo stress da caldo: effetti sulle produzioni e strategie per fronteggiarlo



### A. SEVI

Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università di Foggia

**Parole chiave:** stress termico, produzione di latte, stato di salute, benessere.

Alcuni autori (Sevi et al., 2001; Caroprese et al., 2012) hanno evidenziato un marcato aumento della temperatura rettale e della frequenza respiratoria e un'alterazione del metabolismo e della produttività della pecora Comisana in seguito all'esposizione, anche per brevi periodi, a temperature medie giornaliere di 35 °C o in seguito all'esposizione prolungata a temperature medie giornaliere di 30°C. In tali condizioni si osserva un'alterazione del bilancio minerale (soprattutto a carico di magnesio, potassio, calcio e fosforo), una riduzione della produzione lattea e del suo contenuto in caseina ed in grasso (soprattutto a carico degli acidi grassi a catena lunga ed a carico della frazione insatura), un peggioramento della qualità igienico-sanitaria del latte (con aumento della concentrazione di neutrofilii, stafilococchi, coliformi e pseudomonadacee), un netto peggioramento dell'attitudine casearia del latte, da attribuire in parte alla riduzione del contenuto in calcio ed in fosforo ed in parte ad una più accentuata attività della plasmina, principale enzima proteolitico endogeno del latte (Sevi et al., 2004). Nella pecora Sarda la produzione lattea può subire una contrazione del 15%, se la temperatura ambientale massima supera i 21-24 °C, e una riduzione del 20%, se la temperatura minima passa da 9-12 °C a 18-21 °C (Peana et al., 2007). Quando è stato valutato l'effetto dell'ombreggiatura e dello spostamento dei pasti al tardo pomeriggio durante l'estate sulla composizione acidica del grasso del latte della pecora, è stata osservata un'azione benefica di entrambe le strategie sull'aumento della frazione insatura (Sevi et al., 2002b). In particolare, le pecore protette dalla radiazione solare hanno evidenziato una più elevata proporzione di acidi grassi insaturi ed a catena lunga, dovuta soprattutto ad un aumento degli acidi oleico, linoleico e linolenico e ad una parallela riduzione dell'acido caproico, caprico, laurico, miristico e stearico. Ciò ha prodotto un miglioramento del 4% nel rapporto tra acidi a catena lunga e a catena corta e del 13% nel rapporto tra acidi grassi insaturi e saturi.

Nella capra Al-Tamini (2007) ha osservato che soggetti esposti alla radiazione solare, in presenza di temperature massime giornaliere superiori ai 35 °C, presentano un aumento della frequenza respiratoria, della frequenza cardiaca e della temperatura rettale del 133, 12 e 1,5%, rispettivamente, rispetto ai soggetti che dispongono di zone ombreggiate. In assenza di riparo dalla radiazione solare diretta sono necessari 10-14 giorni alla capra per adattarsi allo stress termico, grazie ad adattamenti di tipo fisiologico (aumento della frequenza respiratoria e vasodilatazione periferica) ed alla modulazione dei pattern di alimentazione e di abbeverata. La riduzione dei livelli d'ingestione si attesta invece su valori compresi tra il 10 e il 60%, in relazione al diverso tipo genetico, quando la temperatura ambientale passa da 20 a 40 °C (Lu, 1989). In tali condizioni si verifica nella capra anche una marcata alterazione del bilancio minerale e del profilo ormonale. In capre gravide lo stress termico può indurre anche accentuati fenomeni di polidipsia (Olsson et al., 1995). Le capre adattate a vivere nei climi desertici sono comunque in grado di continuare ad alimentarsi e a produrre latte anche dopo 48 h di digiuno idrico, grazie alla capacità di mantenere un adeguato afflusso di sangue all'intestino e alla mammella (Maltz et al., 1984).

Il latte è un'importante fonte di acido vaccenico (trans-11 C18:1, VA), che è un prodotto intermedio della bio-idrogenazione ruminale degli acidi linoleico e linolenico ed è poi convertito in acido rumenico (cis-9 trans-11 C18:2, RA) dalla  $\Delta 9$  desaturasi nella ghiandola mammaria. L'acido rumenico è il principale isomero dell'acido linoleico coniugato totale (CLA) presente nel grasso del latte. Sia l'acido vaccenico che l'acido rumenico si ritiene svolgano un'azione benefica sulla salute umana (McGuire and McGuire, 2000). Nella capra Nudda et al. (2006) hanno osservato una riduzione del contenuto di acido vaccenico e di acido rumenico nel latte con l'avanzamento della lattazione, rilevando i valori

più bassi in estate.

La somministrazione di una supplementazione lipidica a base di semi di lino ha determinato un significativo aumento del contenuto di acido vaccenico nel latte di pecora, con incrementi compresi tra il 18%, negli animali protetti dalla radiazione solare ma non alimentati con il seme di lino, e il 50% negli animali che, oltre a non ricevere la supplementazione lipidica, erano esposti alla radiazione solare diretta. La somministrazione di semi di lino ha anche prodotto un aumento del CLA totale nel latte indipendentemente dall'esposizione delle pecore alla radiazione solare (Caroprese et al., 2011). Inoltre, la riduzione del contenuto degli acidi laurico, miristico e palmitico nel latte delle pecore che hanno ricevuto la supplementazione lipidica a base di semi di lino ha prodotto una sensibile riduzione dell'indice aterogenico (IA) e dell'indice trombogenerico (IT). Elevati valori di IA nel grasso del latte hanno effetti deleteri sulla salute umana. È noto infatti che gli acidi grassi saturi contribuiscono all'insorgere di patologie coronariche, mentre gli acidi grassi insaturi, ivi compresi il CLA e gli acidi grassi mono e poli-insaturi, svolgono un'azione protettiva contro il rischio di malattie cardiovascolari (Williams, 2000). Dal momento che è stato dimostrato che la composizione acidica del grasso dei formaggi riflette quella del latte di provenienza (Nudda et al., 2006), il miglioramento del profilo acidico del latte può portare all'ottenimento di prodotti caseari naturalmente arricchiti. Tale circostanza può assumere particolare significato soprattutto durante i mesi estivi quando nel bacino del Mediterraneo, senza l'adozione di strategie specifiche, il profilo acidico del grasso del latte va incontro ad un netto peggioramento.

Anche la frequenza respiratoria, che in condizioni di stress termico va incontro ad un forte aumento, risulta moderata negli ovini che ricevono una supplementazione lipidica a base di semi di lino, probabilmente grazie alla presenza in essi di acido nicotinico che ha un effetto vasodilatatore periferico, favorendo così la dispersione di calore (Caroprese et al., 2012).

L'esposizione alle alte temperature ambientali provoca anche un aumento del turnover idrico e dell'ingestione di acqua: Marai et al. (2007) hanno rilevato un aumento dei consumi idrici del 50% e una riduzione delle perdite di acqua del 25% nelle feci e del 40% nelle urine in condizioni di stress termico. Le alterazioni del ricambio idrico sono responsabili della riduzione della digeribilità. Inoltre, lo stress termico può indurre una riduzione della funzionalità ruminale nella pecora, sia attraverso una diminuzione dell'attività batterica che una diluizione del fluido ruminale (Bernabucci et al., 2009). Anche un adeguato ricambio d'aria, dell'ordine di circa 70 m<sup>3</sup>/h/capo, è necessario per ridurre gli effetti negativi delle alte temperature estive (Sevi et al., 2002a). Le fluttuazioni termiche diurne possono d'altra parte condizionare la funzione immunitaria degli ovi-caprini durante i mesi estivi. Sevi et al. (2001), valutando la risposta immunitaria cellulo-mediata in ovini esposti alla radiazione solare o protetti da essa ed alimentati al mattino o al pomeriggio, hanno evidenziato un significativo calo della proliferazione linfocitaria *in vivo* negli animali esposti alla radiazione solare ed alimentati al mattino. In animali esposti alla radiazione solare, la somministrazione del seme di lino si è rivelata efficace nel sostenere la funzione immunitaria. Molto probabilmente la somministrazione dei semi di lino è in grado di indurre un aumento della secrezione di cortisolo, che a sua volta può influenzare la risposta immunitaria umorale stimolando la produzione di interleuchina 10 (IL-10) e inibendo la secrezione di interleuchina 12 (IL-12). Il preciso meccanismo che induce una riduzione della funzione immunitaria cellulo-mediata nella pecora esposta alle alte temperature non è del tutto chiaro, con particolare riferimento al profilo delle citochine in condizioni di stress termico. Le pecore esposte ad alte temperature e a bassi regimi di ventilazione evidenziano elevate livelli cortisolemici; l'aumento della secrezione di cortisolo è forse responsabile della riduzione della risposta immunitaria cellulo-mediata

che si riscontra a seguito della somministrazione per via intradermica di mitogeni e della minore produzione di IgG a seguito della somministrazione di antigeni per via sottocutanea (Sevi et al., 2002a; Caroprese et al., 2012).

L'incidenza dei problemi sanitari della mammella negli ovi-caprini aumenta durante i mesi estivi. Ciò può dipendere sia da una riduzione delle difese immunitarie, conseguente allo stress termico, che da una maggiore proliferazione dei micro-organismi responsabili della comparsa di mastiti cliniche e sub-cliniche in condizioni di elevata temperatura e di un alto tasso igrometrico dell'aria. Lo stress termico riduce quindi le naturali difese della mammella producendo una più spinta colonizzazione batterica come suggerito dalla prevalenza di patogeni ambientali tra le specie microbiche isolate dai campioni di latte batteriologicamente positivi prelevati da pecore sottoposte a condizioni di stress termico (Sevi et al., 2001). In tali condizioni si producono effetti negativi tanto sulla qualità igienica del latte quanto sulle sue caratteristiche nutrizionali e tecnologiche (Sevi et al., 2001).

Casamassima et al. (2001), valutando l'effetto della modalità stabulativa sul benessere e la produttività di pecore in lattazione durante i mesi estivi, hanno rilevato più elevati livelli di cellule somatiche nel latte delle pecore allevate in ovile rispetto a quelle con accesso a paddock esterni ed hanno attribuito tali risultati alla peggiore qualità igienica del microambiente di stalla anche a seguito di una più intensa contaminazione fecale della lettiera. Durante i mesi estivi, l'adozione di un regime di ventilazione di 35 m<sup>3</sup>/h per capo in ovile ha prodotto un innalzamento della concentrazione di coliformi totali nel latte rispetto ad un regime di ventilazione programmato per entrare in funzione ad una temperatura di 30°C e con un tasso di umidità relativa del 70% (Sevi et al., 2002a). L'adozione di un regime di ventilazione estivo di 35 m<sup>3</sup>/h/capo ha anche determinato un peggioramento dello stato sanitario della mammella in confronto ad un regime di ventilazione di 70 m<sup>3</sup>/h/capo evidenziando da un significativo innalzamento della conta cellulare nel latte (Sevi et al., 2003; Albenzio et al., 2005).

Come già riferito, l'esposizione alle alte temperature ambientali determina un aumento della concentrazione nel latte di neutrofilo, di coliformi e di stafilococchi. La più elevata carica batterica provoca un aumento della conta cellulare, perché l'infiltrazione dei leucociti negli alveoli mammari rappresenta uno dei principali meccanismi di difesa dell'animale contro i micro-organismi patogeni. È noto che l'intervento dei neutrofilo in risposta alla penetrazione batterica nella mammella può provocare un importante danno cellulare a carico dell'epitelio secretorio (Sevi et al., 1999) con gli stessi meccanismi utilizzati per fronteggiare i batteri. Nel latte della lattazione inoltrata, raccolto durante i mesi estivi, Albenzio et al. (2004) hanno rilevato elevati livelli di cellule somatiche e di macrofagi, che sono associati ad un aumento dell'attività del sistema enzimatico plasmina-plasminogeno. L'aumento della conta cellulare, comunemente rilevato nel latte prodotto in tarda lattazione dalle pecore durante i mesi estivi è responsabile, almeno in parte, del peggioramento dell'attitudine del latte alla coagulazione favorendo la conversione del plasminogeno in plasmina.

Gli ovi-caprini, dunque, per quanto siano considerati a ragione tra le specie di interesse zootecnico più tolleranti agli stress termici, risentono dell'esposizione alle alte temperature in termini di riduzione della produzione latte, di alterazione della risposta immunitaria e di stato sanitario della mammella. La protezione dalla radiazione solare diretta, un attento management della lettiera, un'adeguata densità di allevamento e una sufficiente volumetria ambientale rivestono un'importanza cruciale per sostenere le performance produttive e lo stato di salute

della mammella durante i mesi estivi al pari di una corretta ventilazione in stalla. Anche il miglioramento del management nutrizionale e la selezione di individui termo-resistenti sono state segnalate quali strategie in grado di innalzare i livelli produttivi, migliorare lo stato di salute e sostenere il benessere degli ovi-caprini allevati in climi caldi. Le principali strategie nutrizionali utili a fronteggiare le alte temperature sono rappresentate dall'uso di diete ad alta energia per bilanciare la ridotta assunzione di alimenti e l'aumentata richiesta di energia per la termoregolazione; dall'uso di proteine a bassa degradabilità ruminale per bilanciare l'aumentato metabolismo azotato; dallo spostamento dei pasti verso le ore più fresche della giornata; dall'uso di supplementazioni in grado di migliorare la funzione immunitaria e le risposte fisiologiche degli ovi-caprini.

### ■ Heat stress: impact on production performance and strategies to face it

**Key words:** heat stress, milk production, health, welfare.

### Bibliografia

- Albenzio, M., Caroprese, M., Santillo, A., Marino, R., Taibi, L., Sevi, A., 2004, *Journal of Dairy Science*; 87: 533-542.
- Albenzio, M., Santillo, A., Caroprese, M., Marino, R., Centoducati, P., Sevi A., 2005, *Journal of Dairy Research*; 72: 447-455.
- Al-Tamini, H.J., 2007, *Small Ruminant Research*; 71: 280-285.
- Bernabucci, U., Lacetera, N., Danieli, P. P., Bani, P., Nardone, A., Ronchi B., 2009, *International Journal of Biometeorology*; 53: 387-395.
- Caroprese M., Albenzio M., Bruno A., Fedele V., Santillo A., Sevi A. 2011, *Journal of Dairy Science*; 94: 3856-3867.
- Caroprese, M., Albenzio, M., Bruno, A., Annicchiarico, G., Marino, R., Sevi, A. 2012, *Small Ruminant Research*; 102: 177-185.
- Casamassima, D., Sevi, A., Palazzo, M., Ramacciato, R., Colella, G.E., Bellitti, A., 2001, *Small Ruminant Research*; 41: 151-161.
- Lu, C.D., 1989, *Small Ruminant Research*; 2: 151-162.
- Maltz, E., Olsson, K., Glick, S.M., Fyhrquist, F., Silanikove, N., 1984, *Comparative Biochemical Physiology*; 77A: 79-84.
- Marai, I. F. M., El-Darawany, A. A., Fadiel, A., Abdel-Hafez, M. A. M., 2007, *Small Ruminant Research*; 71: 1-12.
- McGuire, M. A., McGuire, M. K., 2000, *Journal of Animal Science*; 77: 1-8.
- Nudda, A., Battacone, G., Usai, M. G., Fancellu, S., Pulina, G., 2006, *Journal of Dairy Science*; 89: 277-282.
- Olsson, K., Josater-Hermelin M., Hossaini-Hilali J., Hydrbring E., Dahlborn, K., 1995, *Comparative Biochemical Physiology*; 110A: 309-317.
- Peana I., Fois G., Cannas A. 2007, *Italian Journal of Animal Science*; 6: 577-579.
- Sevi, A., Massa, S., Annicchiarico, G., Dell'Aquila, S., Muscio, A., 1999, *Journal of Dairy Research*; 66: 489-499.
- Sevi A., Annicchiarico G., Albenzio M., Taibi L., Muscio A., Dell'Aquila S. 2001, *Journal of Dairy Science*; 84: 629-640.
- Sevi A., Albenzio M., Annicchiarico G., Caroprese M., Marino R., Taibi L. 2002a, *Journal of Animal Science*; 80: 2349-2362.
- Sevi, A., Rotunno, T., Di Caterina, R., Muscio A., 2002b, *Journal of Dairy Research*; 69: 181-194.
- Sevi, A., Taibi, L., Albenzio, M., Annicchiarico, G., Marino, R., Caroprese, M., 2003, *Italian Journal of Animal Science*; 2: 197-212.
- Sevi A., Albenzio M., Marino R., Santillo A., Muscio A. 2004, *Small Ruminant Research*; 51: 251-259.
- Williams, C.M., 2000, *Annales de Zootechnie*; 49: 165-180.

# Implicazioni legate alla destagionalizzazione degli ovini: gli effetti sulle produzioni



M. TODARO

Dipartimento DEMETRA, settore di Produzioni Animali, Università degli Studi di Palermo

**Parole chiave:** latte ovino, formaggi estivi, destagionalizzazione.

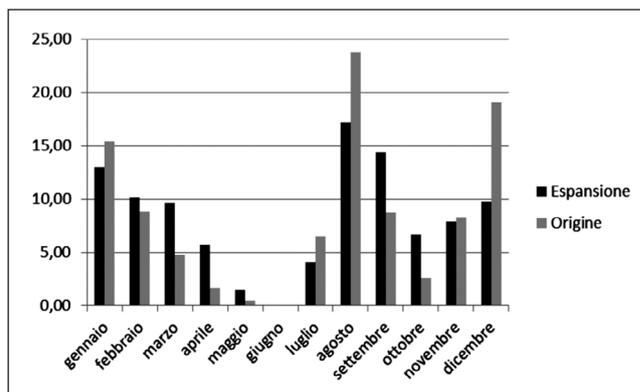
**INTRODUZIONE** - L'allevamento degli ovini in Sicilia è tipicamente di tipo semi-estensivo con ampio ricorso al pascolo, praticamente tutto l'anno, anche se con differenti disponibilità di risorse foraggere, verdi da ottobre a metà maggio e secche nel restante periodo. Ciononostante, le modalità di allevamento degli ovini in Sicilia, tranne qualche rara eccezione, prevedono che la pecora esca al pascolo quotidianamente, ricorrendo ad un'integrazione con fieno e/o paglia quando le risorse foraggere ingerite non riescono a soddisfare le esigenze in fibra degli animali. Esclusivamente per le pecore in lattazione freschissime (DIM < 100 d) e per quelle a fine gravidanza (< 20 d), vengono somministrati concentrati semplici o formulati commerciali nella misura compresa fra 400 e 800 g/d per capo.

In generale, in Sicilia, l'epoca dei parti viene subordinata alla stagionalità delle risorse foraggere al pascolo e, pertanto, le produzioni di latte mostrano un'ampia variabilità nel corso dell'anno per interrompersi quasi completamente in estate al termine del pascolo sulle ristoppie appena trebbiate. Da novembre a giugno il pascolamento delle pecore, oltre che nei pascoli naturali, avviene nei seminativi a riposo, nei prati di sulla e negli erbai di varie essenze coltivate in coltura pura o in consociazione. A volte le foraggere coltivate vengono sfruttate al pascolo da dicembre a marzo, successivamente non vengono pascolate per consentire un adeguato ricaccio da destinare alla fienagione. Dopo la mietitura e fino a settembre, le uniche risorse pascolive sono costituite dai residui di foraggere e/o di colture di cereali e leguminose che, nonostante siano nutrizionalmente povere, rappresentano una preziosa fonte alimentare (Bonanno et al., 2005). Il maggiore sfruttamento dei pascoli si effettua comunque durante il periodo primaverile in corrispondenza del massimo rigoglio vegetativo delle essenze foraggere.

Le razze ovine allevate in Sicilia sono la Valle del Belice, la Comisana, la Pinzirita e, in misura minore, la Barbaresca. Oggi, in conseguenza dell'elevato differenziale fra la produzione di latte della pecora Valle del Belice e quella delle altre razze ovine siciliane, gli arieti Valle del Belice, considerati a ragione dagli allevatori come miglioratori, si sono diffusi in quasi tutti gli allevamenti ovini, determinando un notevole meticciamento ed una sensibile contrazione degli ovini appartenenti a razze diverse dalla Valle del Belice. La superiorità produttiva della pecora Valle del Belice è legata alle sue elevate produzioni di latte che raggiungono mediamente i 270 kg per lattazione di 200 giorni, con una percentuale di grasso e proteine rispettivamente del 6% e 5,5% (Cappio-Borlino et al., 1997).

La distribuzione dei parti delle pecore allevate in Sicilia è diversa e meno stagionale rispetto ad altre regioni italiane, con una maggiore predisposizione delle pecore agli accoppiamenti in diversi periodi dell'anno. Tradizionalmente è la festa di S. Giuseppe (19 marzo) che dà il via alla stagione delle monte, per concentrare la principale stagione di parti nel periodo settembre-ottobre, una seconda stagione inizia in inverno, generalmente da dicembre a febbraio, nella quale partoriscono prevalentemente le agnelle che si sono ingravidate nel periodo agosto-settembre. Nella Valle del Belice, al confine fra le province di Agrigento, Trapani e Palermo, culla di origine della razza Valle del Belice, si nota un anticipo dei parti rispetto al resto del territorio siciliano. Uno studio condotto diversi anni addietro da Giaccone et al. (2004) evidenzia una differente distribuzione dei parti fra gli ovini di razza Valle del Belice allevati nell'area di origine e quelli allevati nell'area di espansione della razza (Graf. 1).

Dal grafico si evince come le pecore allevate nell'area di origine partoriscono con maggiore frequenza in agosto e, pertanto vengono fecondate anticipatamente in febbraio-marzo. L'anticipo dell'immissione degli arieti nella zona di origine è legata al fatto che tradizionalmente, nella Valle del Belice, viene prodotto un formaggio di pecora a pasta filata:



**Grafico 1** - Ripartizione percentuale dei parti in ovini di razza Valle del Belice in funzione della zona di allevamento.

la Vastedda della Valle del Belice, diventata nel 2010 una DOP. La produzione di latte nel periodo estivo era quindi una risorsa poiché gli allevatori, allora anche casari, trasformavano il loro latte in questo formaggio che riscuoteva parecchio successo fra i consumatori.

L'anticipo delle monte al mese di febbraio non ha creato problemi riproduttivi alle pecore Valle del Belice che si ingravidavano normalmente per partorire in estate, analoghi risultati sono stati trovati anche sulla Comisana (Bonanno et al., 2006). Questo esempio di destagionalizzazione "naturale" deve tuttavia fare i conti con le risorse alimentari al pascolo che, come detto, sono costituite prevalentemente dalle ristoppie di cereali. Le esigenze nutrizionali della pecora Valle del Belice sono notevoli, soprattutto nel peri-parto, per cui la gestione manageriale di questi ovini deve essere quanto mai attenta e accurata per riuscire a superare il periodo critico dell'estate. In Sicilia l'acqua per l'irrigazione è limitata ed è destinata esclusivamente a qualche coltura orticola o ad alcuni arboreti di pregio, per cui non è pensabile una forma di alimentazione alternativa al secco per gli animali, che fino a metà settembre sono costretti ad alimentarsi con fieno, concentrati e cladodi di fico d'india, ricchissimi in acqua e sali minerali e parecchio appetiti dagli ovini. Già a metà settembre, la vendemmia è quasi terminata, grazie anche alle molteplici varietà precoci impiantate, ed è uso e tradizione che gli allevatori portino a pascolare le pecore nel vigneto, con ottimi risultati sulle produzioni di latte (Todaro et al., 2007) e sugli accoppiamenti delle agnelle.

**QUALITÀ DEL LATTE ESTIVO** - È ormai ampiamente dimostrato come l'alimentazione degli animali giochi un ruolo di primo piano sulla qualità delle produzioni zootecniche. Anche la qualità del latte, così come i formaggi con esso prodotti, sono influenzati dall'alimentazione che, nel caso degli ovini, è legata allo sfruttamento delle risorse pascolive, per cui le variazioni stagionali delle produzioni foraggere si riflettono sulle produzioni lattiero-casearie. Obiettivo del lavoro è stato quello di quantificare le variazioni stagionali dei principali parametri qualitativi del latte.

**Metodologia** - Al fine di valutare la composizione chimica del latte di massa di pecore di razza Valle del Belice, sono stati monitorati per due anni consecutivi 17 allevamenti in diverse aree della Sicilia centro-occidentale. L'indagine è stata condotta su 10 allevamenti presenti nella zona di origine di cui 4 a Santa Margherita Belice (AG), 2 a Montevago (AG), 2 a Sambuca di Sicilia (AG) e 2 a Menfi (AG), e su 7 allevamenti presenti nella zona di espansione di cui 3 a Cammarata (AG), 1 a Lercara Friddi (PA), 1 a Corleone (PA), 1 a Godrano (PA) ed 1 a Santa Cristina Gela (PA).

Durante la prova sperimentale, condotta dal settembre 1999 al luglio 2001, sono stati prelevati in totale 761 campioni di latte di massa. I pre-

lievi hanno riguardato il latte della mungitura del mattino e dell'insieme del mattino e della sera ed hanno interessato due intere lattazioni. Sui campioni di latte prelevati, subito dopo la mungitura del mattino, è stato determinato il pH in azienda; quindi, senza aggiunta di conservante, i campioni sono stati trasportati a + 4°C, al Centro Latte e lotta alle mastiti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia "A. Mirri" ed, entro le 6 ore dal prelievo, analizzati per i parametri: Conta delle cellule somatiche (Fossomatic 5000); percentuale di grasso, proteine e lattosio (Milko-Scan 4.000); Carica Batterica Totale (Bactoscan 8000S); punto crioscopico (Crioscopio Astor 4000 SE); Urea per pH-metria differenziale (CL10-MICRO); Acidità titolabile del latte per titolazione; proteina totale, caseina e proteine del siero a mezzo kjeldahl; attitudine alla coagulazione presamica (Formagraph).

L'analisi statistica è stata realizzata mediante l'ausilio di un modello di Analisi della Varianza (ANOVA) che ha preso in considerazione i fattori fissi tipo di latte a due livelli (Mattino e Mattino + Sera), annata di produzione a 2 livelli (da settembre 1999 ad agosto 2000 e da settembre 2000 ad agosto 2001), mese del prelievo a 11 livelli (i mesi di luglio e agosto sono stati accorpati per scarsa numerosità).

Le medie stimate relative al mese del prelievo sono state utilizzate per descrivere l'andamento dei parametri qualitativi del latte. Infine tutti i dati disponibili sono stati stratificati per stagione di produzione ed analizzati a mezzo analisi canonica discriminante. L'analisi statistica è stata effettuata con le procedure GLM e CANDISC del software statistico SAS 9.2 (SAS, 2010).

**Risultati** - Nel grafico 2 vengono riportate le percentuali di grasso, proteina e lattosio in funzione del mese di produzione del latte. Nel periodo estivo si nota un incremento delle percentuali sia di grasso che delle proteine che raggiungono i valori massimi in coincidenza del prelievo luglio-agosto.

Il successivo e repentino calo rilevato a Settembre è invece imputabile alle nuove pecore con parto a luglio-agosto che entrano in lattazione proprio nel mese di settembre. Al contrario la percentuale di lattosio che, come è noto, segue l'andamento produttivo degli animali, presenta un trend lievemente decrescente nel periodo estivo per poi iniziare a risalire.

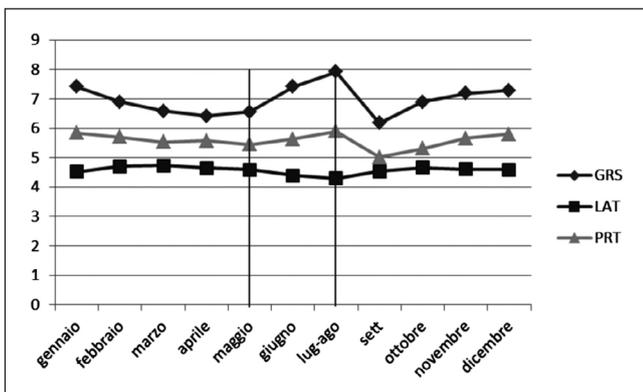


Grafico 2 - Variazione delle percentuali di grasso, proteina e lattosio nel latte.

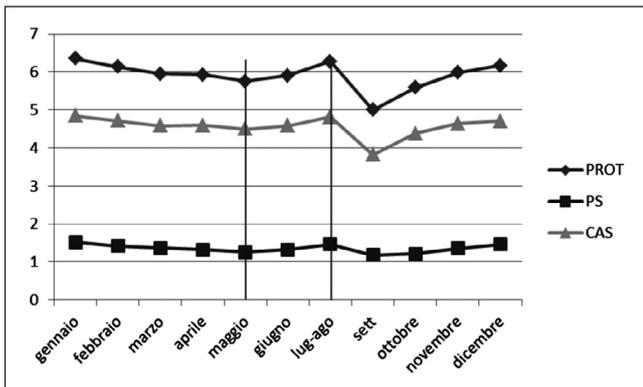


Grafico 3 - Variazione delle percentuali di proteina, caseina e proteine del siero nel latte.

Nel grafico 3 vengono invece riportate le percentuali di proteina, caseina e proteine del siero. Dall'analisi degli andamenti viene confermata una stretta correlazione fra proteina e caseina. Nel periodo estivo viene confermato un incremento delle percentuali di proteina e di caseina per il probabile effetto diluizione, mentre l'incremento delle proteine del siero è probabilmente legato alla minore funzionalità della mammella a fine lattazione.

Nel grafico 4 viene riportato l'andamento della concentrazione di urea nel latte. Si nota come da maggio a novembre i valori di urea si collocano al di sotto del valore soglia di 35 mg/dl, ritenuto ottimale per gli ovini, mentre i pascoli giovanissimi di dicembre-gennaio e quelli primaverili, molto più abbondanti, contribuiscono ad un sensibile incremento della proteina nella dieta che determina un aumento della concentrazione di urea nel latte.

Nel grafico 5 viene riportato l'andamento dei parametri lattodinamografici. Al di là dell'eccessiva variabilità dei parametri *r* e *a30*, che dipendono per altro da numerosi fattori, si nota uno scadimento dell'attitudine alla caseificazione del latte prodotto nel periodo estivo fino a settembre e ancora nel periodo invernale da gennaio a febbraio. Questa ridotta attitudine alla coagulazione presamica del latte, evidenziata prevalentemente dai bassi valori di consistenza del coagulo (*a30*), è imputabile alla sensibile variazione della sua composizione chimica che si manifesta nel latte di fine ed inizio lattazione. Malgrado il peggioramento dell'attitudine casearia del latte estivo, questo viene ancora caseificato per la produzione di formaggi freschi tipo Pecorino Siciliano (Tuma e Primosale) e Vastedda della Valle del Belice DOP.

L'analisi canonica discriminante ha confermato una netta separazione del latte estivo da quello prodotto nelle altre stagioni, con valori relativi alla distanza di Mahalanobis più elevati e statisticamente significativi.

Nel *plot* originato fra le due variabili canoniche, la nuvola di punti del latte estivo ha presentato dei valori del centro di massa di -1,63 sulla canonica 1 e di 0,54 sulla canonica 2. Sulla canonica 1 hanno pesato con maggiori coefficienti di correlazione (Tab. 1) la percentuale di lattosio e il contenuto di urea, confermando che il latte estivo contiene meno lattosio e meno urea, mentre i coefficienti di correlazione negativi più significativi si sono evidenziati per la carica batterica, le cellule somatiche

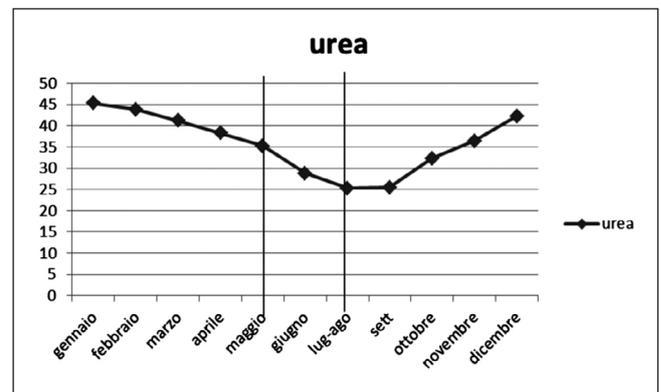


Grafico 4 - Variazione del tenore in urea nel latte.

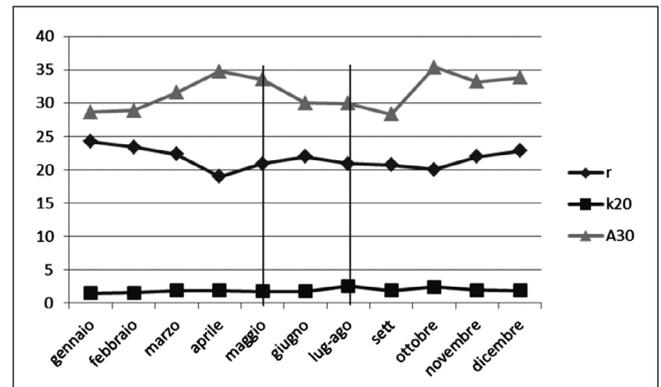


Grafico 5 - Variazione dei parametri lattodinamografici.

**Tabella 1** - Coefficienti di correlazione canonica.

Variabile	Canonica 1	Canonica 2
Cellule somatiche (log)	-0,596	-0,695
Carica batterica totale (log)	-0,902	0,403
Grasso (%)	-0,578	0,791
Lattosio (%)	0,849	-0,512
Proteina (%)	0,220	0,961
Caseina (%)	0,202	0,947
Proteine del siero (%)	0,246	0,969
pH	0,692	0,488
Punto crioscopico (°C)	-0,640	-0,516
Urea (mg/dl)	0,896	0,443

ed il grasso, che evidenziano come questo latte presenti un maggior contenuto in grasso e un peggioramento delle caratteristiche igienico-sanitarie evidenziato dal maggior contenuto in cellule somatiche e carica batterica totale, dovuti rispettivamente alla fase di fine lattazione ed al notevole aumento delle temperature ambientali. La variabile canonica 2 è invece strettamente correlata con le frazioni proteiche del latte; la coordinata cartesiana del centro del cerchio sulla canonica 2 si colloca a +0,54, che testimonia la maggiore presenza delle componenti proteiche nel latte estivo, legate presumibilmente all'effetto concentrazione.

**Conclusioni** - I risultati sopra riportati evidenziano quindi come il latte estivo presenti delle caratteristiche particolari che lo differenziano nettamente da quello prodotto nel resto dell'anno. Questo si presenta complessivamente più ricco in grasso e proteine ma con parametri igienico-sanitari e tecnologici peggiori, che comunque non inficiano il suo utilizzo per la trasformazione in formaggi freschi durante il periodo estivo.

**I FORMAGGI ESTIVI** - Il latte ovino prodotto in Sicilia nel 2010 ammontava a circa 34.500 tonnellate, di questo circa il 50% è stato consegnato ai caseifici industriali, precisamente 17.120 tonnellate (Pieri, 2011), mentre il resto viene trasformato dagli oltre 700 piccoli stabilimenti (caseifici aziendali) autorizzati con numero CE o con DIA. I formaggi realizzati in Sicilia con latte ovino sono le tre DOP, Pecorino Siciliano, Piacentinu Ennese e Vastedda della Valle del Belice, che rappresentano una piccola parte del totale; i formaggi freschi e stagionati tipo Pecorino Siciliano che assumono denominazioni diverse in base alla stagionatura: fresco e senza sale (Tuma), 20 giorni di maturazione (Primosale), 2-3 mesi di maturazione (Secondosale o *Primintiu*) e oltre 3 mesi di stagionatura (*Picurinu*). La maggior parte dei formaggi prodotti in Sicilia con latte ovino viene comunque venduto come Tuma o Primosale. Durante il periodo estivo, proprio per la scarsa disponibilità di latte e per le scarse caratteristiche casearie, gli unici formaggi che vengono prodotti sono il Primosale e la Vastedda della Valle del Belice DOP che, legata alla zona di produzione, viene prodotta soltanto nell'omonima valle. La Vastedda della Valle del Belice DOP è un formaggio di pecora a pasta filata, prodotto con latte crudo di pecore Valle del Belice e con l'ausilio delle attrezzature storiche in legno. La Vastedda ha ottenuto il riconoscimento europeo nel 2010 e la produzione certificata, in sensibile crescita, ha raggiunto circa 16 tonnellate nel 2011. La Vastedda è un formaggio che viene consumato fresco ed è particolarmente richiesto in estate nella zona di origine. Si vende con un prezzo superiore rispetto agli altri formaggi ovini freschi, con prezzi medi all'ingrosso di 10,00 €/kg. Da qui l'interesse notevole dei caseifici del territorio a trasformare il latte in Vastedda, ciò ha determinato un incremento notevole della domanda di latte ovino alla quale gli allevatori della zona hanno risposto anticipando le monte e quindi i parti delle pecore.

In fase di predisposizione della DOP sono stati realizzati degli studi in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, volti ad indagare sulle caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche di questo formaggio.

**Metodologia** - Sono state utilizzate 18 forme di formaggio Vastedda della Valle del Belice DOP prelevate in 6 caseifici nelle tre stagioni: inverno (novembre), primavera (aprile) ed estate (giugno). Sui formaggi sono state effettuate le analisi microbiologiche: Carica Mesofila Totale (CMT) su mPCA incubato a 30°C per 72h, Lattococchi mesofili su M17

a 30° per 72h, Lattococchi termofili su M17 a 44°C per 48h, Lattobacilli su MRS incubato a 37°C per 72h in microaerofilia (5% CO<sub>2</sub>), Enterococchi su Bile Aesculina Azide agar a 37°C per 24h. Le analisi chimiche (sostanza secca, grasso, proteina, cloruri e ceneri) e quelle relative alla composizione acidica del grasso sono state determinate secondo le metodiche ufficiali.

I dati sono stati elaborati con un modello di ANOVA a due fattori: stagione (1..3) e caseificio (1..6) al fine di determinare le medie stimate dei singoli parametri. Successivamente i parametri microbiologici, quelli chimici e gli acidi grassi sono stati analizzati con tre modelli di analisi canonica discriminante al fine di valutare l'effetto discriminante della stagione su più parametri contemporaneamente. L'analisi statistica è stata effettuata con le procedure GLM e CANDISC del software statistico SAS 9.2 (SAS, 2010).

**Risultati** - Nelle tabelle 2a, 2b e 2c vengono riportate le medie stimate dei parametri microbiologici, chimici e degli acidi grassi determinati sulle Vastedde oggetto di indagine.

La composizione microbiologica dei formaggi ha evidenziato delle differenze significative a carico dei lattococchi termofili che, nei formaggi prodotti in primavera hanno mostrato dei valori più bassi rispetto alle altre stagioni (Tabella 2a), in accordo con i risultati trovati da Caridi et al. (2003). Solo a livello di tendenza, sempre nei formaggi prodotti in primavera, si sono evidenziate maggiori conte di Lattobacilli.

Va comunque puntualizzato che per "lattobacilli" intendiamo i germi cresciuti su MRS, ma in realtà è stato dimostrato come questo terreno sia poco selettivo, per cui oltre ai lattobacilli possiamo trovare diverse specie di cocchi che ne incrementano i conteggi (Dolci et al., 2008). Comunque, il differente andamento riscontrato fra lattococchi e lattobacilli nei formaggi primaverili potrebbe essere legato alla diversa alimentazione che modifica la microflora autoctona endogena ed esogena.

L'analisi canonica discriminata effettuata solo sui parametri microbiologici ha determinato una separazione delle Vastedde di primavera da quelle delle altre stagioni, con valori statisticamente significativi fra le distanze di Mahalanobis. L'analisi dei coefficienti di correlazione canonica evidenzia come a determinare questa separazione statistica contribuiscano maggiormente i lattococchi e la carica batterica totale, correlati negativamente e i Lattobacilli correlati positivamente.

Nella tabella 2b sono riportate le medie stimate dei parametri chimici. Le differenze significative sono state evidenziate per le percentuali di grasso, proteina e ceneri, risultate significativamente inferiori nelle Vastedde prodotte in inverno. L'analisi delle correlazioni canoniche riesce a separare bene i dati in funzione dei parametri chimici del formaggio, anche se soltanto fra le stagioni estate ed inverno la distanza di Mahalanobis presenta un valore statisticamente significativo.

La composizione acidica del grasso, rispetto agli altri parametri qualitativi sopra considerati, evidenzia le maggiori differenze fra le Vasted-

**Tabella 2a** - Medie stimate dei parametri microbiologici (Log).

Parametri	Estate	Inverno	Primavera
CMT	7,66	8,09	7,58
Enterococchi	4,76	5,67	5,42
Lattococchi T.	8,54 A	8,50 A	7,35 B
Lattococchi M.	7,38	7,99	7,04
Lattobacilli	7,99	7,94	8,45

Sulla riga lettere differenti indicano una significatività per P<0,01.

**Tabella 2b** - Medie stimate dei parametri chimici (% ss).

Parametri	Estate	Inverno	Primavera
Sostanza secca	51,90	54,20	53,30
Grasso	44,78 a	43,41 b	44,26 ab
Proteina	42,72 a	40,78 b	42,96 a
Cloruro di sodio	2,97	3,03	3,19
Ceneri	7,18 a	6,72 b	6,91 ab

Sulla riga lettere differenti indicano una significatività per P<0,01.

**Tabella 2c** - Medie stim. degli AG del formaggio (g/100g di grasso).

Parametri	Estate	Inverno	Primavera
∑ AG Saturi	45,76 A	49,57 B	52,16 B
∑ AG Monoinsaturi	28,97 A	28,33 A	19,48 B
∑ AG Polinsaturi	7,73 a	6,44 b	6,47 ab
EPA	0,19 a	0,14 b	0,10 b
DPA	0,88 A	0,53 B	0,13 C
DHA	0,11 A	0,05 B	0,05 B
CLA	0,51 A	0,37 A	0,83 B

Sulla riga lettere maiuscole differenti indicano una significatività per  $P < 0,01$ , lettere minuscole per  $P < 0,05$ .

**Tabella 3** - Coefficienti di correlazione canonica.

Variabile	Canonica 1	Canonica 2
∑ AG Saturi	-0.999	-0.035
∑ AG Monoinsaturi	0.889	-0.458
∑ AG Polinsaturi	0.816	0.579
EPA	0.999	-0.020
DPA	0.999	-0.014
DHA	0.840	0.542
CLA	-0.737	0.676

de prodotte nelle diverse stagioni. Nella tabella 2c sono riportati i dati aggregati degli acidi grassi rilevati, oltre ad alcuni AG particolarmente interessanti dal punto di vista nutrizionale. Dall'analisi dei dati appare immediata la differenziazione delle Vastedde prodotte in estate, più ricche di acidi grassi insaturi (sia mono che polinsaturi) ed in particolare degli AG (EPA, DPA e DHA) che hanno un benefico effetto salutistico sul nostro organismo. Questa maggiore presenza di AG insaturi è probabilmente dovuta alla elevata mobilitazione dei grassi di deposito ed in particolar modo dell'acido oleico (Schmidely, 2002), in quegli animali che presentano un deficit energetico dovuto alle considerevoli esigenze legate alla produzione del latte non coperte dall'alimentazione che, nel periodo estivo, è costituita esclusivamente da pascoli secchi e ristoppie. A testimonianza della marcata influenza del pascolo verde, l'acido linoleico coniugato (CLA), risulta statisticamente superiore nelle Vastedde prodotte in primavera rispetto a quelle prodotte nei restanti periodi.

L'analisi canonica discriminante condotta sugli AG riesce a separare in maniera netta i formaggi prodotti nelle differenti stagioni. Le distanze di Mahalanobis fra i centromeri delle tre nuvole di punti sono ampie e statisticamente significative. I coefficienti di correlazione canonica presentano una forte relazione con la variabile canonica 1 (Tab. 3).

Nel *plot* fra canonica 1 (asse delle ordinate) e canonica 2 (asse delle ascisse) i formaggi estivi si collocano nella parte superiore, quelli invernali si collocano al centro, mentre quelli primaverili si trovano in basso, a conferma di quanto trovato con l'approccio statistico di tipo univariato.

**CONCLUSIONI** - Il doppio approccio statistico di analisi dei dati relativi alla composizione chimica, a quella microbiologica ed alla composizione acidica del grasso dei formaggi analizzati, evidenzia complessi-

vamente una forte influenza della stagione produttiva sulla qualità del formaggio Vastedda della Valle del Belice DOP. La variazione qualitativa di questo formaggio è da ritenersi normale, in quanto legata ad un latte intero, crudo e quindi con una carica microbica autoctona, proveniente da pecore allevate al pascolo nell'eterogeneo ambiente meridionale della Sicilia. I dati sopra riportati hanno anche evidenziato come la qualità del latte cambi considerevolmente da mese a mese, soprattutto in un sistema in cui l'allevamento delle pecore è legato al pascolo, per cui la diversa composizione del latte si riflette sui formaggi. Tale aspetto è una caratteristica positiva connessa alla produzione dei formaggi legati indissolubilmente al territorio ed all'animale, come appunto quelli a Denominazione di Origine Protetta (DOP).

La produzione di latte e di formaggi in estate, benché presenti caratteristiche qualitative differenti, è auspicabile sia per la bassa concorrenza dovuta all'elevata domanda di formaggi freschi ed alla bassa disponibilità di latte, sia perché alcuni formaggi, come la Vastedda della Valle del Belice DOP, tipici della produzione casearia estiva di un tempo, riescono a garantire notevoli margini di reddito ai produttori ed all'intero comparto zootecnico e caseario. La destagionalizzazione "naturale", senza quindi particolari sforzi da parte dell'uomo, trova nella pecora di razza Valle del Belice un ottimo alleato. Sicché si può affermare che la destagionalizzazione produttiva volta alla produzione di latte estivo è possibile e, se il latte viene adeguatamente remunerato, produrlo diventa economicamente conveniente.

#### ■ Implications related to the deseasonalisation of the sheep: effects on milk and cheese production

**Key words:** sheep milk, milk quality, summer cheeses.

#### Bibliografia

- Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambe G., Bongarrà M., Alicata M.L., 2005. Gli ovini al pascolo sulle stoppie producono più latte. *L'Informatore Agrario*, 50, 46-49.
- Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambe G., Bongarrà M., Alicata M.L., 2006. Latte tutto l'anno, con gli ovini conviene. *L'Informatore Agrario*, suppl. 1, 27, 22-25.
- Cappio-Borlino, A., Portolano B., Todaro M., Macciotta N.P.P., Giaccone P., Pulina G., 1997. Milk, fat and protein lactation curves of Valle del Belice dairy sheep estimated with Test Day Models. *J. Dairy Science*, 80: 3023-3029.
- Caracappa S., Todaro M., Scatassa M.L., Schinelli R., Giaccone P., 2007. Effetti del pascolo del vigneto sul latte ovino. *L'Informatore Agrario*, 39 (suppl. 1): 40-42.
- Caridi A., Micari P., Caparra P., Cufari A., Sarullo V., 2003. Ripening and seasonal changes in microbial groups and in physico-chemical properties of the ewes' cheese Pecorino del Poro. *International Dairy Journal*, 13: 191-200.
- Dolci P., Alessandria V., Zeppa G., Rantsiou K., Coccolin L., 2008. Microbiological characterization of artisanal Raschera PDO cheese: Analysis of its indigenous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 25: 392-399.
- Giaccone P., Todaro M., Portolano B., 2004. Analysis of milk production of Valle del Belice ewes reared in their area of origin and analysis of expansion of the breed. *Agricoltura Mediterranea*, 134: 246-250.
- Pieri R., 2011. Il mercato del latte. Rapporto 2011. Ed. Franco Angeli, Milano, Italy.
- SAS, 2010. SAS/STAT Qualification Tools User's Guide (version 9.2). Statistical Analysis System Institute Inc., Cary, NC, USA.
- Schmidely P., Meschy F., Tessier J., Sauviant D., 2002. Lactation response and nitrogen, calcium and phosphorus utilization of dairy goats differing by the genotype for alphaS1-casein in milk, and fed diets varying in crude protein concentration. *J. Dairy Sci.* 85, 2299-2307.

# Esperienze di destagionalizzazione nelle razze caprine del nord Italia



G. BRUNI<sup>1</sup>, G. ZANATTA<sup>2</sup>, M. VILLA<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Coordinatore e Tecnico Specialista Sistemi di allevamento e Alimentazione - Servizio Assistenza Tecnica agli Allevamenti (SATA) Sezione Caprini e Ovini - Associazione Regionale Allevatori della Lombardia (ARAL)

<sup>2</sup> Tecnico Specialista Gestione aziendale - SATA Sez. Caprini e Ovini - ARAL

<sup>3</sup> Veterinario - SATA Sez. Caprini e Ovini - Associazioni Provinciali Allevatori (APA) di Cremona, Mantova, Pavia e Varese

**Parole chiave:** specie caprina, riproduzione, tecniche di destagionalizzazione.

**INTRODUZIONE** - La riproduzione della specie caprina è stagionale, ciò significa che in condizioni naturali l'attività riproduttiva è limitata ad un periodo dell'anno. La stagionalità della riproduzione è legata a dei meccanismi fisiologici particolari che regolano il ciclo sessuale e la manifestazione dei calori durante l'anno; in particolare i caprini sono sensibili al fotoperiodo, cioè ai cambiamenti della durata dell'illuminazione quotidiana. L'attività sessuale comincia in autunno quando, dopo il solstizio d'estate, la durata del giorno diminuisce, in seguito l'attività sessuale diminuisce per arrestarsi quando le ore di luce durante il giorno aumentano in primavera. Ma in particolare è l'alternanza dei giorni lunghi e dei giorni corti che determina l'inizio dell'attività sessuale (fase estrale), mentre l'inverso determina la fine di tale attività (fase anaestrale).

Tuttavia la stagionalità è più o meno marcata nelle diverse razze caprine, ed è tanto più marcata quanto l'areale d'origine della razza si allontana dall'equatore, ad esempio le razze caprine originarie del Centro Europa e dell'Arco Alpino (latitudine > 35°) sono molto più stagionali rispetto quelle originarie del Bacino Mediterraneo.

Nella figura 1 viene infatti riportata la variazione stagionale dell'attività sessuale nella razza Camosciata delle Alpi o Alpine, che presenta una stagione sessuale (Estro) limitata da inizio Ottobre a fine di Febbraio, seguita da un periodo di riposo sessuale (Anaestro) molto prolungato da inizio Marzo a fine Settembre.

La conoscenza delle specificità della fisiologia della riproduzione nella specie caprina, da tradurre in protocolli per una corretta gestione della riproduzione in allevamento, costituisce la premessa fondamentale per

il conseguimento di una serie di obiettivi strategici per l'allevatore.

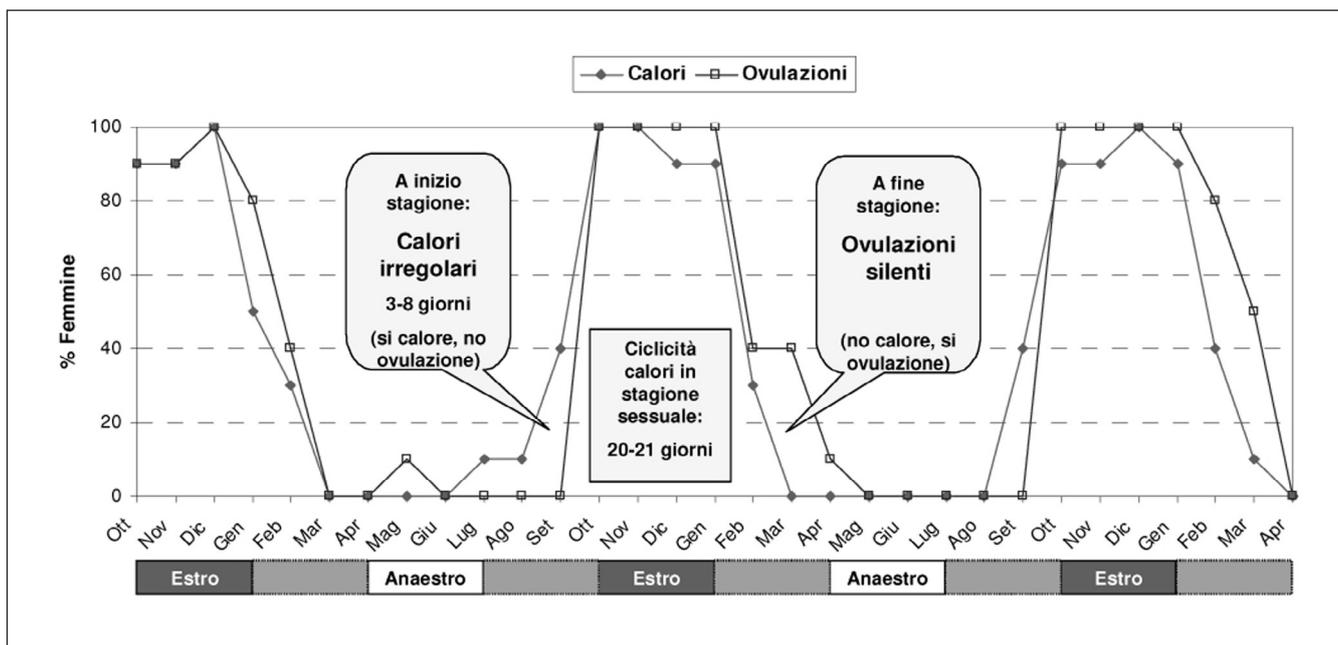
In particolare l'applicazione rigorosa dei protocolli per la gestione riproduttiva consente di ottenere i seguenti obiettivi:

- programmare i parti e quindi la produzione latte nei periodi dell'anno più favorevoli in funzione sia delle disponibilità alimentari dell'azienda (per esempio il pascolo), sia delle esigenze del mercato (maggiore domanda o prezzo dei prodotti: latte, carne, formaggio).
- concentrare i parti in un intervallo temporale limitato (un mese) in funzione delle esigenze, delle scelte e dell'organizzazione dell'azienda; al fine di semplificare la gestione alimentare sia delle capre in transizione (gruppo unico), sia delle caprette da rimonta (gruppo omogeneo).
- razionalizzare l'utilizzo delle unità lavoro e delle strutture aziendali (capretteria, sala mungitura), riducendo i picchi di lavoro (gestione parti e capretti) o i periodi di inattività (asciutta di tutto il gregge).

**MATERIALI E METODI** - I principali protocolli di destagionalizzazione adottati attualmente negli allevamenti caprini della Lombardia sono mediati dall'esperienza francese e sono riassunti nella figura 2.

Oltre ai citati protocolli associati alla tecnica dell'Inseminazione Artificiale (IA) bisogna ricordare la pratica delle lattazioni lunghe che consiste nel non destinare alla riproduzione le capre prolungando la loro lattazione per due o più anni.

**RISULTATI E DISCUSSIONE** - I risultati ottenuti negli allevamenti caprini della Lombardia in termini di destagionalizzazione sono riportati nella figura 3. In cui si osserva che nel 2011 il 15% delle capre hanno partorito fuori stagione (1.221 parti su un totale di 8.212 nelle 113 aziende in Controllo Funzionale).



**Figura 1** - Proporzioni di capre che presentano un calore (—●—) o una ovulazione (—□—) in funzione del mese dell'anno in un gregge di capre Alpine (Fatet e coll, 2010; Baril e coll, 1993).

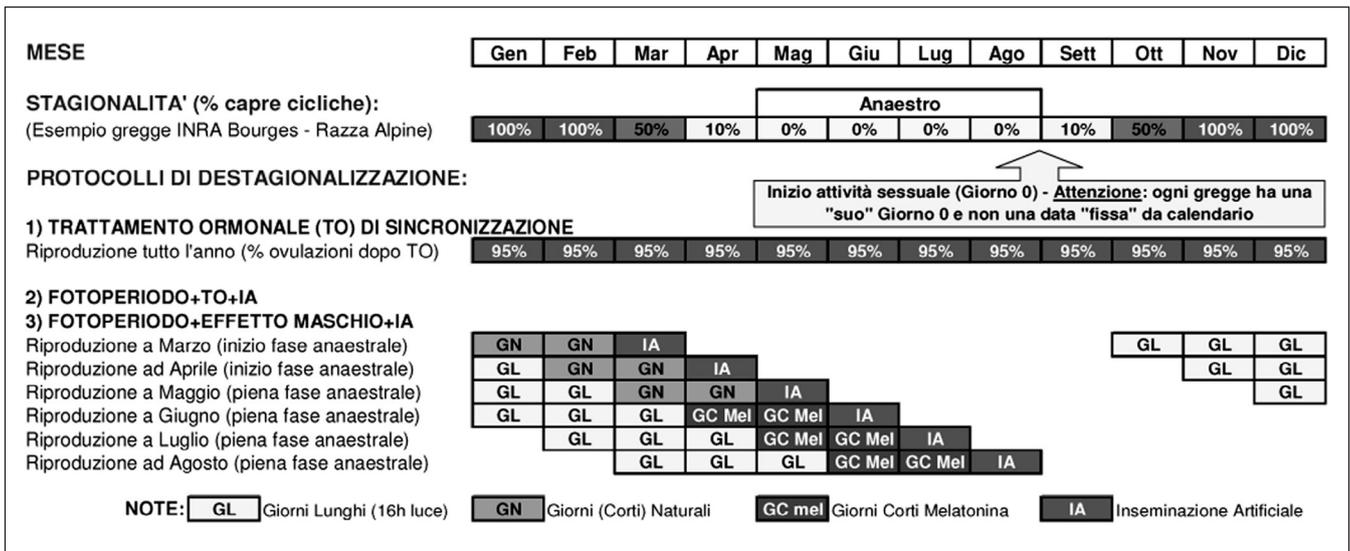


Figura 2 - Tecniche utilizzabili per la riproduzione della capre tramite IA per indurre e sincronizzare le ovulazioni (Leboeuf e coll, 2008).

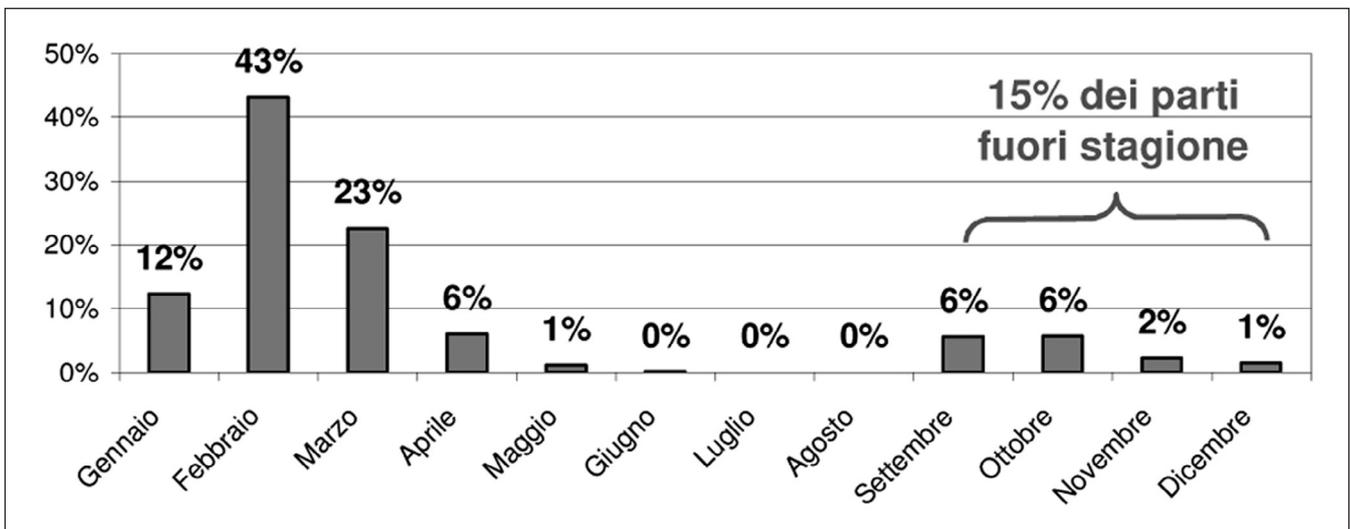


Figura 3 - Distribuzione dei parti nelle razze Camosciata e Saanen in Lombardia nel 2011 (Fonte Controlli Funzionali AIA: 133 Aziende, 8.212 Parti).

**CONCLUSIONI E PROSPETTIVE** - I protocolli di destagionalizzazione descritti hanno dimostrato di funzionare se applicati con estremo rigore, in tali protocolli il ruolo del trattamento ormonale risulta centrale e strategico, anche perché, essendo associato all'IA, consente il miglioramento genetico (IA). In previsione di una limitazione o bando degli ormoni da parte della UE, la possibile soluzione sarà la loro sostituzione con l'effetto maschio, un protocollo che presuppone migliori conoscenze dell'interazione maschio - femmina, temi oggetto di studio del Progetto Europeo FLOCK REPROD (www.flock-reprod.eu).

■ **In field application of protocols for out of season reproduction in goats' commercial flocks of north of Italy**

**Key words:** goats, reproduction, out of season reproduction techniques.

**RIASSUNTO** - La riproduzione della specie caprina è stagionale, ciò significa che in condizioni naturali l'attività riproduttiva della capra e quindi della produzione della carne e del latte è limitata ad un periodo dell'anno.

Per rispondere alla richiesta dei consumatori, l'allevatore può, grazie alle tecniche di destagionalizzazione, distribuire la produzione su tutto l'anno, la gestione della riproduzione è quindi una tappa chiave nella conduzione del proprio gregge.

Nel presente lavoro vengono descritti i protocolli di destagionalizzazione utilizzati in campo ed i risultati conseguiti in termini di spostamento del periodo dei parti in alcune aziende caprine della Lombardia.

Infine vengono fatte alcune riflessioni sulle prospettive future della gestione riproduttiva del gregge caprino anche alla luce delle normative europee relative all'utilizzo degli ormoni, tema oggetto di studio del Progetto Europeo FLOCK REPROD (www.flock-reprod.eu).

# La pecora Massese: una razza tradizionalmente destagionalizzata



M. MELE<sup>1</sup>, A. ACCIAIOLI<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari e Agro-Ambientali, Università di Pisa

<sup>2</sup> Dipartimento di Biotecnologie Agrarie, Università di Firenze

**Parole chiave:** pecora massese, destagionalizzazione, latte.

**INTRODUZIONE** - Il settore dell'allevamento ovino versa in uno stato di crisi che si protrae da diversi anni e che ha portato, nell'ultimo decennio, ad una forte contrazione del numero totale degli allevamenti e, in misura più ridotta, del numero di capi allevati. In particolare, secondo i dati del censimento nazionale del 2010, il numero degli allevamenti è diminuito del 47% e quello dei capi del 3%. Questo andamento è giustificato da un aumento della dimensione delle greggi che, in media, è stato del 75%. Nel Centro-Italia e in particolare in Toscana, a fronte di una diminuzione del numero di allevamenti ovis in linea con quanto registrato a livello nazionale (-47%), la riduzione del numero di capi è stata assai più sensibile, attestandosi intorno al 25%. In ogni caso anche nelle regioni del Centro-Italia si è verificata una concentrazione del numero di capi per allevamento che, in Toscana, è aumentata di più del 60% (ISTAT, 2012). Le ragioni di questa crisi sono molteplici, tra esse il progressivo aumento dei costi di produzione e la diminuzione del prezzo del latte e della carne di agnello, che hanno eroso i margini di reddito, determinando la chiusura di molte realtà di allevamento. Uno dei fattori che ha pesato di più nel determinare questo scenario e che continua a condizionare la possibilità di sviluppo del settore è sicuramente la concentrazione dell'offerta di latte e di carne di agnello in alcuni periodi dell'anno, come conseguenza della stagionalità riproduttiva della specie, ma anche dei calendari di monta applicati. Questo aspetto, da molti anni segnalato come punto di debolezza della filiera, è diventato ancora più determinante con la progressiva globalizzazione degli scambi commerciali e l'instaurarsi di situazioni di concorrenza con altre regioni europee ed extra europee. Di fronte a questo scenario da più parti si guarda all'opportunità di destagionalizzare le produzioni, al fine di rafforzare il mercato con una offerta di prodotti, primari e trasformati, più costante sia in qualità che in quantità.

L'applicazione di tecniche di allevamento che consentano di destagionalizzare l'attività riproduttiva, e quindi produttiva, tuttavia, ha sempre incontrato una certa resistenza da parte degli allevatori che, in tal caso, si trovano a dover sostenere produzioni elevate degli animali anche in stagioni con scarse o nulle risorse pascolive. Al di fuori delle tradizionali stagioni di monta, inoltre, risulta difficile avere buoni indici di fertilità. Per questi motivi gli allevatori dell'Italia centrale, soprattutto con la razza Sarda, impostano il calendario di monta nel periodo di tarda primavera, in modo da avere i parti in autunno e poter protrarre le lattazioni fino alla primavera successiva. L'applicazione di tale schema determina una disponibilità piena delle consegne di latte a partire dall'inverno.

In merito alla stagionalità riproduttiva, la specie ovina presenta un'ampia variabilità, presumibilmente determinata dalle diversità delle situazioni ambientali e climatiche nelle quali si è naturalmente selezionata. In Toscana è presente un'interessante realtà di allevamento ovino, localizzata perlopiù nelle aree appenniniche, che tradizionalmente utilizza la razza autoctona Massese. La duplice attitudine di questi animali ha reso possibile un'intensificazione del ritmo dei parti, a vantaggio della produzione di agnelli ed a svantaggio della persistenza delle lattazioni. Queste si susseguono con un ritmo irregolare che si traduce in tre parti in due anni e in una distribuzione dei parti e della produzione di latte pressoché continua nell'arco dell'anno.

**La pecora Massese: origine, distribuzione, caratteristiche morfologiche e sistema di allevamento** - Razza autoctona della Val di Forno, in provincia di Massa, si è diffusa principalmente nelle aree appenniniche limitrofe, spesso incrociandosi con altre popolazioni autoctone. Ciò è avvenuto principalmente in Toscana, ma anche in Emilia, in Liguria e nel Lazio. Nuclei di Massese sono stati introdotti in

molte altre regioni, dal Trentino alla Calabria. Attualmente in Toscana sono iscritti ai controlli funzionali 4097 capi, pari a circa il 30% degli ovis da latte della regione (ARAT, 2012). Al di fuori della Toscana sono sotto controllo 397 capi (Assonapa), ma si stima, come per tutto il patrimonio ovino italiano, una consistenza maggiore dovuta a soggetti non iscritti e meticci. La razza presenta una bassa incidenza di genotipi sensibili alla Scrapie (IZS LER, 2005), anche grazie al lavoro di selezione effettuato dal Centro Genetico di Asciano giunto alla produzione di soggetti da rimonta esenti dalla patologia.

La razza Massese presenta caratteristiche morfologiche che la distinguono dalle altre razze ovine italiane in maniera inequivocabile. Prima di tutto il mantello: cute ardesia, pelo nero, vello di vari colori: tutte le tonalità del grigio, ma anche del marrone, fino al nero, con lana poco estesa e con abbondante presenza di giarra. Caratterizzante la morfologia è anche la presenza, in entrambi i sessi, di corna di notevoli dimensioni, che si sviluppano a spirale verso l'esterno. La taglia è di media mole (le femmine superano i 60 kg e i maschi i 90 kg), ma uno studio sulla morfologia della razza (Acciaioli et al., 1996) ha evidenziato una notevole variabilità riconducibile in gran parte all'area di allevamento. Nelle province montane (PT, LU e MS), i soggetti sono di taglia minore, ma mostrano proporzioni corporee caratteristiche del tipo da latte, come conseguenza di una selezione morfo-funzionale in questa direzione. Nelle zone di pianura invece (GR e PI) è stata perseguita per molto tempo la produzione di carne, (si parla dell'impiego, negli anni '60, di montoni di razza Bergamasca) e i soggetti presentano ancora oggi maggior mole, tronco sviluppato in altezza e in lunghezza, e profilo fronto-nasale marcatamente convesso. Su questa base anche le tecniche di allevamento e di alimentazione applicate nelle diverse aree di allevamento sono molto differenti e si esprimono quindi in capacità produttive molto variabili.

Nella parte nord occidentale della Toscana si possono individuare due aree all'interno delle quali si è diffusa la razza Massese: una nella parte litoranea delle province di Pisa e di Livorno e una nelle colline interne delle province di Lucca e di Massa, principalmente riferibile ai territori rispettivamente della Garfagnana e della Lunigiana. In queste aree la razza Massese è allevata in maniera semiestensiva e, fatta eccezione per pochi allevamenti, la tecnica di alimentazione si basa su un largo ricorso a pascoli naturali e coltivati, che forniscono anche le scorte foraggere e a un basso impiego di concentrati (inferiori ai 0,4 kg/capo/d), spesso costituiti da semplici miscele di granelle di origine aziendale (orzo, avena, faino) (Martini et al., 2008). In altre aree vocate della Toscana, come l'Appennino pistoiese, indagini specifiche hanno messo in evidenza che pur nell'ambito di sistemi di allevamento semi-estensivi, dove gli animali praticano il pascolamento mediamente per più di 9 mesi l'anno sia su cotici naturali sia su erbai annuali e poliennali, la quantità di mangime utilizzato nei greggi di Massese è assai più consistente, superando in alcuni periodi dell'anno gli 0,6 kg/capo/d (Acciaioli et al., 2009). In queste aree, come evidenziato nel paragrafo successivo, i greggi sono mediamente anche più produttivi.

A prescindere dall'area di allevamento, la produzione di latte e di carne coesistono da sempre nella razza e gli allevatori, nel tempo, hanno privilegiato l'una o l'altra attitudine, non solo attingendo alla ampia variabilità genetica della razza, ma anche attuando tecniche riproduttive e calendari di monta in grado di intensificare più o meno il ritmo riproduttivo. Le pecore Massesi infatti risultano fertili per gran parte dell'anno (destagionalizzazione riproduttiva) e i parti possono susseguirsi con una frequenza maggiore rispetto a quanto avviene in altre razze da latte, ottenendo fino a 2 parti all'anno. Difficilmente questa frequenza è sostenuta per periodi lunghi, ma più spesso si verifica la successione di due parti molto ravvicinati ed uno annuale (3 parti in due anni). L'interparto medio risulta di 8-9 mesi ma si ha la successione di lattazioni

a breve durata e lattazioni di durata paragonabile a quella delle altre razze ovine da latte. Alcuni studi effettuati sulle statistiche vitali di questa razza e sulla sua produttività (Biagioli et al., 1989; Acciaiola et al., 1999) hanno evidenziato che la riduzione dell'interparto porta ad un incremento della produzione di latte e del numero di agnelli. Gli effetti negativi si riscontrano sulla lunghezza della carriera, che è funzione più del numero di parti effettuati che dell'età delle pecore. Tali effetti, comunque, potrebbero essere superati applicando tecniche di allevamento e alimentazione a sostegno dei maggiori fabbisogni degli animali.

**La pecora Massese: caratteristiche produttive della razza** - Il ritmo riproduttivo caratteristico della razza Massese è basato su una successione di 2 lattazioni a breve durata ed una lattazione di durata maggiore, che si caratterizzano per forme differenti della curva di produzione di latte (Franci et al., 1999; Steri et al., 2007), e per differente qualità del prodotto (Pugliese et al., 2000). Di norma le lattazioni brevi hanno una durata di circa 5 mesi, mentre quelle lunghe superano i 7-8 mesi. La produzione di latte è solitamente più elevata nel caso di parti primaverili in entrambe le tipologie di lattazione e il tempo al picco di lattazione si verifica tra le 4 e le 6 settimane dal parto per i greggi meno produttivi (Steri et al., 2007). In questa situazione, pertanto, il picco di lattazione coincide con il momento della vendita degli agnelli, che, così come accade anche per le altre razze ovine da latte, vengono macellati a 4-5 settimane di età. Franci et al. (1999) indagando su greggi con maggiore produttività, hanno osservato invece picchi precoci in particolare nelle lattazioni brevi. Nell'area della Toscana nord-occidentale i livelli produttivi degli allevamenti sono piuttosto contenuti, con produzioni medie di meno di 100 kg di latte per le lattazioni brevi e di meno di 150 kg per quelle lunghe (Steri et al., 2007). Esistono tuttavia ampi margini di miglioramento come testimoniano i dati dei controlli funzionali dell'AIA che riportano la presenza di allevamenti con medie produttive ben al di sopra dei 250 litri per lattazione (AIA, 2012). In generale i livelli produttivi medi osservati in diverse realtà di allevamento, soprattutto tipiche della Toscana Nord-Occidentale, sono legati a regimi alimentari basati quasi esclusivamente sul pascolo e su un basso, se non nullo, ricorso a mangimi (sia semplici che composti). La maggiore produttività delle lattazioni primaverili, è in parte dovuta proprio ad una maggiore disponibilità di pascolo in tale periodo. Esistono comunque risultati sperimentali che hanno evidenziato come, attraverso un'ottimizzazione del regime alimentare, sia possibile incrementare notevolmente la produttività della razza, raggiungendo livelli produttivi interessanti (Trimarchi et al., 1994). Ciò infine è confermato anche dalle produzioni ottenute in alcuni allevamenti sotto controllo funzionale, situati in aree particolarmente favorevoli da punto di vista delle disponibilità foraggere e dalle tecniche alimentari impiegate, come l'Appennino pistoiese. La realizzazione di piani alimentari rispondenti ai fabbisogni degli animali, e in particolare in grado di stimolare la produzione nella fase iniziale di lattazione, garantirebbe anche una maggiore percentuale di successi da un punto di vista riproduttivo, come evidenziato già alla fine degli anni ottanta da uno studio condotto su agnelle di razza Massese (Secchiari et al., 1988).

Un aspetto particolarmente interessante della razza Massese è legato alla produzione di carne di agnello da latte. Data la mole della razza, i pesi medi alla nascita degli agnelli sono di norma più elevati (maschi 5 kg, femmine 4,8 kg) rispetto a quelli riferibili ad altre razze da latte come la Sarda e la Comisana. Questo aspetto, assieme ad una buona capacità di accrescimento che supera in molti casi i 300 g/capo/giorno, consente di ottenere agnelli svezzati a circa 40 giorni che possono raggiungere i 15-18 kg di p.v. Il peso ritenuto sufficiente per la commercializzazione (10-12 kg PV) può essere raggiunto anche intorno ai 20 giorni di età, e lo svezzamento precoce si traduce per l'allevatore in una maggiore quantità di latte da destinare alla caseificazione. Alcuni studi effettuati per valutare le capacità di accrescimento e la qualità della carne degli agnelli massesi hanno messo in evidenza caratteristiche di pregio sia in termini di qualità nutrizionale della carne sia relativamente ai parametri di qualità della carcassa (Pugliese et al., 1998; Acciaiola et al., 2004; Serra et al., 2009). In particolare, le migliori rese al macello (circa il 56%) si ottengono macellando agnelli tra i 20 e i 30 giorni di età. Anche la capacità di conversione del latte in carne sembra ottimizzarsi in questo intervallo di tempo, oscillando tra 6,8 e 7. Date queste caratteristiche, la produzione della carne di agnello da latte può rappresentare un'interessante integrazione al reddito per gli allevatori, se opportunamente valorizzata sul mercato.

**La pecora Massese: caratteristiche qualitative del latte** - Il latte di pecora massese si caratterizza per elevati valori di grasso e protei-

na e per un ottimale rapporto caseina:grasso (tra 0,7 e 0,75) che consente di ottenere rese alla caseificazione anche superiori al 20% (Martini et al., 2008). Tali caratteristiche sono state messe in evidenza nel corso degli anni in numerosi studi che hanno preso in considerazione gran parte degli areali di allevamento in cui è tradizionalmente distribuita la razza. Alcune differenze sono state evidenziate nella composizione del latte (soprattutto in relazione alla percentuale di grasso) tra gli allevamenti di pianura e quelli di collina, principalmente in funzione della diversità nella composizione e disponibilità dei pascoli (Martini et al., 2008; Acciaiola et al., 2009) così come in funzione della curva di lattazione (Pugliese et al., 2000).

La buona attitudine alla caseificazione del latte di Massese, assieme alla possibilità di conferire il latte in periodi di scarsa disponibilità per i caseifici, come quello estivo e di inizio autunno, fanno sì che gli allevatori di Massese riescano ad ottenere prezzi mediamente più alti rispetto alle aziende che allevano altre razze. Tuttavia, nel tempo, tra gli allevatori di razza Massese si è consolidata una tendenza sempre più evidente alla realizzazione di mini caseifici aziendali per la trasformazione diretta del latte. In molte aree vocate, compresa quella di origine, la Lunigiana, sono sempre più gli allevatori che hanno investito nella caseificazione diretta. Questa scelta, che ha visto la sua più riuscita espressione nella realizzazione di alcuni prodotti tipici di pregio come il "Pecorino a latte crudo pistoiese" e la "Ricotta pistoiese", riconosciuti ormai da più di dieci anni anche come presidi slow food, è legata alle caratteristiche peculiari delle aree di distribuzione della razza. Nelle aree marginali dell'Appennino centro settentrionale, dove si è concentrata la razza Massese, sono poco presenti realtà di caseificazione in grado di funzionare da polo di aggregazione per le aziende e, pertanto, la possibilità di sopravvivenza è spesso legata all'opportunità di trattare il valore aggiunto del latte tramite la sua trasformazione e la vendita diretta dei prodotti.

**CONCLUSIONI** - La realtà produttiva osservata nella razza Massese, descritta da numerose ricerche effettuate sulle caratteristiche quantitative della produzione di latte, nell'ambito del tradizionale sistema di destagionalizzazione dei parti, può risultare, a nostro avviso, molto utile per prevedere le conseguenze dell'applicazione di tale tecnica su altre razze. Ciononostante i territori collinari dell'Appennino centro-settentrionale rimangono l'areale di riferimento per tale razza e garantiscono l'ambiente ideale per il suo sviluppo e per l'applicazione dei modelli aziendali che, nel tempo, si sono affermati. In che misura sia possibile esportare tali modelli in areali assai differenti come quelli dell'Italia centro-meridionale rimane ancora un aspetto da definire.

## Bibliografia

- A.R.A.T. Associazione Regionale Allevatori Toscana (2012). Comunicazione personale.
- Acciaiola A., Malvezzi R., Giustini L., Pianaccioli L., Saba R., Cerruti R., Gai Minietti D. (2009). La gestione sostenibile dei sistemi pascolivi italiani: Macroarea Appennino Centrale, Caso studio Appennino Pistoiese. In "La gestione dei sistemi pascolivi italiani". Regione Piemonte, Torino, pp.13-64.
- Acciaiola A., Pugliese C., Rapaccini S., Lucifero M. (1999) "Influence of reproductive rhythm on productivity of Massese ewe." Proc. A.S.P.A. XIII Congr.: Recent Progress in Animal Production Science. 1: 473-475.
- Acciaiola A., Rapaccini S., Pianaccioli L., Campodoni G., Nazzari N., Olivetti A. (2004) Produzione di carne con ovis di razza massese. Caratteristiche di accrescimento degli agnelli. XVI Congr. Naz. S.I.P.A.O.C., Siena, 29-30/9 1-2/10.
- Acciaiola A., Sargentini C., Martini A., Cecchi F., Leotta R., Lupi P., Martini A. (1996) "Studio della morfologia di ovis di razza Massese". Atti XII Congr. Naz. S.I.P.A.O.C., VIII Simposio Internaz. ovi-caprini. Varese 22-25 ottobre. 447-450.
- Biagioli O., Acciaiola A., Franci O. (1989) "Le principali statistiche vitali della razza ovina Massese allevata nelle province di Lucca e Pistoia". Agric. Ric. XI,(99-100), 89.
- Franci O., Pugliese C., Acciaiola A., Parisi G., Lucifero M. (1999). Application of two models to the lactation curve of Massese ewes. Small Rum. Res. 31: 91-96.
- ISTAT (21012): VI Censimento dell'Agricoltura.
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna. (2005). Il Rapporto Regionale sulla Scrapie. Bollettino CEREV.
- Martini M., Mele M., Scolozzi C., Salari F. (2008). Cheese making aptitude and the chemical and nutritional characteristics of milk from Massese ewes. Italian Journal of Animal Science, 7: 419-437.

- Pugliese C., Acciaioli A., Parisi G., Rapaccini S., Franci O., Lucifero M. (1998) "Quale età di macellazione per l'agnello Massese?" *L'allevatore di ovini e caprini*, 15(5), 4-6.
- Pugliese C., Acciaioli A., Rapaccini S., Parisi G., Franci O. 2000. Evolution of chemical composition, somatic cell count and renneting properties of the milk of Massese ewes. *Small Rum. Res.* 35: 71-80.
- Secchiari P., Trimarchi G., Ferruzzi G., Martini A., Pistoia A., Berni P., Luisi M. (1988) Effetti dell'apporto energetico della razione sull'inizio della carriera riproduttiva di agnelle Massesi. *Riv. AGR. MEDITERRANEA*, 118: 381-388.
- Serra A., Mele M., La Comba F., Conte G., Buccioni A., Secchiari P. (2009). Conjugated Linoleic Acid (CLA) content of meat from three muscles of Massese suckling lambs slaughtered at different weights. *Meat Science*. 81: 396-404.
- Steri R., Conte G., Mele M., Macciotta N.P.P., Secchiari P.L. 2007. Impiego di modelli matematici empirici nello studio della curva di lattazione della pecora Massese. *Atti 6° Congresso della Società Italiana di Biometria (Pisa 20-22 giugno 2007)*: 191-194.
- Trimarchi G., Ferruzzi G., Secchiari P., Poli P., Andreotti L., Buonaccorsi A. (1994) Effetti della somministrazione "ad libitum" di fieno e concentrato in pecore da latte. In "Miglioramento della efficienza produttiva degli ovini e dei caprini", *Ist. Sperimentale per la Zootecnia, Roma*.

# La destagionalizzazione della produzione lattiero casearia degli ovini in Sicilia



A. BONANNO, A. DI GRIGOLI, G. TORNAMBÉ

Dipartimento DEMETRA, settore di Produzioni Animali, Università degli Studi di Palermo

**Parole chiave:** fertilità, residui colturali, foraggi in irriguo, pascolamento notturno, stress da caldo.

**1. INTRODUZIONE** - Nel tradizionale sistema semi-estensivo di allevamento degli ovini in Sicilia, l'alimentazione si basa sul pascolamento di foraggi naturali o coltivati, attuato di norma nell'intervallo diurno tra le due mungiture per 4-8 h/d. Tale sistema fornisce produzioni lattiero casearie stagionali, poiché l'epoca dei parti viene subordinata alle disponibilità di foraggio al pascolo. Infatti, per sfruttare le abbondanti risorse foraggere primaverili ai fini della persistenza della lattazione, i parti vengono fatti ricadere con maggiore frequenza in autunno, in settembre e ottobre, e in minor misura a fine inverno, nel periodo gennaio-febbraio.

La stagionalità produttiva rappresenta una delle maggiori problematiche del settore ovino, da cui derivano sia la notevole variabilità annuale sia l'interruzione estiva della produzione lattiero casearia. Nel periodo tardo-primaverile estivo si realizza anche un evidente scadimento quanti-qualitativo dei prodotti, sia perché le pecore si trovano nella fase finale della lattazione, sia per l'effetto delle sfavorevoli condizioni climatiche e nutrizionali (Pulina et al., 1993; Fois et al., 1999). Infine, quando per le elevate temperature le essenze foraggere del pascolo dissecano e le pecore, per la maggior parte a fine lattazione e ormai gravide, cessano la secrezione latte ed entrano in asciutta, si crea un vero e proprio vuoto produttivo. Poiché il latte ovino viene destinato alla trasformazione, la stasi produttiva, che dall'estate si prolunga fino ad inizio autunno, determina la totale assenza sul mercato di prodotti caseari freschi (tuma, primosale e ricotta), con ripercussioni negative sulla redditività aziendale e sull'efficienza economica dei caseifici industriali cui il latte viene eventualmente conferito.

Uno dei segnali evolutivi del settore ovino, tanto siciliano quanto nazionale, è rappresentato dal diffuso interesse degli allevatori a contenere le fluttuazioni produttive stagionali, a colmare il vuoto produttivo estivo e a ottenere una produzione lattiero casearia continua e tendenzialmente costante durante l'anno, rispondente alle esigenze delle imprese di trasformazione e del consumo (Bonanno et al., 2003; 2006; Fois et al., 1999; Piras et al., 2007).

Nell'ambito di tale orientamento, sono state proposte e attuate sperimentalmente in Sicilia strategie gestionali degli allevamenti ovini basate su regimi alimentari estivi in cui foraggi ottenuti in irriguo sono sfalcati e somministrati in mangiatoia (Bonanno et al., 2005; Di Grigoli et al., 2008, 2009), o i più economici residui colturali di cereali e leguminose da granella sono pascolati dagli animali (Bonanno et al., 2005); sulla destagionalizzazione delle monte con la quale, senza dover ricorrere a trattamenti ormonali, si sono fatti ricadere i parti in epoche diverse da quelle tradizionali, per prolungare il periodo produttivo, colmare il vuoto estivo e conseguire nell'anno una più uniforme distribuzione dei parti e, quindi, una continua e più costante produzione di latte (Bonanno et al., 2003, 2006; Tornambè et al., 2004); sul pascolamento notturno, per attenuare gli effetti negativi dello stress da caldo indotto dall'esposizione diurna degli animali alle alte temperature e alle intense radiazioni solari (Di Grigoli et al., 2008, 2009).

**2. REGIMI ALIMENTARI ESTIVI** - In un sistema destagionalizzato, la condizione più critica è quella del mantenimento della produzione di latte in estate, e su questa l'alimentazione esercita un ruolo fondamentale. Le esperienze in Sicilia (Bonanno et al., 2005), finalizzate alla individuazione di idonei regimi alimentari estivi, sono state incentrate sulla valutazione degli effetti nutrizionali e produttivi di diete diversificate in funzione delle risorse foraggere di base. Le componenti foraggere a confronto sono state l'insilato, l'erba verde ottenuta in irriguo ed i residui colturali di cereali e leguminose da granella utilizzati con il pascolamento, tutte integrate con fieno e concentrato.

I risultati hanno evidenziato come la produzione e la qualità del latte ovino nella stagione calda siano state influenzate dalla dieta delle peco-

re, ma soprattutto come le stesse siano state favorite dall'ingestione di foraggio verde ottenuto in sistemi irrigui, sia in mangiatoia dopo lo sfalcio giornaliero e il trasferimento in ovile (Bonanno et al., 2005), sia con il pascolamento (Di Grigoli et al., 2008, 2009), in linea con analoghe esperienze in Sardegna (Piras et al., 2007).

In particolare, in una prima prova (Bonanno et al., 2005) condotta in luglio e agosto, la dieta costituita da erba medica sfalcata ottenuta in irriguo (5 kg/d) e integrata con concentrato ha consentito di elevare l'ingestione alimentare (1966 vs 1720 g/d di SS;  $P \leq 0,01$ ) e, di conseguenza, la produzione di latte rispetto alla dieta costituita da insilato di orzo, fieno e concentrato (537 vs 374 g/d;  $P \leq 0,01$ ). Tuttavia, la fase avanzata di lattazione delle pecore in questa prova è stata responsabile della bassa produttività complessiva rilevata. Il deludente risultato produttivo emerso con l'insilato di orzo è dovuto anche alla ridotta ingestione del prodotto da parte delle pecore, pari a 222 g/d di SS, ovvero il 27% della razione somministrata, che ne denota la scarsa appetibilità.

Il tradizionale pascolamento estivo sulle stoppie di frumento (6 h/d), integrate con fieno e concentrato, pur facendo registrare una produttività lievemente inferiore rispetto a quella della dieta con medica (465 vs 537 g/d), ha consentito di mantenere una soddisfacente qualità del latte. Infatti, la più elevata ingestione di fibra con le stoppie, favorendo la produzione ruminale di acido acetico, ha determinato l'aumento del grasso nel latte rispetto alle diete con la medica e l'insilato (8,1 vs 7,5 e 7,5%;  $P \leq 0,01$ ), con riflessi positivi sulla resa casearia a 7 d (17,6, 16,6 e 15,5 kg/100 kg di latte). Inoltre, contrariamente a quanto verificatosi con l'erba medica a causa della sua elevata dotazione proteica (21% su SS), le stoppie di frumento, similmente all'insilato, hanno consentito di contenere il tenore in urea nel latte (33,7 vs 38,0 vs 58,9 mg/dL;  $P \leq 0,01$ ). Tuttavia, lo stress da caldo, generato dall'esposizione degli animali alle radiazioni solari e alle alte temperature durante il pascolamento diurno sulle stoppie, è stato ritenuto causa dell'aumento delle cellule somatiche nel latte (942 vs 385 e 257 000/mL con stoppie, medica e insilato;  $P \leq 0,05$ ), in accordo con Finocchiaro et al. (2007) e Peana et al. (2007). In definitiva, il foraggio verde di erba medica ottenuto in irriguo ha dimostrato di essere in grado di sostenere la produzione di latte in estate; tuttavia, il suo impiego richiede sufficienti e costanti disponibilità di acqua per l'irrigazione e pertanto è possibile solo in zone dove sussistono adeguate risorse idriche e l'allevatore può far fronte ai costi aggiuntivi per l'irrigazione attraverso un remunerativo collocamento del prodotto estivo sul mercato. In tale ottica, ai fini del contenimento dei costi, è sembrato opportuno considerare le soluzioni alimentari che prevedono un razionale sfruttamento dei residui colturali, valutandone gli effetti produttivi su pecore destagionalizzate che si trovano nei mesi estivi nelle fasi iniziali della lattazione. Questo è stato l'obiettivo di una seconda prova (Bonanno et al., 2005), condotta nel periodo giugno-agosto con due gruppi omogenei di pecore Comisane che, partorendo in maggio, si trovavano nella fase iniziale della lattazione. Le pecore di un gruppo, stabulate in ovile, ricevevano 2 kg/d di erba medica sfalcata, razione inferiore a quella della prima prova a causa della minore produzione di foraggio dovuta, a sua volta, alle ridotte risorse idriche per l'irrigazione rese disponibili dallo sfavorevole andamento pluviometrico di quell'anno. L'altro gruppo effettuava il pascolamento per 3 h/d, ripartito sulle stoppie di frumento e di fava. Entrambi i gruppi ricevevano l'integrazione con fieno e concentrato.

In questa prova, la produzione media di latte delle pecore che pascolavano sulle stoppie ha superato di oltre 200 g quella delle pecore alimentate con l'erba medica (936 vs 727 g/d;  $P \leq 0,01$ ); tale superiorità produttiva si è mantenuta, pur con livelli altalenanti, nell'intero periodo sperimentale, lasciando supporre che le pecore abbiano potuto ricavare dai residui colturali, per la presenza delle granelle, adeguati apporti energetici e proteici per sostenere la produzione quanti-qualitativa di latte all'inizio della lattazione.

La maggiore produzione ottenuta con la dieta a base di stoppie non ha influito sulla composizione del latte, che è stata analoga a quella registrata con la medica, ad eccezione di un lieve, ma significativo, innalzamento della proteina (4,6 vs 4,5%;  $P \leq 0,05$ ). La conta delle cellule somatiche è risultata maggiore, ma non significativamente, nel latte del gruppo al pascolo sulle stoppie (844 vs 553 000/mL), in analogia a quanto emerso nella prova dell'anno precedente e attribuito agli effetti dello stress da caldo.

In definitiva, le esperienze condotte evidenziano come, per ottenere una produzione estiva di latte ovino, possa risultare aleatorio puntare su un regime alimentare a base di foraggio verde ottenuto in irriguo che implica, oltre che un aumento dei costi, anche dei rischi legati alle limitate e incostanti disponibilità di risorse idriche nelle diverse annate.

Invece, le stoppie di cereali e di leguminose da granella pascolate per poche ore al giorno, che da sempre in Sicilia costituiscono la base alimentare estiva per le pecore in asciutta, si sono rivelate interessanti risorse alimentari anche per le pecore in lattazione in estate. Sebbene le stoppie siano ritenute di trascurabile valore nutritivo, la presenza di spighe o baccelli sfuggiti alla trebbiatura hanno consentito alle pecore di trarre, soprattutto nelle prime fasi di utilizzo, considerevoli apporti nutrizionali, e di fornire, conseguentemente, soddisfacenti produzioni di latte. Pertanto, il razionale sfruttamento dei residui colturali, integrati con fieno e concentrato, potrebbe rappresentare una soluzione economica per soddisfare le esigenze alimentari e sostenere la produzione di latte di pecore che, con la destagionalizzazione dei parti, si trovano in estate nelle fasi iniziali e più produttive della lattazione.

**3. DESTAGIONALIZZAZIONE DELLE MONTE** - Un sistema di gestione destagionalizzato (DST), indirizzato all'ottenimento di una produzione lattiero casearia ovina continua e costante nel corso dell'anno, è stato sviluppato sperimentalmente e messo a confronto con il sistema convenzionale (CNV) di allevamento ovino (Bonanno et al., 2003, 2006; Tornambè et al., 2004). Entrambi i sistemi sono stati realizzati utilizzando un nucleo base di 60 pecore di razza Comisana in lattazione, e monitorati per un intero anno solare.

Nel DST, al fine di ottenere un'uniforme distribuzione dei parti durante l'anno, si è attuata una destagionalizzazione delle monte, senza ricorrere a trattamenti ormonali di induzione e sincronizzazione degli estri, ma semplicemente sfruttando il cosiddetto "effetto ariete". Pertanto, sono state pianificate quattro distinte epoche di monte, più o meno equidistanti, nei mesi di aprile, luglio, settembre e dicembre, da cui i parti in settembre, dicembre, febbraio e maggio. Le monte ad aprile e settembre corrispondono a quelle comunemente effettuate, mentre le altre si collocano in periodi intermedi. Le pecore sono state equamente ripartite tra le diverse epoche di parto (25%), includendo le primipare solo nei gruppi con parto a febbraio e maggio. Il proposito è stato quello di avere, in qualsiasi momento dell'anno, un gruppo di pecore nella fase iniziale e più produttiva della lattazione per ottenere una produzione continua che, supportata da razioni bilanciate, fosse anche tendenzialmente costante nei livelli quanti-qualitativi.

Il CNV è stato pianificato seguendo lo schema di allevamento tradizionale che prevede due principali epoche di parto, una a settembre dalle monte di aprile, che coinvolge la maggior parte delle pecore pluripare (65%), e l'altra a febbraio dalle monte di settembre (35%), che riguarda sia le pecore pluripare non fecondate in primavera, sia le agnelle della rimonta (20% del gregge) generalmente fecondate in autunno. Con i parti autunnali, la mungitura dura circa 8 mesi, fino all'asciutta determinata dall'avanzare della gestazione e dalle scarse disponibilità foragere estive. Le pecore con parto primaverile hanno invece una lattazione breve, la cui fine dipende soprattutto dalle carenti risorse estive al pascolo. Si verifica, quindi, un vuoto produttivo estivo e, poiché la massima produzione si ottiene nelle prime fasi di lattazione e in concomitanza con le elevate disponibilità di erba in primavera, emerge anche l'incostanza dei livelli produttivi nel resto dell'anno.

Con riguardo al regime alimentare, per tutta la prova, giornalmente nell'intervallo tra le due mungiture, tutte le pecore dei due sistemi erano avviate al pascolo sullo stesso appezzamento, per un tempo variabile (3-6 h/d) in relazione al periodo stagionale e alle risorse pascolate, costituite da orzo (nel periodo gennaio-marzo), trifoglio alessandrino (in un breve periodo in primavera), pascolo naturale (in autunno e primavera) e residui colturali di frumento, fava e ceci in estate solo per il gruppo DST. Al rientro dal pascolo, dopo la mungitura, i gruppi erano alloggiati separatamente in box su lettiera dove ricevevano le integrazioni di fieno e concentrato (favetta e orzo) e, per il solo DST in estate, l'insilato di orzo.

La quantità del concentrato somministrato alle pecore di entrambi i sistemi veniva modulata, con aggiustamenti bisettimanali, in base al livello produttivo, in ragione di 100 g di mangime per ogni 200 g di latte prodotto. La razione di concentrato per le pecore CNV era commisurata alla produzione media di latte del gruppo, come comunemente praticato; nel DST, invece, la quantità di concentrato è stata differenziata per gruppi in funzione di un alto e basso livello produttivo, modalità resa indispensabile dal diverso stadio di lattazione delle pecore.

In entrambi i sistemi le monte avvenivano immettendo gli arieti nei gruppi sperimentali con rapporto 1:10 per circa 20 d, nelle ore in cui le pecore erano mantenute in ovile.

Il latte di massa di entrambi i gruppi veniva caseificato con cadenza bisettimanale seguendo la procedura del Pecorino Siciliano, ottenendone tuma fresca (5 d) e ricotta.

I sistemi sono stati confrontati sulla base delle prestazioni riproduttive delle pecore, del livello quanti-qualitativo e della distribuzione annuale della produzione lattiero casearia, e ne è stata effettuata una semplice valutazione economica.

**3.1. Prestazioni riproduttive delle pecore** - In entrambi i sistemi, la maggiore fertilità (parti/monte\*100) si è registrata con le monte di aprile, per effetto delle abbondanti risorse primaverili al pascolo che, contribuendo a migliorare la condizione corporea delle pecore, ne hanno favorito la comparsa degli estri e la fecondazione. La fertilità in aprile, comunque, è risultata superiore nel DST rispetto al CNV (93 vs 63%), dovuto al fatto che nel CNV il dato comprende tutte le 60 pecore, anche quelle che, partorendo a febbraio e trovandosi a soli 2 mesi di lattazione, hanno realizzato una bassissima fertilità (14%).

Nel sistema DST, le monte venivano sempre effettuate sulle pecore che si trovavano a 7 mesi di lattazione; ciò ha contribuito, in ciascuna epoca di monta, a mantenere la fertilità a livelli sempre superiori al 70% e a realizzare una più elevata prolificità (1,5 vs 1,4 nati/parto), dovuta alla maggiore incidenza dei parti gemellari (52 vs 35%). Nel complesso, il DST ha consentito di realizzare una fertilità praticamente prossima a quella del CNV (78 vs 85%), malgrado le pecore non fecondate non venissero riportate alla monta successiva, come invece è avvenuto per il CNV, e di innalzare l'incidenza di parti gemellari e la prolificità.

In definitiva, le pecore di razza Comisana, fecondate in contro-stagione nei mesi di luglio e dicembre, hanno mostrato nel DST una fertilità analoga ed una prolificità addirittura maggiore rispetto alle pecore fecondate nei periodi tradizionali (aprile e settembre), senza la necessità di ricorrere a costosi trattamenti ormonali di induzione e sincronizzazione degli estri.

**3.2. Produzione lattiero casearia** - La figura 1 rappresenta l'andamento della produzione media individuale di latte durante l'anno; le frecce indicano i momenti in cui sono state introdotte le pecore nei sistemi e ha avuto inizio la loro mungitura (a circa 45 d dal parto, dopo lo svezzamento degli agnelli). L'introduzione di pecore ad inizio lattazione nel DST a gennaio e giugno ha determinato un consistente e durevole aumento della produzione media del gregge. Inoltre, le pecore inserite in giugno hanno consentito di sostenere la produzione di latte in estate. In tal modo, con riferimento all'intero anno, nel DST si è innalzata la produzione media di latte per capo rispetto al CNV (662 vs 571 g/d;  $P \leq 0,05$ ), cui ha però corrisposto la riduzione del contenuto in caseina (4,7 vs 5,1%;  $P \leq 0,05$ ).

In merito all'impatto stagionale del sistema, il latte prodotto per capo è risultato superiore nel DST rispetto al CNV in inverno (782 vs 610 g/d;  $P \leq 0,05$ ) e in estate (574 vs 393 g/d;  $P \leq 0,05$ ), mentre non si è differenziato nelle altre stagioni. Ciò costituisce la diretta conseguenza della più uniforme distribuzione dei parti realizzata nel corso dell'anno che ha consentito di mungere pecore ad inizio lattazione, più produttive, in inverno ed estate, stagioni in cui le pecore si trovano normalmente in fasi più avanzate di lattazione. In inverno, quando sono aumentate le esigenze di integrazione del pascolo, la somministrazione del concentrato per gruppi, adottata nel DST in base al livello produttivo, ha anch'esso contribuito a mantenere una più elevata produzione di latte. Il sistema non ha influenzato l'attitudine alla coagulazione e la resa casearia del latte, sebbene quest'ultima a 5 d sia risultata lievemente inferiore nel DST (16,5 vs 17,3 kg/100 kg di latte) a causa del minore contenuto in caseina conseguente alla maggiore produzione di latte realizzata.

Nel complesso, la produzione annuale di latte del DST è risultata più elevata del 5% rispetto a quella del CNV (72,8 vs 69,4 q). La distribuzione mensile della produzione nel DST mostra, in figura 2, una maggiore uniformità nel corso dell'anno, con picchi meno pronunciati e l'assenza di vuoti produttivi; quella del CNV segue il tipico andamento,

con punte di produzione in aprile e, meno accentuate, in novembre, in linea con la produttività del pascolo e la stagionalità dei parti.

**3.3. Valutazione economica** - I due sistemi di gestione del gregge sono stati valutati in base all'utile economico annualmente ottenibile, calcolato in modo semplificato detraendo dal ricavo conseguito dalla vendita del latte o di formaggio e ricotta il solo costo delle integrazioni alimentari, mantenendo costanti i loro prezzi medi di mercato. L'utile ottenuto dalla vendita del latte nel DST è risultato superiore del 14,5% rispetto al CNV; con la vendita della tuma e della ricotta il divario a favore del DST ha raggiunto il 21,8%. Il margine di profitto sarebbe salito ulteriormente nel DST se nel bilancio si fosse considerata la vendita estiva di altre tipologie di formaggio fresco a prezzi più elevati e, in considerazione della maggiore prolificità ottenuta, anche la vendita degli agnelli. Da tale esperienza è emersa con evidenza la sostenibilità tecnico-economica del sistema destagionalizzato che, rispetto al sistema convenzionale, assicura la continua e regolare presenza dei prodotti caseari ovis sul mercato e consente di estendere la produzione al periodo estivo per far fronte, specialmente in aree turistiche, alle richieste estive di formaggi freschi di adeguato standard qualitativo.

**4. IL PASCOLAMENTO NOTTURNO** - La produzione di latte ovino nel periodo estivo viene penalizzata, oltre che dal fattore alimentare, anche dalle condizioni ambientali spesso critiche a cui gli animali vengono esposti sia in ovile sia durante il pascolamento diurno. Lo stress da caldo indotto dalle alte temperature e dalle intense radiazioni solari è uno dei fattori limitanti la produzione di latte nei climi caldi (Silanikove, 1992). Negli ovini in lattazione, lo stress termico si ripercuote negativamente sull'ingestione e sull'efficienza alimentare, sulla produzione di latte e sul loro benessere (Sevi, 2007). Di conseguenza, per assicurare il benessere e la produttività delle pecore nel periodo estivo, occorre mettere in atto sistemi di gestione in grado di attenuare gli effetti dello stress da caldo. Una minore esposizione alle radiazioni solari e al caldo può essere ottenuta in estate ricorrendo al pascolamento notturno, i cui benefici sugli animali si evidenziano in termini di ingestione di foraggio, condizione fisiologica, benessere e produttività (Iason et al., 1999; Bonanno et al., 2007).

Pertanto, ai fini dell'ottenimento di una produzione estiva di latte ovino, è stata verificata in Sicilia (Di Grigoli et al., 2008, 2009) la possibilità di sfruttare un sistema foraggero irriguo con il pascolamento notturno o diurno o mediante sfalcio e somministrazione del foraggio in mangiatoia, valutandone gli effetti sulla produzione di latte e su alcuni parametri fisiologici e metabolici degli animali.

Nella sperimentazione, condotta in luglio e agosto con pecore di razza Comisana, sono stati utilizzati in sequenza 1 ha di medica, 1 ha di cicoria e 0,5 ha di un miscuglio prativo. Le pecore che effettuavano un pascolamento diurno (PD) uscivano al pascolo dalle 7.30, dopo la mungitura del mattino, fino alle 18.30. Gli animali che effettuavano il pasco-

lamento notturno (PN) uscivano dalle 19.30 alle 6.30. Il gruppo stabulato in ovile (ST) riceveva foraggi freschi a volontà, sfalciati giornalmente alle 7.30 dagli stessi settori utilizzati dagli altri gruppi con il pascolamento. In ovile, tutte le pecore ricevevano un'integrazione di 800 g/d di fieno.

Durante la prova, il valore del THI (temperature and humidity index) (Kelly e Bond, 1971) medio è oscillato intorno a 70, mentre il THI massimo ha sempre fatto registrare valori superiori ad 80, riconosciuti come causa di notevole stress da caldo per le pecore in lattazione (Sevi et al., 2001; Peana et al., 2007), ed ha raggiunto punte più elevate nel periodo di fine luglio, quando il valore ha superato 90.

Per quanto concerne la produzione di latte, non sono emerse differenze significative tra i gruppi di pecore che pascolavano di notte e di giorno, che hanno prodotto una quantità di latte simile, comunque superiore al gruppo stabulato (908 e 875 vs 666 g/d;  $P \leq 0,01$ ); tuttavia, le pecore che pascolavano di notte hanno prodotto più latte rispetto a quelle che pascolavano di giorno (1052 vs 820 g/d;  $P \leq 0,05$ ) nel periodo di fine luglio quando si è innalzato il THI.

La minore produzione di latte del gruppo confinato in ovile è stata attribuita alla inadeguatezza del locale utilizzato per la detenzione, che non era strutturalmente predisposto ad attenuare gli effetti del caldo, ma anche al fatto che gli animali al pascolo hanno potuto esercitare sulle parti delle piante una certa selettività che ha presumibilmente consentito loro di ingerire una dieta qualitativamente migliore rispetto a quella degli animali alimentati in mangiatoia.

Con riguardo alla composizione del latte, le pecore che pascolavano di notte hanno evidenziato valori più elevati di caseina rispetto ai gruppi PD ed ST (4,9 vs 4,6 e 4,6%;  $P \leq 0,05$ ), risultati che sembrerebbero indicare una maggiore efficienza di utilizzazione delle proteine alimentari, e quindi una maggiore sintesi proteica, negli animali che hanno pascolato di notte sfuggendo alle alte temperature (Marai et al., 2007). Inoltre, le pecore PN che hanno subito meno lo stress da caldo hanno mostrato, in accordo con Finocchiaro et al. (2007) e Peana et al. (2007), un più basso contenuto di cellule somatiche nel latte rispetto alle pecore PD ed ST (5,5 vs 6,0 e 5,8  $\log_{10}$  n/ml;  $P \leq 0,05$ ), che ha contribuito ad elevare la percentuale di campioni di latte reattivi al Formagraph (62,5 vs 48,3 e 46,2%;  $P \leq 0,05$ ).

La temperatura rettale e il battito cardiaco, indicatori dello stress da caldo negli animali, sono stati misurati sulle pecore in corrispondenza delle due mungiture giornaliere. I gruppi non si sono differenziati per i parametri misurati durante la mungitura della mattina, mentre nella misurazione serale le pecore che pascolavano di notte non hanno mostrato l'innalzamento significativo sia della temperatura rettale (39,1 vs 39,8 e 39,7 °C;  $P \leq 0,01$ ) sia del battito cardiaco (72,2 vs 89,1 e 80,6 n/min;  $P \leq 0,01$ ) verificatosi nei gruppi PD ed ST, entrambi più esposti alle alte temperature.

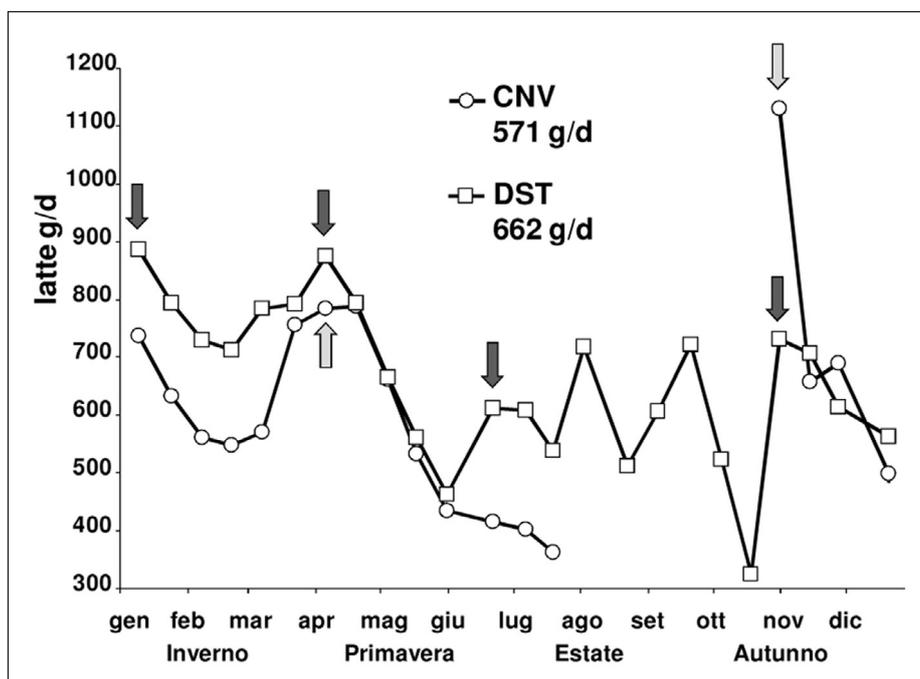
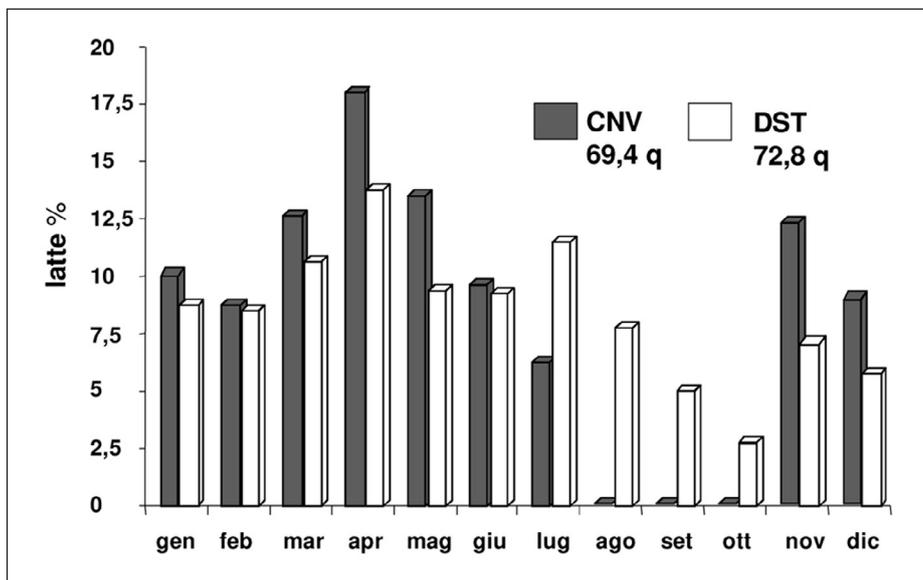


Figura 1 - Andamento annuale della produzione individuale di latte nei sistemi convenzionale (CNV) e destagionalizzato (DST).



**Figura 2** - Distribuzione mensile della produzione annuale di latte nei sistemi convenzionale (CNV) e destagionalizzato (DST).

I parametri metabolici non hanno mostrato valori anomali o tendenze imputabili allo stress da caldo degli animali, ad eccezione del sodio ematico risultato più basso nelle pecore che pascolavano di giorno e per quelle confinate (144,7 vs 143,5 e 143,2 mmol/L;  $P \leq 0,05$ ).

Nel complesso, i risultati emersi avvalorano la possibilità di realizzare una produzione di latte estiva nelle zone della Sicilia che dispongono di adeguati quantitativi di acqua utilizzabile per fini irrigui da destinare all'ottenimento di prati ed erbai primaverili-estivi. Essi confermano, altresì, come il pascolamento notturno in estate contribuisca ad attenuare gli effetti stressanti delle radiazioni solari e delle alte temperature che gli animali invece subiscono quando pascolano durante le ore diurne o vengono confinati stabilmente nel ricovero. Infatti, le pecore hanno risposto al pascolamento notturno producendo più latte, contenente peraltro più caseina e meno cellule somatiche, e limitando le variazioni di alcuni parametri fisiologici indicatori di stress, quali l'innalzamento della temperatura rettale e del battito cardiaco, e la riduzione del sodio ematico, riscontrati invece nei soggetti più esposti allo stress da caldo.

**5. CONCLUSIONI** - In definitiva, la realizzazione di un sistema destagionalizzato incentrato su regimi alimentari a base di foraggi verdi ottenuti in irriguo e/o di residui colturali utilizzati con il pascolamento, e su strategie gestionali per attenuare gli effetti dello stress da caldo, come il pascolamento notturno, in grado di rendere continuo e di estendere in estate il periodo produttivo del latte ovino, non può che contribuire ad una maggiore valorizzazione commerciale dei formaggi freschi e della ricotta. Questi, infatti, avrebbero assicurata una costante presenza sul mercato per soddisfare, in particolare, le consistenti richieste estive, soprattutto laddove il mercato dei prodotti lattiero caseari si sviluppa in aree turistiche.

Volendosi trasferire nella realtà operativa, la convenienza a destagionalizzare i parti per ampliare i periodi produttivi, fino a realizzare una produzione continua, dovrà essere valutata dall'allevatore in funzione delle opportunità offerte dal mercato in cui si opera, e dalle potenzialità aziendali in merito alle disponibilità di risorse alimentari e di manodopera, indipendentemente dal fatto che il latte venga conferito al caseificio o trasformato in azienda. Il riconoscimento sul mercato consentirà, infatti, di compensare i costi aggiuntivi per l'eventuale irrigazione, l'aumento di manodopera e le integrazioni alimentari.

#### ■ Out-of-season dairy sheep production in Sicily

**Key words:** fertility, crop residues, irrigated forage crops, night grazing, heat stress.

#### Bibliografia

Bonanno A., Di Grigoli A., Bongarrà M., Formoso B., Tornambè G., Alicata M.L., 2003. Application of a management system aimed for a continuous production in dairy ewes. 54th Annual Meeting of European Association for Animal Production (EAAP), Italy, 313.

- Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambè G., Bongarrà M., Alicata M.L., 2005. Gli ovini al pascolo sulle stoppie producono più latte. *L'Informatore Agrario*, 50, 46-49.
- Bonanno A., Di Grigoli A., Tornambè G., Bongarrà M., Alicata M.L., 2006. Latte tutto l'anno, con gli ovini conviene. *L'Informatore Agrario*, suppl. 1, 27, 22-25.
- Bonanno A., Di Grigoli A., Vargetto D., Tornambè D., Di Miceli G., Giambalvo D., 2007. Grazing sulla and/or ryegrass forage 8 or 24 hours daily. 1. Effects on ewes feeding behavior. *Grassland Science in Europe*, 12, 208-211.
- Di Grigoli A., Di Miceli G., Todaro M., Bonanno A., 2008. Latte ovino e caprino in estate con il pascolamento notturno. *L'Informatore Agrario*, supplemento al n. 23, 39-42.
- Di Grigoli A., Todaro M., Di Miceli G., Alicata M.L., Cascone G., Bonanno A., 2009. Milk production and physiological traits of ewes and goats housed indoor or grazing at different daily timing in summer. *Italian Journal of Animal Science*, 8, suppl. 2, 616-618.
- Finocchiaro R., Van Kaam J.B.C.H.M., Portolano B., 2007. Effect of weather conditions on somatic cell score in Sicilian Valle del Belice ewes. *Italian Journal of Animal Science*, 6, suppl. 1, 130-132.
- Fois N., Rattu S.P.G., Ligios S., Nudda A., Pulina G., 1999. La destagionalizzazione della produzione di latte ovino. *L'Informatore Agrario*, 25, 43-46.
- Iason G.R., Mantecon A.R., Sim D.A., Gonzalez J., Foreman E., Bermudez F.F., Elston D.A., 1999. Can grazing sheep compensate for a daily foraging time constraint?. *Journal of Animal Ecology*, 68, 87-93.
- Kelly C.F., Bond T.E., 1971. Bioclimatic factors and their measurement: a guide to environmental research on animals. National Academy of Sciences, Washington, DC.
- Marai I.F.M., El-Darawany A.A., Fadiel A., Abdel-Hafez M.A.M., 2007. Physiological traits as affected by heat stress in sheep. A review. *Small Ruminant Research*, 71, 1-12.
- Peana I., Fois G., Cannas, A., 2007. Effects of heat stress and diet on milk production and feed and energy intake of Sarda ewes. *Italian Journal of Animal Science*, 6, suppl. 1, 577-579.
- Piras M., Ligios S., Sitzia M., Fois N., 2007. Out of season sheep milk production in Sardinia. *Italian Journal of Animal Science*, 6, suppl. 1, 588-590.
- Pulina G., Serra A., Macciotta N.P.P., Nudda A., 1993. La produzione continua di latte nella specie ovina in ambiente mediterraneo. 1. Prova preliminare di alimentazione di pecore in lattazione durante il periodo estivo in zone asciutte. *Atti 10° Congresso Nazionale ASPA*, 353-356.
- Sevi A., Annichiarico G., Albenzio M., Taibi L., Muscio A., Dell'Aquila S., 2001. Effects of solar radiation and feeding time on behavior, immune response and production of lactating ewes under high ambient temperature. *Journal of Dairy Science*, 84:629-640.
- Sevi A., 2007. Ewe welfare and ovine milk and cheese quality. *Italian Journal of Animal Science*, 6, suppl. 1, 521-526.
- Silanikove N., 1992. Effects of water scarcity and hot environment on appetite and digestion in ruminants: a review. *Livestock Production Science*, 30, 175-194.
- Tornambè G., Di Grigoli A., Alicata M.L., Bonanno A., 2004. Valorisation des productions laitières et fromagères ovines fermières en dessaisonnalisant des agnelages. Actes du colloque ENITA Clermont "Produits Alimentaires Fermiers", Clermont-Ferrand, France, 71-75.

# La destagionalizzazione della produzione ovina in Sardegna: risultati sperimentali e prospettive



M. SITZIA, M. ACCIARO E M. DECANDIA

AGRIS Sardegna, Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali, SS 291 km. 18.600, 07100 Sassari

**Parole chiave:** latte ovino; agnello; foraggiere irrigue; pascolamento.

**SISTEMA TRADIZIONALE IN SARDEGNA** - Il sistema di allevamento della pecora da latte in Sardegna è condotto in maniera molto uniforme in tutta la regione e non tiene conto delle differenze pedo-climatiche e strutturali esistenti nell'isola. In tutta l'isola i parti delle pecore adulte sono concentrati a novembre. L'agnello viene allevato dalla madre per circa 30 giorni fino al raggiungimento di 10 kg di peso vivo. Solo dopo lo svezzamento o la macellazione di quest'ultimo, la pecora inizia la fase di lattazione vera e propria, la cui durata è di 180 - 220 giorni, durante la quale la mungitura viene ripetuta due volte al giorno. Le agnelle partoriscono a febbraio, la loro lattazione è più corta finendo poco dopo quella delle adulte. Le forti differenze ambientali che si riscontrano nella regione incidono fortemente sui risultati economici aziendali. A fianco ad aziende di collina, caratterizzate dalla sola presenza di pascolo naturale, ci sono aziende irrigue, con alta percentuale di superfici coltivabili. Il principale fattore che differenzia aziende così diverse è il carico animale allevato per ettaro, così si passa da produzioni di latte per ettaro di 700 - 900 litri nel primo caso fino anche a 3000 - 3500 litri nel secondo. Le superfici irrigue sono utilizzate per la coltivazione di erbai estivi destinati agli animali asciutti o per la coltivazione anticipata di quelli autunnali e, in aziende con bassi vincoli di coltivazione, per la produzione di scorte di fieno di erba medica e di insilato o granella di mais.

In questi contesti ambientali e strutturali le aziende zootecniche potrebbero puntare alla maggiore valorizzazione delle risorse impiegate massimizzando la produzione zootecnica ritraibile per ettaro, diversificando la produzione e creando mercati alternativi.

**PERCHÉ DESTAGIONALIZZARE** - La destagionalizzazione della produzione di latte e carne potrebbe rappresentare un nuovo modello di sviluppo atto ad aumentare l'efficienza produttiva aziendale, valorizzando al meglio le potenzialità delle pianure irrigue nelle quali ricadono le aziende e portando alla diversificazione della produzione sia per quanto riguarda il momento in cui il prodotto trasformato, formaggio e carne, viene esitato nel mercato sia per quello che attiene alla sua tipologia. Inoltre parte della produzione di latte invernale sarebbe spostata all'estate permettendo migliori economie di scala ai caseifici che lavorerebbero tutto l'anno e che potrebbero proporre prodotti diversi, formaggi freschi, e ricotta molto richiesti durante la stagione turistica.

## ESPERIENZE SPERIMENTALI

**1. Allevamento intensivo (20 capi ha<sup>-1</sup>) totalmente irriguo** - L'esperienza è stata condotta per un quinquennio nella azienda sperimentale del Dipartimento per la Ricerca nelle Produzioni Animali di AGRIS a Monastir (Sud-Est dell'isola; Fois et al., 1997; Fois et al., 1999a; Fois et al., 1999b). Il sistema destagionalizzato prevedeva un confronto fra tre diverse epoche di parto: novembre (autunno, A), febbraio (tardivo, T) e giugno (ultrataardivo, U) al fine di valutare l'effetto delle diverse epoche di parto sul bilancio input/output del sistema di allevamento in pianura irrigua. Gli animali sono stati allevati al pascolo con utilizzazioni di 6-8 ore in inverno e 12 - 14 ore in estate, munti due volte al giorno e ricoverati in ovile per il resto della giornata. Il sistema foraggero era rappresentato dal 40% di prati misti di trifoglio ladino (*Trifolium repens* L.) e loglio perenne (*Lolium perenne* L.), dal 35% da erbaio di loglio italico (*Lolium multiflorum* L.) in doppio ciclo con il sorgo (*Sorghum halepense* x *Sorghum sudanese* Stapf.) e dal 25% da prato di erba medica, fuori rotazione, per la produzione di fieno. Il confronto tra le due epoche di parto destagionalizzate, febbraio e giugno, ha mostrato la superiorità del sistema T rispetto a U grazie alla maggiore fertilità delle pecore (100% vs 75%), alle maggiori produzioni di latte (293 kg capo<sup>-1</sup> vs 237 kg capo<sup>-1</sup>) ed al maggiore autoapprovvigionamento del sistema *in toto* (80% vs 68%). Il sistema A ha avuto risultati intermedi fra i due anche se più vicini al sistema T (271 kg capo<sup>-1</sup> di latte, 77% di approvvigionamento interno del sistema).

Dal punto di vista della complementarietà della produzione estiva con quella invernale, considerato che il 40% della produzione è stato registrato nei primi 3 mesi di lattazione, il parto a febbraio non sembra invece la migliore soluzione. Spostare la stagione dei salti a gennaio per ritardare i parti a fine maggio-giugno comporta, a fronte di una minore fertilità, una buona complementarietà della produzione di latte a patto che ci sia a supporto un sistema foraggero di qualità che sorregga l'accrescimento degli agnelli prima, e la curva di lattazione poi.

## 2. Allevamento semi intensivo (8,5 capi ha<sup>-1</sup>) parzialmente irriguo

L'esperienza è stata condotta nel 2005 nella azienda sperimentale del Dipartimento per la ricerca nelle Produzioni Animali di AGRIS a Bonassai (Nord-Ovest dell'isola; Piras 2006; Piras et al. 2007). Il sistema destagionalizzato (52 pecore di cui 11 saccaie) prevedeva l'epoca di parto a marzo e la lattazione da aprile ad ottobre. Gli animali sono stati allevati al pascolo, munti due volte al giorno e ricoverati in ovile durante le ore centrali della giornata. Il sistema foraggero era rappresentato dal 66% di prati disetanei di cicoria (*Cichorium intybus* L.) e di sulla (*Hedysarum coronarium* L.), quest'ultima non irrigua, dal 17% da erbaio di miglio perlato (*Pennisetum glaucum* L.) e dal 17% da prato di erba medica (*Medicago sativa* L.), fuori rotazione, per la produzione di fieno. L'incidenza della superficie irrigua era del 66%. Il sistema foraggero ha garantito una disponibilità media di 1.7±0.5 t SS ha<sup>-1</sup> mediamente per tutta la stagione di pascolamento, con un tenore di PG=16.9±2.7 e di NDF=42.1±4.5. Il consumo medio di acqua irrigua è stato di 5500 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup>. La stagione di monta ad ottobre ha fatto registrare ottimi risultati riproduttivi (fertilità=100%, prolificità 1.58±0.6) e ritmi di accrescimento degli agnelli di 255±0.1 g die<sup>-1</sup> durante il mese di allattamento. La produzione media di latte per capo è risultata di 279 l in 180 giorni con un tenore di grasso e proteina di 5,8% e 4,7%, rispettivamente. Un abbassamento della proteina offerta rilevato alla fine del mese di giugno nella cicoria ha provocato un abbassamento repentino della curva di lattazione che in generale si è dimostrata poco persistente.

## PROSPETTIVE E CRITICITÀ DELLA DESTAGIONALIZZAZIONE DELLA PRODUZIONE OVINA IN SARDEGNA

Le diverse prove sperimentali portate avanti nella pianura irrigua sarda hanno dimostrato che la destagionalizzazione dei parti è tecnicamente possibile con risultati incoraggianti per quanto riguarda le produzioni di latte per ettaro e la sua complementarietà con la stagione produttiva tradizionale. Utilizzando infatti idonee catene di foraggiamento costituite per più del 65% da prati che garantiscano un apporto quanti-qualitativo di foraggio adeguato, affiancato ad una razionale complementazione, in sistemi totalmente (T e U) o parzialmente irrigui, è stato possibile ottenere 5860, 3500 e 2400 l ha<sup>-1</sup> di latte rispettivamente. I consumi di fieno e concentrato sono risultati più alti nei sistemi T e U (206 e 250 kg capo<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup> di fieno e 105 e 113 kg capo<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup> di concentrato, rispettivamente) in confronto al sistema semi intensivo (123 kg capo<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup> di fieno e 90 kg capo<sup>-1</sup> anno<sup>-1</sup> di concentrato). La migliore complementarietà con la produzione invernale si è ottenuta con il sistema U. Infatti sia con il sistema T che con il sistema semi intensivo il picco di lattazione si va a sovrapporre con la già importante produzione primaverile del sistema tradizionale. La difficoltà legata alla minore fertilità registrata nel sistema U può essere superata con l'anticipo di un mese della stagione di monta (da gennaio a dicembre), e una buona preparazione al parto. L'auto-approvvigionamento del sistema (68%) deve essere portato al 75 - 80% intervenendo nella catena di foraggiamento e nella gestione degli animali.

Nei sistemi con stagione di parto differito rispetto al ciclo tradizionale oltre alla produzione di latte si ottiene anche la produzione destagionalizzata della carne di agnello. Il mercato estivo in Sardegna potrebbe essere recettivo in questo senso grazie al flusso turistico stagionale. L'agnello da latte (10 kg di peso vivo, 25-35 giorni di età, accrescimenti

medi 200 – 250 g capo<sup>-1</sup> die<sup>-1</sup>), come pure l'agnello da taglio, svezzato a 40 giorni ed allevato completamente all'erba fino ad un peso di 22 kg (85 giorni di età, accrescimenti medi 200 g capo<sup>-1</sup> die<sup>-1</sup>) rappresentano un ulteriore punto di forza del sistema destagionalizzato in Sardegna. Il 67% di tutta la produzione degli ovini da latte è concentrata nelle regioni del Mediterraneo. Questa zona è caratterizzata dalla esposizione ad elevate temperature per circa 3 – 6 mesi all'anno a seconda della stagione (Finocchiaro et al., 2005). Le elevate temperature ambientali, unite alla elevata radiazione solare, ai forti venti ed alla elevata umidità relativa, determinano una temperatura effettiva che spesso supera la zona termoneutrale degli animali (da 5 a 25°C, McDowell, 1972) con conseguente stress termico. Lo stress da calore è a sua volta uno dei fattori limitanti la produzione lattiero-casearia influenzando non solo la quantità di latte prodotto ma anche la sua composizione (Finocchiaro et al., 2005). Questo viene stimato con il THI, indice di temperatura e umidità, che per gli ovini segnala la soglia del disagio degli animali quando supera 65 (Peana et al., 2007a) e determina una riduzione della produzione del latte e uno scadimento delle caratteristiche tecnologiche come osservato in Sicilia con pecore Comisane (Sevi et al., 2001) e con pecore della Valle del Belice (Finocchiaro et al., 2005) e in Sardegna con pecore di razza Sarda (Peana et al., 2007b). Alcuni studi hanno poi dimostrato che l'alimentazione svolge un ruolo fondamentale nel regolare la quantità e qualità del latte prodotto anche durante il periodo estivo (Pulina et al., 1993). A fronte di tutto ciò riveste quindi grande rilevanza la gestione degli animali in lattazione durante l'estate. Quando gli animali sono alimentati al pascolo, riducendo così i costi di alimentazione e aumentando il grado di auto approvvigionamento del sistema, è indispensabile che i greggi abbiano la disponibilità di zone di ombra e di punti di abbeverata durante il giorno e in particolare nelle sue ore centrali. La pecora Sarda è selezionata per il miglioramento quanti-qualitativo del latte prodotto durante la stagione invernale da ormai quasi un secolo. Si può comunque ipotizzare che all'interno della popolazione ci siano individui più adatti di altri allo spostamento della lattazione dall'in-

verno all'estate. Per aumentare la possibilità di un reale trasferimento della destagionalizzazione nella realtà aziendale e diminuire le ripercussioni negative delle avverse condizioni climatiche sulla salute, il benessere e quindi sulla produzione di latte della pecora sarebbe auspicabile un contributo da parte della genetica e della selezione. Ulteriori studi sono comunque necessari per meglio definire gli aspetti tecnici che consentano un'ottimizzazione del sistema di produzione destagionalizzato. A tale scopo è in corso, nella pianura irrigua della Nurra (Bonassai) una prova il cui obiettivo è valutare le riposte produttive di un sistema destagionalizzato totalmente irriguo, con stagioni di monta a dicembre ed epoca di parti a fine maggio ed un carico di 15 capi ha<sup>-1</sup>.

#### ■ Out of season sheep production in Sardinia: experimental results and perspectives

**Key words:** sheep milk, sheep meat, selection, irrigated forages, grazing.

#### Bibliografia

- Finocchiaro R. et al. (2005) *J.Dairy Sci.* 88: 1855-1864.  
 Fois N. et al. (1997) *EAAP* 89 :97-100.  
 Fois N. et al. (1999a) *Options Méditerranéennes* 38: 219-222.  
 Fois N. et al. (1999b) *Informatore Agrario* 25: 43-46.  
 McDowell R. E. (1972) Freeman W.A. and Co., San Francisco, CA.  
 Peana I. et al. (2007) *ITAL.J.ANIM.SCI. VOL. 6 (SUPPL. 1): 577-579.*  
 Peana I. et al. (2007a) *ITAL.J.ANIM.SCI. VOL. 6 (SUPPL. 1): 581* Piras M. (2006) Tesi di dottorato Univ. Sassari: 115 pp.  
 Piras M. et al. (2007) *ITAL.J.ANIM.SCI. VOL. 6 (SUPPL. 1): 588-590.*  
 Pulina G. et al. (1993) *X Congr. Naz. ASPA: 353-356.*  
 Sevi A. et al. (2001) *J. Dairy Sci.* 84: 629-640.



*Finito di stampare  
nel mese di Ottobre 2013  
dalla Press Point srl  
di Abbiategrasso (Milano)*